(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-533316
(P2024-533316A)
(43)公表日　令和6年9月12日(2024.9.12)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 19/00	*(2006.01)*	C07K	19/00	ZNA	4B065
C12N 9/16	*(2006.01)*	C12N	9/16		4C084
C12N 9/12	*(2006.01)*	C12N	9/12		4H045
C12N 15/62	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z	
C12N 15/54	*(2006.01)*	C12N	15/54		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全593頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-515072(P2024-515072)
(86)(22)出願日　令和4年9月7日(2022.9.7)
(85)翻訳文提出日　令和6年5月2日(2024.5.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/076024
(87)国際公開番号　WO2023/039407
(87)国際公開日　令和5年3月16日(2023.3.16)
(31)優先権主張番号　63/241,931
(32)優先日　令和3年9月8日(2021.9.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　520445473
フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ シックス，エルエルシー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１４２，ケンブリッジ，ケンブリッジ・パークウェイ ５５，エイス・フロア
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ゲノムを調節するための方法及び組成物

(57)【要約】
標的ゲノムを調節するための方法及び組成物が開示される。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
遺伝子組換えポリペプチドであって、
Ｃａｓドメイン（例えば、Ｃａｓニッカーゼドメイン、例えばＣａｓ９ニッカーゼドメイン）；
表１若しくは表２３のポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列であって、前記Ｐｏｌドメインは、前記ＣａｓドメインのＣ末端である、ポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン又は配列；及び
前記Ｐｏｌドメインと前記Ｃａｓドメインとの間に配置されるリンカー
を含む遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項２】
前記リンカーは、表６からの配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を有する、請求項１に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項３】
前記Ｐｏｌドメインは、表１又は２３の前記Ｐｏｌドメインに対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を有する、請求項１又は２に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項４】
前記Ｐｏｌドメインは、表１又は２３の前記Ｐｏｌドメインに対して少なくとも９５％の同一性を有する配列を有する、請求項１～３のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項５】
前記Ｐｏｌドメインは、表１又は２３の前記Ｐｏｌドメインに対して少なくとも９８％の同一性を有する配列を有する、請求項１～４のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項６】
前記Ｐｏｌドメインは、表１又は２３の前記Ｐｏｌドメインに対して少なくとも９９％の同一性を有する配列を有する、請求項１～５のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項７】
前記Ｐｏｌドメインは、表１又は２３の前記Ｐｏｌドメインに対して１００％の同一性を有する配列を有する、請求項１～６のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項８】
前記リンカーは、表６からの前記リンカー配列に対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を有する、請求項１～７のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項９】
前記リンカーは、表６からの前記リンカー配列に対して少なくとも９５％の同一性を有する配列を有する、請求項１～８のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項１０】
前記リンカーは、表６からの前記リンカー配列に対して少なくとも９７％の同一性を有する配列を有する、請求項１～９のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項１１】
前記リンカーは、表６からの前記リンカー配列に対して１００％の同一性を有する配列を有する、請求項１～１０のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項１２】
前記Ｃａｓドメインは、表４の配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。

【請求項１３】
前記Ｃａｓドメインは、Ｃａｓニッカーゼドメインである、請求項１～１２のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項１４】
前記Ｃａｓドメインは、Ｃａｓ９ニッカーゼドメインである、請求項１～１３のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項１５】
前記Ｃａｓドメインは、Ｎ８６３Ａ突然変異を含む、請求項１～１４のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項１６】
ＮＬＳを含み、例えば２つのＮＬＳを含む、請求項１～１５のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項１７】
前記Ｃａｓ９ドメインのＮＬＳ　Ｎ末端を含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項１８】
前記ＰｏｌドメインのＮＬＳ　Ｃ末端を含む、請求項１～１７のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項１９】
前記Ｃａｓ９ドメインのＮ末端である第１のＮＬＳ及び前記ＰｏｌドメインのＣ末端である第２のＮＬＳを含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
【請求項２０】
請求項１～１９のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸（例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）。
【請求項２１】
請求項１～１９のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド又は請求項２０に記載の核酸を含む細胞。
【請求項２２】
システムであって、
ｉ）請求項１～１９のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド、並びに
ｉｉ）鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）であって、
ａ）標的核酸配列の一部に相補的なｇＲＮＡスペーサー；
ｂ）前記遺伝子組換えポリペプチドの前記Ｃａｓドメインに結合するｇＲＮＡスカフォールド；
ｃ）異種目的配列；及び
ｄ）プライマー結合部位配列（ＰＢＳ配列）
を含む鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）
を含むシステム。
【請求項２３】
前記鋳型核酸は、ＲＮＡを含む、請求項２２に記載のシステム。
【請求項２４】
前記鋳型核酸は、ＤＮＡを含む、請求項２２又は２３に記載のシステム。
【請求項２５】
前記鋳型核酸は、ＤＮＡ及びＲＮＡを含む、請求項２２に記載のシステム。
【請求項２６】
前記鋳型核酸は、表２４に列挙される核酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項２２～２５のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項２７】

前記鋳型核酸の前記ｇＲＮＡスペーサーは、表２４に列挙されるスペーサー配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項２６に記載のシステム。

【請求項２８】

前記鋳型核酸の前記ｇＲＮＡスカフォールドは、表２４に列挙されるスカフォールド配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項２６又は２７に記載のシステム。

【請求項２９】

前記鋳型核酸の前記ＰＢＳ配列は、表２４に列挙されるＰＢＳ配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項２６～２８のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項３０】

前記鋳型核酸配列は、例えば、５’から３’の順に、

（ｉ）表２４に列挙されるスペーサー配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列；

（ｉｉ）表２４に列挙されるスカフォールド配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列；及び／又は

（ｉｉｉ）表２４に列挙されるＰＢＳ配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列

の１つ又は複数（例えば、１、２又は３つ全て）を含む、請求項２６に記載のシステム。

【請求項３１】

前記鋳型核酸は、表２４に列挙される完全な鋳型分子配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、請求項２６～３０のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項３２】

前記ｇＲＮＡスペーサー及び前記ｇＲＮＡスカフォールドは、ＲＮＡを含む、請求項２２～３１のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項３３】

前記異種目的配列は、ＤＮＡを含み、及びＰＢＳ配列は、ＲＮＡを含む、請求項２２～３２のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項３４】

前記異種目的配列及びＰＢＳ配列は、ＤＮＡを含む、請求項２２～３２のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項３５】

前記遺伝子組換えポリペプチドは、表２３に列挙されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２２～３４のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項３６】

前記遺伝子組換えポリペプチドは、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｌ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ、ｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ若しくはｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑのいずれか１つのアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２２～３５のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項３７】
前記遺伝子組換えポリペプチドは、表２３に列挙される遺伝子組換えポリペプチドのＣａｓドメインアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２２～３６のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項３８】
前記遺伝子組換えポリペプチドは、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｌ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ、ｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ若しくはｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑのいずれか１つのＣａｓドメインアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２２～３７のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項３９】
前記遺伝子組換えポリペプチドは、表２３に列挙される遺伝子組換えポリペプチドのＰｏｌドメインアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２２～３８のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項４０】
前記遺伝子組換えポリペプチドは、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｌ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ、ｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ若しくはｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑのいずれか１つのＰｏｌドメインアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２２～３９のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項４１】
前記遺伝子組換えポリペプチドは、表２３に列挙される遺伝子組換えポリペプチドのＣａｓドメインアミノ酸配列及びＰｏｌドメインアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２２～４０のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項４２】
前記遺伝子組換えポリペプチドは、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｌ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ、ｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ若しくはｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑのいずれか１つのＣａｓドメインアミノ酸配列及びＰｏｌドメインアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２２～４１のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項４３】
細胞（例えば、ヒト細胞）内の標的核酸を修飾する方法であって、前記細胞を、請求項２２～４２のいずれか一項に記載のシステム又はそれをコードする核酸と接触させ、それにより前記標的核酸を修飾することを含む方法。
【請求項４４】
遺伝的欠陥と関連する疾患又は症状を有する対象を処置する方法であって、
前記対象に、請求項１～４２のいずれか一項に記載のシステム、ポリペプチド、鋳型ＲＮＡ又はそれをコードするＤＮＡを投与し、それにより遺伝的欠陥と関連する疾患又は症状を有する前記対象を処置すること
を含む方法。
【請求項４５】
遺伝的欠陥と関連する前記疾患又は症状は、表１２～１５のいずれかに列挙される適応症であり、及び／又は前記遺伝的欠陥は、表１２～１５のいずれかに列挙される遺伝子における欠陥である、請求項４４に記載の方法。

【請求項４６】
前記対象は、ヒト患者である、請求項４４又は４５に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、２０２１年９月８日に出願された米国仮特許出願第６３／２４１，９３１号に対する優先権を主張するものであり、その各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
配列表
本出願は、ＸＭＬ形式で電子的に提出され、全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。２０２１年９月８日に作成された前記ＸＭＬコピーは、Ｖ２０６５－７０２０ＷＯ＿ＳＬ．ｘｍｌと命名され、１１，２８８，５７６バイトのサイズである。
【背景技術】
【０００３】
ゲノムへの目的の核酸の組込みは、挿入事象を促進するための特殊なタンパク質の非存在下において低頻度で起こり、且つ部位特異性がほとんどない。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９のようないくつかの存在する手法は、宿主修復経路に依存する小さい編集により適しており、長い配列の組込みには有効性が低い。Ｃｒｅ／ｌｏｘＰといった他の既存の手法は、ｌｏｘＰ部位をゲノムに挿入する第１ステップ、次いで目的の配列をｌｏｘＰ部位に挿入する第２ステップを必要とする。当技術分野では、改善された組成物（例えばタンパク質及び核酸）及びゲノム内に目的の配列を挿入、変更又は削除する方法が必要とされている。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００４】
本開示は、宿主細胞、組織若しくは対象における１つ若しくは複数の位置のゲノムをインビボ又はインビトロで改変するための新規の組成物、システム及び方法に関する。特に、本発明は、注目する配列を宿主ゲノム中に挿入するか、宿主ゲノム中で改変するか、又は宿主ゲノム中で欠失させる組成物、システム及び方法を特徴とする。例えば、本開示は、遺伝子活性を調節する（例えば、目的の配列を挿入、変更又は削除する）ことが可能なシステム、及び１つ又は複数のこのようなシステムを投与して、疾患を引き起こす病原性突然変異を修正するように、ヌクレオチドにおけるゲノム配列を改変することにより、疾患を処置する方法を提供する。
【０００５】
組成物又は方法の構成は、以下に列挙される実施形態の１つ又は複数を含み得る。
【０００６】
１．遺伝子組換えポリペプチドであって、
標的核酸配列に結合するＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）及び
表１若しくは２３のポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列であって；ＤＢＤは、Ｐｏｌドメインに対して異種である、ポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン；及び
ＰｏｌドメインとＤＢＤとの間に配置されるリンカー
を含む遺伝子組換えポリペプチド。
【０００７】
２．遺伝子組換えポリペプチドであって、
Ｃａｓドメイン（例えば、Ｃａｓニッカーゼドメイン、例えばＣａｓ９ニッカーゼドメイン）；

表１若しくは２３のポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列であって、Ｐｏｌドメインは、ＣａｓドメインのＣ末端である、ポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン又は配列；及び
ＰｏｌドメインとＣａｓドメインとの間に配置されるリンカー
を含む遺伝子組換えポリペプチド。

【０００８】
３．リンカーは、表６からの配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を有する、実施形態１又は２の遺伝子組換えポリペプチド。

【０００９】
４．Ｐｏｌドメインは、表１又は２３のＰｏｌドメインに対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態の遺伝子組換えポリペプチド。

【００１０】
５．Ｐｏｌドメインは、表１又は２３のＰｏｌドメインに対して少なくとも９５％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。

【００１１】
６．Ｐｏｌドメインは、表１又は２３のＰｏｌドメインに対して少なくとも９８％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。

【００１２】
７．Ｐｏｌドメインは、表１又は２３のＰｏｌドメインに対して少なくとも９９％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。

【００１３】
８．Ｐｏｌドメインは、表１又は２３のＰｏｌドメインに対して１００％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。

【００１４】
９．リンカーは、表６からのリンカー配列に対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。

【００１５】
１０．リンカーは、表６からのリンカー配列に対して少なくとも９５％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。

【００１６】
１１．リンカーは、表６からのリンカー配列に対して少なくとも９７％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。

【００１７】
１２．リンカーは、表６からのリンカー配列に対して１００％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。

【００１８】
１３．Ｃａｓドメインは、表４の配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を含む、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。

【００１９】
１４．Ｃａｓドメインは、Ｃａｓニッカーゼドメインである、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。

【００２０】
１５．Ｃａｓドメインは、Ｃａｓ９ニッカーゼドメインである、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。

【００２１】
１６．Ｃａｓドメインは、Ｎ８６３Ａ突然変異を含む、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。

【００２２】
１７．ＮＬＳを含み、例えば２つのＮＬＳを含む、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００２３】
１８．Ｃａｓ９ドメインのＮＬＳ　Ｎ末端を含む、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００２４】
１９．ＰｏｌドメインのＮＬＳ　Ｃ末端を含む、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００２５】
２０．Ｃａｓ９ドメインの Ｎ末端である第１のＮＬＳ及びＰｏｌドメインのＣ末端である第２のＮＬＳを含む、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００２６】
２１．先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸（例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）。
【００２７】
２２．実施形態１～２０のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド又は実施形態２１の核酸を含む細胞。
【００２８】
２３．システムであって、
ｉ）実施形態１～２０のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド、並びに
ｉｉ）鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）であって、
ａ）標的核酸配列の一部に相補的なｇＲＮＡスペーサー；
ｂ）遺伝子組換えポリペプチドのＣａｓドメインに結合するｇＲＮＡスカフォールド；
ｃ）異種目的配列；及び
ｄ）プライマー結合部位配列（ＰＢＳ配列）
を含む、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）
を含むシステム。
【００２９】
２４．鋳型核酸は、ＲＮＡを含む、実施形態２３のシステム。
【００３０】
２５．鋳型核酸は、ＤＮＡを含む、実施形態２３又は２４のシステム。
【００３１】
２６．ｇＲＮＡスペーサー及びｇＲＮＡスカフォールドは、ＲＮＡを含む、実施形態２３～２５のいずれかのシステム。
【００３２】
２７．異種目的配列は、ＤＮＡを含み、及びＰＢＳ配列は、ＲＮＡを含む、実施形態２３～２６のいずれかのシステム。
【００３３】
２８．異種目的配列及びＰＢＳ配列は、ＤＮＡを含む、実施形態２３～２６のいずれかのシステム。
【００３４】
２９．細胞（例えば、ヒト細胞）内の標的核酸を修飾する方法であって、細胞を、実施形態２３～２８のいずれかのシステム又はそれをコードする核酸と接触させ、それにより標的核酸を修飾することを含む方法。
【００３５】
３０．遺伝的欠陥と関連する疾患又は症状を有する対象を処置する方法であって、
対象に、先の実施形態のいずれかのシステム、ポリペプチド、鋳型ＲＮＡ又はそれをコードするＤＮＡを投与し、それにより遺伝的欠陥と関連する疾患又は症状を有する対象を処置すること

を含む方法。
【００３６】
３１．遺伝的欠陥と関連する疾患又は症状は、表１２～１５のいずれかに列挙される適応症であり、及び／又は遺伝的欠陥は、表１２～１５のいずれかに列挙される遺伝子における欠陥である、実施形態３０の方法。
【００３７】
３２．対象は、ヒト患者である、実施形態３０又は３１の方法。
【００３８】
一態様では、本開示は、遺伝子を組み換えるためのシステムであって、（ａ）標的プライミング逆転写が可能な遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸であって、ポリペプチドは、（ｉ）ポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン及び（ｉｉ）ＤＮＡに結合し、エンドヌクレアーゼ活性を有するＣａｓ９ニッカーゼを含む、核酸、並びに（ｂ）鋳型ＲＮＡ、ＤＮＡ、又は同じ鎖中にリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチド残基の両方を有するハイブリッドであって、（ｉ）標的遺伝子の第１の部分の第１の部分に相補的なｇＲＮＡスペーサー、（ｉｉ）ポリペプチドに結合するｇＲＮＡスカフォールド、（ｉｉｉ）遺伝子を組み換えるための突然変異領域を含む異種目的配列、及び（ｉｖ）鋳型ＲＮＡの３’末端において標的ＤＮＡ鎖に対して１００％の相同性の少なくとも３、４、５、６、７、又は８つの塩基を含むプライマー結合部位（ＰＢＳ）配列を含む、鋳型ＲＮＡ、ＤＮＡ、又はハイブリッドを含む、システムに関する。
【００３９】
ｇＲＮＡスペーサーは、鋳型ＲＮＡの５’末端において標的ＤＮＡに対して１００％の相同性の少なくとも１５の塩基を含み得る。鋳型ＲＮＡは、標的ＤＮＡ鎖に対して少なくとも８０％の相同性の少なくとも５つの塩基を含むＰＢＳ配列を更に含み得る。鋳型ＲＮＡは、１つ又は複数の化学修飾を含み得る。
【００４０】
遺伝子組換えポリペプチドのドメインは、ペプチドリンカーによって結合され得る。ポリペプチドは、１つ又は複数のペプチドリンカーを含み得る。遺伝子組換えポリペプチドは、核局在化シグナルを更に含み得る。ポリペプチドは、２つ以上の核局在化シグナル、例えば、複数の隣接する核局在化シグナル又はポリペプチドの異なる領域における１つ又は複数の核局在化シグナル、例えば、ポリペプチドのＮ末端における１つ又は複数の核局在化シグナル及びポリペプチドのＣ末端における１つ又は複数の核局在化シグナルを含み得る。遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸は、１つ又は複数のインテインドメインをコードし得る。
【００４１】
標的細胞へのシステムの導入は、外因性ＤＮＡの少なくとも１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、５００、又は１０００塩基対の挿入をもたらし得る。標的細胞へのシステムの導入は、欠失をもたらし得、ここで、欠失は、挿入の上流又は下流のゲノムＤＮＡの２、３、４、５、１０、５０又は１００塩基対未満である。標的細胞へのシステムの導入は、置換、例えば１、２又は３つのヌクレオチド、例えば連続したヌクレオチドの置換をもたらし得る。
【００４２】
異種目的配列は、少なくとも５、１０、２５、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、４００、５００、６００、又は７００塩基対であり得る。
【００４３】
一態様では、本開示は、上記のシステム及び薬学的に許容される賦形剤又は担体を含む医薬組成物に関し、ここで、薬学的に許容される賦形剤又は担体は、プラスミドベクター、ウイルスベクター、小胞、及び脂質ナノ粒子からなる群から選択される。一態様では、本開示は、上記のシステム及び複数の薬学的に許容される賦形剤又は担体を含む医薬組成物に関し、ここで、薬学的に許容される賦形剤又は担体は、プラスミドベクター、ウイル

スベクター、小胞、及び脂質ナノ粒子からなる群から選択され、例えば、ここで、上記のシステムは、２つの異なる賦形剤又は担体、例えば、２つの脂質ナノ粒子、２つのウイルスベクター、又は１つの脂質ナノ粒子及び１つのウイルスベクターによって送達される。ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）であり得る。

【００４４】

一態様では、本開示は、上記のシステムを含む宿主細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞）に関する。

【００４５】

一態様では、本開示は、細胞、組織又は対象内のヒト遺伝子の突然変異を修正する方法であって、上記のシステムを、細胞、組織又は対象に投与することを含む方法に関する。システムは、インビボ、インビトロ、エクスビボ、又はインサイチュで導入され得る。（ａ）の核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込まれ得る。一部の実施形態では、（ａ）の核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込まれない。一部の実施形態では、異種目的配列は、宿主細胞ゲノム内の１つのみの標的部位において挿入される。異種目的配列は、宿主細胞ゲノム内の２つ以上の標的部位において、例えば、２つの相同染色体における同じ対応する部位又は同じ又は異なる染色体上の２つの異なる部位において挿入され得る。異種目的配列は、哺乳動物ポリペプチド、又はそのフラグメント若しくは変異体をコードし得る。システムの成分は、１、２、３、４、又はそれ以上の異なる核酸分子上で送達され得る。システムは、エレクトロポレーションによって又はプラスミドベクター、ウイルスベクター、小胞、及び脂質ナノ粒子から選択される少なくとも１つのビヒクルを使用することによって宿主細胞内に導入され得る。

【図面の簡単な説明】

【００４６】

【図１】本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを示す。左側のダイアグラムは、Ｃａｓニッカーゼドメイン（例えば、ｓｐＣａｓ９　Ｎ８６３Ａ）及びリンカーによって連結されたＰｏｌドメインを含む遺伝子組換えポリペプチドを示す。右側のダイアグラムは、５’から３’に、ｇＲＮＡスペーサー、ｇＲＮＡスカフォールド、異種目的配列、及びプライマー結合部位配列（ＰＢＳ配列）を含む鋳型核酸を示す。異種目的配列は、標的部位と比べて１つ又は複数の配列差を含む突然変異領域を含み得る。異種目的配列は、突然変異領域に隣接する、前編集相同性領域及び後編集相同性領域も含み得る。特定の理論に束縛されることは意図しないが、鋳型核酸のｇＲＮＡスペーサーが、ゲノム内の標的部位の第２鎖に結合し、鋳型核酸のｇＲＮＡスカフォールドが、遺伝子組換えポリペプチドに結合して、例えば、遺伝子組換えポリペプチドを、ゲノム内の標的部位に局在化すると考えられる。遺伝子組換えポリペプチドのＣａｓドメインが、標的部位（例えば、標的部位の第１鎖）に切れ目を入れて、例えば、ＰＢＳ配列を、標的部位の第１鎖上で改変されるべき部位に隣接する配列に結合すると考えられる。遺伝子組換えポリペプチドのＰｏｌドメインが、プライマーとしての鋳型核酸のＰＢＳ配列及び鋳型としての鋳型核酸の異種目的配列を含む相補的配列に結合された標的部位の第１鎖を使用して、例えば、異種目的配列に相補的な配列を重合させると考えられる。特定の理論に束縛されることは意図しないが、次に、ＤＮＡ重合が、前編集相同性領域、次に突然変異領域、及び次に後編集相同性領域を通して進行することにより、異種目的配列によって特定される突然変異を含むＤＮＡ鎖を生成し得ると考えられる。

【図２】ヒトＤＮＡポリメラーゼシータの例示的な切断を示すダイアグラムである。

【図３】ＨＥＫ２９３細胞（図３Ａ）及びＵ２ＯＳ細胞（図３Ｂ）における示される鋳型核酸分子についてのＣａｓ－Ｐｏｌ遺伝子組換えポリペプチドによる編集活性を示す一連のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００４７】

定義

「発現カセット」という用語は、本明細書で使用される場合、本発明の核酸分子の発現

のために十分な核酸エレメントを含む核酸構築物を指す。
【００４８】
「ｇＲＮＡスペーサー」は、本明細書で使用される場合、標的核酸に対する相補性を有し、ｇＲＮＡスカフォールドと一緒に、Ｃａｓタンパク質を標的核酸に標的化し得る、核酸の部分を指す。
【００４９】
「ｇＲＮＡスカフォールド」は、本明細書で使用される場合、Ｃａｓタンパク質に結合し得、ｇＲＮＡスペーサーと一緒に、Ｃａｓタンパク質を標的核酸に標的化し得る、核酸の部分を指す。一部の実施形態では、ｇＲＮＡスカフォールドは、ｃｒＲＮＡ配列、テトラループ、及びｔｒａｃｒＲＮＡ配列を含む。
【００５０】
「遺伝子組換えポリペプチド」は、本明細書で使用される場合、ポリメラーゼ又はレトロウイルス逆転写酵素を含むポリペプチド、又は核酸配列（例えば、鋳型核酸上で提供される配列）を標的ＤＮＡ分子（例えば、宿主細胞内のゲノムＤＮＡ分子などの、哺乳動物宿主細胞内）に組み込むことが可能なポリメラーゼ又はレトロウイルス逆転写酵素に対する少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、宿主機構に実質的に依存せずに配列を組み込むことが可能である。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、配列を、ゲノム内のランダム位置に組み込み、一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、配列を特定の標的部位に組み込む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、集合的に、１）鋳型核酸への結合、２）標的ＤＮＡ分子への結合を促進し、３）鋳型核酸の少なくとも一部の、標的ＤＮＡへの組み込みを促進する１つ又は複数のドメインを含む。遺伝子組換えポリペプチドは、天然ポリペプチド及び例えば天然配列に対する１つ又は複数のアミノ酸置換を有するその操作された変異体の両方を含む。遺伝子組換えポリペプチドは、異種構築物も含み、例えば、ここで、上記に列挙されるドメインの１つ又は複数は、それ以外には野生型ドメインの異種融合（又は他のコンジュゲート）並びに修飾ドメインの融合によるかどうか、例えば、異種サブドメイン又は他の置換ドメインの置換又は融合によるかどうかにかかわらず、互いに異種である。本明細書に提供される方法において使用され得る、例示的な遺伝子組換えポリペプチド、及びそれらを含むシステム及びそれらを使用する方法が、例えば、レトロウイルス逆転写酵素ドメインを含む遺伝子組換えポリペプチドに関して参照により本明細書に組み込まれるＰＣＴ／ＵＳ２０２１／０２０９４８号明細書に記載される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、配列を遺伝子に組み込む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、配列を、遺伝子の外部の配列に組み込む。「遺伝子組換えシステム」は、本明細書で使用される場合、遺伝子組換えポリペプチド及び鋳型核酸を含むシステムを指す。
【００５１】
「ドメイン」という用語は、本明細書で使用される場合、生体分子の特定の機能に寄与する生体分子の構造を指す。ドメインは、生体分子の連続領域（例えば、連続配列）又は個別の非連続領域（例えば、非連続配列）を含み得る。タンパク質ドメインの例として、以下に限定されないが、エンドヌクレアーゼドメイン、ＤＮＡ結合ドメイン、ポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン、動員ドメイン、逆転写ドメインが挙げられ；核酸のドメインの例は、調節ドメイン、例えば転写因子結合ドメインである。一部の実施形態では、ドメイン（例えば、Ｃａｓドメイン）は、２つ以上のより小さいドメイン（例えば、ＤＮＡ結合ドメイン及びエンドヌクレアーゼドメイン）を含み得る。
【００５２】
本明細書で使用されるように、用語「外性」とは、生体分子（例えば、核酸配列又はポリペプチドなど）に関して用いられる場合、生体分子が、人為的に、宿主ゲノム、細胞若しくは生物に導入されたことを意味する。例えば、組換えＤＮＡ技術又はその他の方法を用いて、既存のゲノム、細胞、組織若しくは対象に付加される核酸は、既存の核酸配列、

細胞、組織若しくは対象に対して外性である。

【００５３】

本明細書中で用いられる、標的ＤＮＡの個々のＤＮＡ鎖を説明するのに用いられる「第１の鎖」及び「第２の鎖」は、２つのＤＮＡ鎖を識別し、これらの鎖に基づいて、Ｐｏｌドメインは、例えば標的プライムド合成が開始する場所に基づいて、重合を開始する。第１の鎖は、標的ＤＮＡの鎖を指し、この上で、Ｐｏｌドメインが重合を開始する、例えば、標的プライムド合成が開始される。第２の鎖は、標的ＤＮＡの他方の鎖を指す。名称第１の鎖及び第２の鎖は、その他の点では標的部位ＤＮＡ鎖を説明しない；例えば、一部の実施形態において、第１の鎖及び第２の鎖は、本明細書中に記載されるポリペプチドによってニックが入れられるが、名称「第１の」及び「第２の」鎖は、そのようなニックが出現する順序とは無関係である。

【００５４】

「ゲノムセーフハーバー部位」（ＧＳＨ部位）は、例えば、挿入された遺伝因子が、宿主細胞若しくは生物にリスクをもたらす宿主ゲノムの有意な改変を引き起こさないように、新たな遺伝物質の組込みを収容することができる宿主ゲノム内の部位である。ＧＳＨ部位は、概して、以下の基準の１、２、３、４、５、６、７、８若しくは９を満たす：（ｉ）癌関連遺伝子から＞３００ｋｂに位置する；（ｉｉ）ｍｉＲＮＡ／その他の機能性低分子ＲＮＡから＞３００ｋｂに位置する；（ｉｉｉ）５’遺伝子末端から＞５０ｋｂに位置する；（ｉｖ）複製起点から＞５０ｋｂに位置する；（ｖ）超保存エレメントから＞５０ｋｂ離れている；（ｖｉ）低転写活性を有する（すなわちｍＲＮＡ＋／－２５ｋｂがない）；（ｖｉｉ）コピー数可変領域内ではない；（ｖｉｉｉ）オープンクロマチン内である；及び／又は（ｉｘ）ヒトゲノム内に１コピーを有し、ユニークである。これらの基準のいくつか又は全部を満たすヒトゲノム内のＧＳＨ部位の例として、以下のものが挙げられる：（ｉ）アデノウイルス部位１（ＡＡＶＳ１）、１９番染色体上のＡＡＶウイルスの天然に存在する組込み部位；（ｉｉ）ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）受容体５（ＣＣＲ５）遺伝子、ＨＩＶ－１共受容体として知られるケモカイン受容体遺伝子；（ｉｉｉ）マウスＲｏｓａ２６遺伝子座のヒトオーソログ；（ｉｖ）リボソームＤＮＡ（「ｒＤＮＡ」）遺伝子座。更に別のＧＳＨ部位が知られており、例えば、Ｐｅｌｌｅｎｚ ｅｔ ａｌ．ｅｐｕｂ Ａｕｇｕｓｔ ２０，２０１８（ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／３９６３９０）に記載されている。

【００５５】

用語「異種」は、第２の要素に関して第１の要素を表すために使用されるとき、第１の要素と第２の要素が、記載されるような配置で天然に存在しないことを意味する。例えば、異種ポリペプチド、核酸分子、構築物若しくは配列は、（ａ）それが発現される細胞に対してネイティブではないポリペプチド、核酸分子、又はポリペプチド若しくは核酸分子配列の部分、（ｂ）その天然の状態に対して改変若しくは突然変異したポリペプチド若しくは核酸分子又はポリペプチド若しくは核酸分子の部分、又は（ｃ）類似の条件下でのネイティブ発現レベルと比較して改変された発現を有するポリペプチド又は核酸分子を指す。例えば、異種調節配列（例えば、プロモータ、エンハンサー）を用いて、遺伝子又は核酸分子が天然に通常発現されるものと異なる様式で遺伝子又は核酸分子の発現を調節することができる。別の例において、ポリペプチドの異種ドメイン、又は核酸配列（例えば、ポリペプチドのＤＮＡ結合ドメイン、又はポリペプチドのＤＮＡ結合ドメインをコードする核酸）は、他のドメインと比較して配置され得るか、或いはポリペプチドの他のドメイン若しくは一部又はそのコード核酸と比較して異なる配列又は異なる供給源由来であり得る。特定の実施形態では、異種核酸分子は、天然の宿主細胞ゲノム内に存在し得るが、改変された発現レベル若しくは異なる配列を有するか、又はその両方であり得る。他の実施形態では、異種核酸分子は、宿主細胞又は宿主ゲノムに内在性でなくてもよいが、代わりに形質転換（例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション）により宿主細胞に導入され得、ここで、付加される分子は、宿主ゲノムに組み込まれ得るか、又は一過性（例えば、ｍＲＮＡ）若しくは２世代以上にわたって半安定的（例えば、エピソームウイ

ルスベクター、プラスミド若しくは他の自己複製ベクター）のいずれかで染色体外遺伝材料として存在することができる。

【００５６】

本明細書で使用される場合、標的部位への配列の「挿入」は、標的部位におけるＤＮＡ配列の正味の付加を指し、例えば、ここで、非編集標的部位におけるコグネイト位置を有さない異種目的配列における新たなヌクレオチドがある。一部の実施形態では、標的核酸配列に対するＰＢＳ配列及び異種目的配列のヌクレオチドアラインメントが、標的核酸配列におけるアラインメントギャップをもたらすであろう。

【００５７】

本明細書で使用される場合、標的部位における異種目的配列によって生成される「欠失」は、標的部位におけるＤＮＡ配列の正味の欠失を指し、例えば、ここで、異種目的配列におけるコグネイト位置を有さない非編集標的部位におけるヌクレオチドがある。一部の実施形態では、標的核酸配列に対するＰＢＳ配列及び異種目的配列のヌクレオチドアラインメントが、ＰＢＳ配列及び異種目的配列を含む分子におけるアラインメントギャップをもたらすであろう。

【００５８】

本明細書中で用いられる用語「逆位末端反復」又は「ＩＴＲ」は、その対称性のためそう命名されたＡＡＶウイルスシスエレメントを指す。そのエレメントは、ＡＡＶゲノムの有効な増加を促進する。ＩＴＲ機能のための最小エレメントは、Ｒｅｐ結合部位（ＲＢＳ；ＡＡＶ２のための５’－ＧＣＧＣＧＣＴＣＧＣＴＣＧＣＴＣ－３’及び末端分離部位（ＴＲＳ；ＡＡＶ２のための５’－ＡＧＴＴＧＧ－３’）並びにヘアピン形成を可能にする可変的な回文配列であると仮定される。本発明に従えば、ＩＴＲは、少なくともこれらの３つのエレメント（ＲＢＳ、ＴＲＳ、及びヘアピンの形成を可能にする配列）を含む。加えて、本発明において、用語「ＩＴＲ」は、知られている天然のＡＡＶ血清型のＩＴＲ（例えば血清型１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、又は１１　ＡＡＶのＩＴＲ）を、異なる血清型に由来するＩＴＲエレメントの融合によって形成されるキメラＩＴＲを、そしてその機能的バリアントを指す。「機能的バリアント」は、知られているＩＴＲと、少なくとも８０％、８５％、９０％の、好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を示し、且つＲｅｐタンパク質の存在下で前記ＩＴＲを含む配列の増加を可能にする配列を指す。

【００５９】

「突然変異領域」という用語は、本明細書で使用される場合、標的核酸中の対応する配列と比べて、１つ又は複数の配列差を有する鋳型核酸中の領域を指す。配列差は、例えば、置換、挿入、フレームシフト、又は欠失を含み得る。

【００６０】

用語「（突然）変異型」は、核酸配列に適用されるとき、核酸配列内のヌクレオチドが、参照（例えば、天然）核酸配列に比して、挿入、欠失若しくは変更されていることを意味する。単一の改変が１遺伝子座で為される（点変異）、又は単一遺伝子座で複数のヌクレオチドが挿入、欠失若しくは変更される場合もある。加えて、１核酸配列内の任意の数の遺伝子座で、１つ若しくは複数の改変が為される場合もある。核酸配列は、当技術分野で公知の任意の方法によって突然変異させることができる。

【００６１】

「核酸分子」は、ＲＮＡ及びＤＮＡ分子の両方を指し、限定しないが、相補的ＤＮＡ（「ｃＤＮＡ」）、ゲノムＤＮＡ（「ｇＤＮＡ」）及びメッセンジャーＲＮＡ（「ｍＲＮＡ」）が挙げられ、本明細書に記載される通り、ＲＮＡ鋳型のように、化学的に合成される又は組換えにより生成されるものなどの合成核酸分子も含む。核酸分子は、二本鎖又は一本鎖、環状若しくは線状であり得る。一本鎖の場合、核酸分子は、センス鎖又はアンチセンス鎖であり得る。別に記載のない限り、また一般フォーマット「配列番号」として本明細書に記載される全ての配列の例として、「配列番号１」を含む核酸は、少なくともその一部が、（ｉ）配列番号１の配列、又は（ｉｉ）配列番号１と相補的な配列のどちらかを有する核酸を指す。２つのどちらを選択するかは、配列番号１が使用される状況によって

決定される。例えば、核酸がプローブとして使用される場合、２つの間の選択は、プローブが、所望の標的と相補的であるという要件によって決定される。本開示の核酸配列は、当業者に容易に理解されるように、化学的若しくは生化学的に修飾され得るか、又は非天然若しくは誘導体化ヌクレオチド塩基を含有し得る。こうした修飾として、例えば、標識、メチル化、類似体による１つ若しくは複数の自然発生的なヌクレオチドの置換、無電荷結合（例えば、メチルホスホン酸、リン酸トリエステル、ホスホロアミダート、カルバミン酸塩など）、電荷結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）などのヌクレオチド間修飾、ペンダント部分、（例えば、ポリペプチド）、挿入剤（例えば、アクリジン、ソラレンなど）、キレート剤、アルキル化剤、及び修飾結合（例えば、α－アノマー核酸など）が挙げられる。化学修飾塩基（例えば、下記の表９を参照）、バックボーン（例えば、下記の表１０を参照）、及び修飾キャップ（例えば、下記の表１１を参照）も含まれる。水素結合及びその他の化学的相互作用により指定配列と結合する能力についてポリヌクレオチドを模倣する合成分子も含まれる。こうした分子は、当技術分野において公知であり、例えば、分子の骨格中のリン酸結合の代わりにペプチド結合を使用するもの、例えばペプチド核酸（ＰＮＡ）がある。他の修飾として、例えば、リボース環が、架橋部分又は「ロックド」核酸（ＬＮＡ）に見いだされる修飾などの他の構造を含む類似体を挙げることができる。種々の実施形態において、核酸は、追加の遺伝的エレメント、例えば、組織特異的発現－制御配列（例えば、組織特異的プロモータ及び組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列）並びに追加のエレメント、例えば逆位反復（例えば逆位末端反復、例えば、ウイルスに由来するエレメント（例えばＡＡＶ　ＩＴＲ））及びタンデム反復、逆位反復／直接反復、相同領域（標的ＤＮＡに対する相同性の程度が異なるセグメント）、非翻訳領域（ＵＴＲ）（５’、３’、又は５’と３’両方のＵＴＲ）並びに前述のものの種々の組合せと作用関連している。本発明によって提供されるシステムの核酸エレメントは、一本鎖、二本鎖の、環状、直鎖状、オープンエンドの直鎖状、クローズドエンドの直鎖状、及びこれらの特定のバージョン、例えばｄｏｇｇｙｂｏｎｅ　ＤＮＡ（ｄｂＤＮＡ）、クローズドエンドのＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）が挙げられる種々のトポロジーで提供され得る。

【００６２】

本明細書で使用される場合、「遺伝子発現単位」は、少なくとも１つのエフェクター配列に作動可能に連結された少なくとも１つの調節核酸配列を含む核酸配列である。第１の核酸配列は、第１の核酸配列が、第２の核酸配列と機能的に関連して配置されるとき、第２の核酸配列と作動可能に連結している。例えば、プロモータ又はエンハンサーは、プロモータ又はエンハンサーが、コード配列の転写若しくは発現に影響を及ぼす場合、コード配列と作動可能に連結している。作動可能に連結したＤＮＡ配列は、連続的又は非連続であり得る。２つのタンパク質コード領域を連結する必要がある場合、作動可能に連結した配列が同じリーディングフレーム内に存在し得る。

【００６３】

「宿主ゲノム」又は「宿主細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、タンパク質及び／又は遺伝材料が導入された細胞及び／又はそのゲノムを指す。こうした用語は、特定の対象細胞及び／又はゲノムだけではなく、そのような細胞の子孫及び／又はそのような細胞の子孫のゲノムも指す。特定の修飾は、突然変異又は環境の影響により後の世代に起こり得ることから、こうした子孫は、実際、親細胞と同一ではない場合もあるが、やはり本明細書で使用される用語「宿主細胞」の範囲に含まれることを理解されたい。宿主ゲノム又は宿主細胞は、単離された細胞若しくは培養で増殖した細胞株又はそうした細胞若しくは細胞株から単離されたゲノム物質であり得るか、或いは生体組織若しくは生物を構成する宿主細胞又は宿主ゲノムであり得る。いくつかの事例では、宿主細胞は、例えば、本明細書で記載されるように、動物細胞又は植物細胞であり得る。特定の例では、宿主細胞は、哺乳動物細胞、ヒト細胞、鳥類細胞、爬虫類細胞、ウシ細胞、ウマ細胞、ブタ細胞、ヤギ細胞、ヒツジ細胞、ニワトリ細胞、又はシチメンチョウ細胞であり得る。特定の例では、宿主細胞は、トウモロコシ細胞、ダイズ細胞、コムギ細胞、又はコメ細胞であり

得る。
【００６４】
本明細書中で用いられる「作用関連」は、２つの核酸配列、例えば１）プロモータと、２）異種目的配列との機能的関係を説明し、そしてそのような例では、プロモータ及び異種目的配列（例えば、注目する遺伝子）は、適切な条件の下で、プロモータが異種目的配列の発現を駆動するように、向きを定められていることを意味する。例えば、プロモータと異種目的配列とを有する鋳型核酸は、例えば、（＋）又は（－）の向きの一本鎖であり得る。この鋳型中のプロモータと異種目的配列との間の「作用関連」は、鋳型核酸が特定の状態で転写されることとなるか否かに拘らず、適切な状態にある（例えば、必要とされる触媒因子及びＮＴＰその他の存在下で、（＋）の向きである）場合、正確に転写されることを意味する。作用関連は、他の組織特異的発現制御配列（例えば、エンハンサー、リプレッサ、及びマイクロＲＮＡ認識配列）、ＩＲ／ＤＲ、ＩＴＲ、ＵＴＲ、又は相同領域、及び異種目的配列、又はレトロウイルスＲＴドメインをコードする配列が挙げられる、核酸の他の対に類似して当て嵌まる。
【００６５】
「プライマー結合部位配列」又は「ＰＢＳ配列」という用語は、本明細書で使用される場合、標的核酸配列に含まれる領域に結合することが可能な、鋳型核酸の部分を指す。いくつかの事例では、ＰＢＳ配列は、標的核酸配列に含まれる領域に対して１００％の同一性を有する少なくとも３、４、５、６、７、又は８つの塩基を含む核酸配列である。一部の実施形態では、プライマー領域は、標的核酸配列に含まれる領域に対して１００％の同一性を有する少なくとも５、６、７、８つの塩基を含む。特定の理論に束縛されることを意図しないが、一部の実施形態では、鋳型核酸が、ＰＢＳ配列及び異種目的配列を含む場合、ＰＢＳ配列は、標的核酸配列に含まれる領域に結合して、Ｐｏｌドメインが、ＤＮＡ重合のためのプライマーとしてその領域を使用し、鋳型として異種目的配列を使用することを可能にする。
【００６６】
本明細書中で用いられる「ステム－ループ配列」は、自己相補性がステム－ループを形成するのに十分な、例えば、少なくとも２（例えば、３、４、５、６、７、８、９、又は１０）塩基対を含むステム、及び少なくとも３（例えば４）塩基対を有するループを有する、核酸配列（例えばＲＮＡ配列）を指す。ステムは、ミスマッチ又はバルジを含み得る。
【００６７】
本明細書中で用いられる「組織特異的発現－制御配列」は、異種目的配列を、標的組織内に組織特異的に、例えばオフターゲット組織と比較してオンターゲット組織内に優先的に含む転写産物のレベルを増減する核酸エレメントを意味する。一部の実施形態において、組織特異的発現－制御配列は、異種目的配列を、標的組織内に組織特異的に、例えばオフターゲット組織と比較してオンターゲット組織内に優先的に含む転写産物の転写、活性、又は半減期を優先的に駆動又は抑制する。例示的な組織特異的発現－制御配列は、組織特異的プロモータ、リプレッサ、エンハンサー、又はそれらの組合せ、及び組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列を含む。組織特異性は、オンターゲット（鋳型核酸の発現又は活性が所望されるか、又は容認できる組織）、及びオフターゲット（鋳型核酸の発現又は活性が所望されないか、又は容認できない組織）を指す。例えば、組織特異的プロモータは、オフターゲット組織と比較して、オンターゲット組織内で優先的に発現を駆動する。これに対し、組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列に結合するマイクロＲＮＡは、オンターゲット組織と比較して、オフターゲット組織内で優先的に発現されることにより、オフターゲット組織内での鋳型核酸の発現を引き下げる。従って、同じ組織、例えば標的組織に特有のプロモータ及びマイクロＲＮＡ認識配列は、組織内での関連配列の転写、活性、又は半減期に関して、対照的な機能を有する（発現レベルを一致させて、すなわち、オフターゲット組織内でのマイクロＲＮＡの高いレベル、及びオンターゲット組織内での低いレベルをそれぞれ促進且つ抑制する一方、プロモータは、オンターゲット組織内での高い発現、

及びオフターゲット組織内での低い発現を駆動する）。
【００６８】
見出し一覧
１）導入
２）遺伝子組換えシステム
ａ）遺伝子組換えシステムのポリペプチド成分
ｉ）ライティングドメイン
ｉｉ）エンドヌクレアーゼドメイン及びＤＮＡ結合ドメイン
（１）Ｃａｓドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド
（２）ＴＡＬエフェクター及びジンクフィンガーヌクレアーゼ
ｉｉｉ）リンカー
ｉｖ）遺伝子組換えシステムのための局在化配列
ｖ）遺伝子組換えポリペプチド及びシステムの進化型変異体
ｖｉ）インテイン
ｖｉｉ）更なるドメイン
ｂ）鋳型核酸
ｉ）ｇＲＮＡスペーサー及びｇＲＮＡスカフォールド
ｉｉ）異種目的配列
ｉｉｉ）ＰＢＳ配列
ｉｖ）例示的な鋳型配列
ｃ）誘導性活性を有するｇＲＮＡ
ｄ）遺伝子組換えシステムにおける環状ＲＮＡ及びリボザイム
ｅ）標的核酸部位
ｆ）第２の鎖ニッキング
３）組成物及びシステムの作製
４）用途
ａ）治療用途
ｂ）植物への適用
５）投与及び送達
ａ）組織特異的活性／投与
ｉ）プロモータ
ｉｉ）ｍｉｃｒｏＲＮＡ
ｂ）ウイルスベクター及びその成分
ｃ）ＡＡＶ投与
ｄ）脂質ナノ粒子
６）キット、製品、及び医薬組成物
７）化学、製造、及び制御（ＣＭＣ）
【００６９】
導入
本開示は、例えば、インビボ又はインビトロで、細胞、組織若しくは対象におけるＤＮＡ配列内の１つ若しくは複数の位置で、ＤＮＡ配列をターゲティング、編集、修飾若しくは操作する（例えば、哺乳動物ゲノムの標的部位に異種目的配列を挿入する）組成物、システム及び方法に関する。異種目的ＤＮＡ配列は、例えば、置換、欠失、挿入、例えばコード配列、調節配列又は遺伝子発現単位を含み得る。
【００７０】
より具体的には、本開示は、例えば、目的の配列中に／から１つ又は複数のヌクレオチドを挿入するか、欠失させるか、又は置換することにより、目的のゲノムＤＮＡ配列を改変するための、ＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ベースのシステムを提供する。
【００７１】
ポリメラーゼ官能基へのＣａｓ９関連の官能基の融合を用いて、ゲノムＤＮＡに対する

修飾を駆動し得る。ポリメラーゼ官能基は、例えば、核酸鋳型からＤＮＡを合成するＤＮＡポリメラーゼであり得る。核酸鋳型は、例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡであり得る。ＲＮＡ鋳型を使用し得るＤＮＡポリメラーゼ、例えば、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ、例えば、逆転写酵素の場合、遺伝子組換えポリペプチド成分には、上記のものなどの鋳型ＲＮＡが提供され得る。１つのこのような例は、ＤＮＡポリメラーゼθ（ＰＯＬＱによってコードされる、本明細書において「ＰＯＬＱ」又は「Ｐｏｌθ」と呼ばれ得るポリペプチド産物）、鋳型としてＤＮＡ又はＲＮＡのいずれかを使用することが示されている真核生物ＤＮＡポリメラーゼである。Ｃｈａｎｄｒａｍｏｕｌｙ　ｅｔ　ａｌ．２０２１（ＤＯＩ：１０．１１２６／ｓｃｉａｄｖ．ａｂｆ１７７１）。従って、（任意選択でリンカーを介して）ＰＯＬＱ（又はＰＯＬＱの構成要素）に融合されるＣａｓ９官能基は、（ｇＲＮＡスペーサーを介して）修飾に望ましいゲノム部位を標的とする鋳型ＲＮＡと共に生物又は細胞に投与されるとき、ゲノム修飾のためのドライバーとして使用され得、（ｇＲＮＡスカフォールドを介して）Ｃａｓ９官能基を動員し、（鋳型ＲＮＡを介して）ＤＮＡ合成をプライム及び鋳型化する。

【００７２】

本開示は、部分的に、遺伝子組換えポリペプチド成分及び鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）成分を含む遺伝子組換えシステムを提供する。一部の実施形態において、遺伝子組換えシステムを用いて、ゲノム内の標的部位中に改変を導入することができる。一部の実施形態において、遺伝子組換えポリペプチド成分は、ライティングドメイン（例えば逆転写酵素ドメイン）、ＤＮＡ結合ドメイン、及びエンドヌクレアーゼドメイン（例えばニッカーゼドメイン）を含む。一部の実施形態において、鋳型核酸（例えば鋳型ＲＮＡ）は、ゲノム内の標的部位に結合する（例えば、標的部位の第２の鎖に結合する）配列（例えばｇＲＮＡスペーサー）、遺伝子組換えポリペプチド成分に結合する配列（例えばｇＲＮＡスカフォールド）、異種目的配列及びＰＢＳ配列を含む。理論によって拘束されることを望むものではないが、鋳型核酸（例えば鋳型ＲＮＡ）は、ゲノム内の標的部位の第２の鎖に結合して、遺伝子組換えポリペプチド成分に結合する（例えば、ゲノム内の標的部位にポリペプチド成分を局在化させる）と考えられる。遺伝子組換えポリペプチド成分のエンドヌクレアーゼ（例えばニッカーゼ）は、標的部位（例えば、標的部位の第１の鎖）を切断して、例えば、ＰＢＳ配列が、標的部位の第１の鎖上で改変されることとなる部位に隣接する配列に結合し得ると考えられる。ポリペプチド成分のライティングドメイン（例えば、逆転写酵素ドメイン）は、プライマーとしての鋳型核酸のＰＢＳ配列及び鋳型としての鋳型核酸の異種目的配列を含む相補的配列に結合された標的部位の第１の鎖を用いて、例えば、異種目的配列に相補的な配列を重合すると考えられる。理論によって拘束されることを望むものではないが、適切な異種目的配列の選択は、標的部位での１つ以上のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は挿入をもたらし得ると考えられる。

【００７３】

遺伝子組換えシステム

一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムは、（Ａ）遺伝子組換えポリペプチド又は遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸を含み、ここで、遺伝子組換えポリペプチドは、（ｉ）逆転写酵素ドメイン、及び（ｘ）ＤＮＡ結合機能性を含むエンドヌクレアーゼドメイン又は（ｙ）エンドヌクレアーゼドメイン及び別個のＤＮＡ結合ドメインのいずれか；並びに（Ｂ）鋳型ＲＮＡを含む。遺伝子組換えポリペプチドは、一部の実施形態では、宿主機構に実質的に依存せずに、鋳型核酸配列を、標的ＤＮＡ分子（例えば、宿主細胞内のゲノムＤＮＡ分子などの、哺乳動物宿主細胞内）に組み込むことが可能な実質的に自律的なタンパク質機構として働く。例えば、遺伝子組換えタンパク質は、ＤＮＡ結合ドメイン、逆転写酵素ドメイン、及びエンドヌクレアーゼドメインを含み得る。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合機能は、タンパク質をＤＮＡ配列に導くＲＮＡ成分、例えば、ｇＲＮＡスペーサーを含み得る。他の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、逆転写酵素ドメイン及びエンドヌクレアーゼドメインを含み得る。遺伝子組換えシステムのＲＮＡ鋳型エレメントは、典型的に、遺伝子組換えポリペプチドエレメント

に対して異種であり、宿主ゲノム内に挿入（逆転写）される目的配列を提供する。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、標的プライミング逆転写が可能である。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、第２の鎖合成が可能である。

【００７４】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、第２のポリペプチドと組み合わされる。一部の実施形態では、第２のポリペプチドは、エンドヌクレアーゼドメインを含み得る。一部の実施形態では、第２のポリペプチドは、ポリメラーゼドメイン、例えば、逆転写酵素ドメインを含み得る。一部の実施形態では、第２のポリペプチドは、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼドメインを含み得る。一部の実施形態では、第２のポリペプチドは、例えば、第２の鎖合成又はＤＮＡ修復回復に寄与することにより、ゲノム編集の完了を補助する。

【００７５】

機能的遺伝子組換えポリペプチドは、無関係なＤＮＡ結合、逆転写、及びエンドヌクレアーゼドメインから構成され得る。このモジュラー構造は、機能ドメイン、例えば、ｄＣａｓ９（ＤＮＡ結合）、ＭＭＬＶ逆転写酵素（逆転写）、ＦｏｋＩ（エンドヌクレアーゼ）の組合せを可能にする。一部の実施形態では、複数の機能ドメインは、単一のタンパク質、例えば、Ｃａｓ９又はＣａｓ９ニッカーゼ（ＤＮＡ結合、エンドヌクレアーゼ）から起こることがある。

【００７６】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、集合的に、１）鋳型核酸への結合、２）標的ＤＮＡ分子への結合を促進し、３）鋳型核酸の少なくとも一部の、標的ＤＮＡへの組み込みを促進する１つ又は複数のドメインを含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、対応する天然配列に対する１つ又は複数のアミノ酸置換を含む改変されたポリペプチドである。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、例えば、それ以外には野生型ドメインの異種融合（又は他のコンジュゲート）並びに修飾ドメインの融合による、例えば、異種サブドメイン又は他の置換ドメインの置換又は融合による、互いに対して異種である２つ以上のドメインを含む。例えば、一部の実施形態では、ＲＴドメインが、ＤＢＤに対して異種であるか；ＤＢＤが、エンドヌクレアーゼドメインに対して異種であるか；又はＲＴドメインが、エンドヌクレアーゼドメインに対して異種であるかの１つ又は複数である。

【００７７】

一部の実施形態では、システムにおける使用のための鋳型ＲＮＡ分子は、５’から３’に、（１）ｇＲＮＡスペーサー；（２）ｇＲＮＡスカフォールド；（３）異種目的配列（４）プライマー結合部位（ＰＢＳ）配列を含む。一部の実施形態では：

（１）約１８～２２ｎｔのｇＲＮＡスペーサーであり、例えば、２０ｎｔであり、

（２）１つ又は複数のヘアピンループ、例えば、鋳型を、Ｃａｓドメイン、例えば、ニッカーゼＣａｓ９ドメインと会合するための１、２又は３つのループを含むｇＲＮＡスカフォールドである。一部の実施形態では、ｇＲＮＡスカフォールドは、５’から３’にかけて、ＧＴＴＴＴＡＧＡＧＣＴＡＧＡＡＡＴＡＧＣＡＡＧＴＴＡＡＡＡＴＡＡＧＧＣＴＡＧＴＣＣＧＴＴＡＴＣＡＡＣＴＴＧＡＡＡＡＡＧＴＧＧＧＡＣＣＧＡＧＴＣＧＧＴＣＣ（配列番号４００８）の配列を含む。

（３）一部の実施形態では、異種目的配列は、長さが、例えば、７～７４、例えば、１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、又は７０～８０ｎｔ若しくは８０～９０ｎｔである。一部の実施形態では、配列の第１の（大抵５’）塩基は、Ｃでない。

（４）一部の実施形態では、ニッキングが起きた後、標的プライミング配列に結合するＰＢＳ配列は、例えば、３～２０ｎｔ、例えば、７～１５ｎｔ、例えば、１２～１４ｎｔである。一部の実施形態では、ＰＢＳ配列は、４０～６０％のＧＣ含量を有する。

【００７８】

一部の実施形態では、システムと会合される第２のｇＲＮＡは、完全な組み込みの駆動

を補助し得る。一部の実施形態では、第２のｇＲＮＡは、第１の鎖ニックから０～２００ｎｔ離れた、例えば、第１の鎖ニックから０～５０、５０～１００、１００～２００ｎｔ離れた位置を標的にし得る。一部の実施形態では、第２のｇＲＮＡは、編集がなされた後、その標的配列にのみ結合することができ、例えば、ｇＲＮＡは、異種目的配列内に存在するが、初期標的配列内に存在しない配列に結合する。

【００７９】

一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを使用して、ＨＥＫ２９３、Ｋ５６２、Ｕ２ＯＳ、又はＨｅＬａ細胞に編集を実施する。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムを使用して、初代細胞、例えば、Ｅ１８．５マウスからの初代皮質ニューロンに編集を実施する。

【００８０】

一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドは、ＭｏＭＬＶＲＴ配列又はその変異体を含む逆転写酵素又はＲＴドメイン（例えば、本明細書に記載される）を含む。複数の実施形態では、ＭｏＭＬＶ　ＲＴ配列は、Ｄ２００Ｎ、Ｌ６０３Ｗ、Ｔ３３０Ｐ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｄ５２４Ｇ、Ｅ５６２Ｑ、Ｄ５８３Ｎ、Ｐ５１Ｌ、Ｓ６７Ｒ、Ｅ６７Ｋ、Ｔ１９７Ａ、Ｈ２０４Ｒ、Ｅ３０２Ｋ、Ｆ３０９Ｎ、Ｌ４３５Ｇ、Ｎ４５４Ｋ、Ｈ５９４Ｑ、Ｄ６５３Ｎ、Ｒ１１０Ｓ、及びＫ１０３Ｌから選択される１つ又は複数の突然変異を含む。複数の実施形態では、ＭｏＭＬＶ　ＲＴ配列は、任意選択で、Ｔ３０６Ｋ及び／又はＷ３１３Ｆを更に含む、Ｄ２００Ｎ、Ｌ６０３Ｗ、及びＴ３３０Ｐなどの突然変異の組合せを含む。

【００８１】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン（例えば、本明細書に記載される）は、例えば、Ｈ８４０Ａ突然変異を含む、ｎＣＡＳ９を含む。

【００８２】

一部の実施形態では、（例えば、本明細書に記載されるシステムの）異種目的配列は、約１～５０、５０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、又はそれ以上のヌクレオチド長である。

【００８３】

一部の実施形態では、ＲＴ及びエンドヌクレアーゼドメインは、例えば、アミノ酸配列ＳＧＧＳＳＧＧＳＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳＳＧＧＳＳＧＧＳＳ（配列番号４００６）を含む、フレキシブルリンカーによって連結される。

【００８４】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ＲＴドメインに対するＮ末端である。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ＲＴドメインに対するＣ末端である。

【００８５】

一部の実施形態では、システムは、例えば、本明細書に記載のように、ＴＰＲＴによって異種目的配列を標的部位に組み込む。

【００８６】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＤＮＡ結合ドメインを含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＲＮＡ結合ドメインを含む。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、Ｂ－ボックスタンパク質のＲＮＡ結合ドメイン、ＭＳ２コートタンパク質、ｄＣａｓ、又は本明細書中の表の配列のエレメントを含む。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、標準ＲＮＡ結合ドメインより高い親和性で鋳型ＲＮＡに結合することができる。

【００８７】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５若しくは１００ヌクレオチド（及び任意選択で５００以下、４００、３００、２００、又は１００ヌクレオチド）の標的部位に挿入を

生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５若しくは１００ヌクレオチド（及び任意選択で５００、４００、３００、２００若しくは１００ヌクレオチド以下）の標的部位に挿入を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５又は１０キロベース（及び任意選択で１、５、１０又は２０キロベース以下）の標的部位に挿入を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも８１、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０若しくは２００ヌクレオチド（及び任意選択で５００、４００、３００若しくは２００ヌクレオチド以下）の欠失を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも８１、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０若しくは２００ヌクレオチド（及び任意選択で５００、４００、３００若しくは２００ヌクレオチド以下）の欠失を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０若しくは２００ヌクレオチド（及び任意選択で５００、４００、３００若しくは２００ヌクレオチド以下）の欠失を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５若しくは１０キロベース（及び任意選択で１、５、１０若しくは２０キロベース以下）の欠失を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０若しくは１００又はそれ以上のヌクレオチドの標的部位に置換を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、１～２、２～３、３～４、４～５、５～１０、１０～１５、１５～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０若しくは９０～１００ヌクレオチドの標的部位に置換を生成することができる。

【００８８】

一部の実施形態では、置換は、塩基転位型突然変異である。一部の実施形態では、置換は、トランスバージョン突然変異である。一部の実施形態では、置換は、アデニンをチミンに、アデニンをグアニンに、アデニンをシトシンに、グアニンをチミンに、グアニンをシトシンに、グアニンをアデニンに、チミンをシトシンに、チミンをアデニンに、チミンをグアニンに、シトシンをアデニンに、シトシンをグアニンに、又はシトシンをチミンに変換する。

【００８９】

一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、遺伝子の発現（例えば、転写又は翻訳）を増加又は減少させる。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、プロモータ又はエンハンサー内の配列、例えば転写因子に結合する配列を改変し、付加し、又は欠失させることにより、遺伝子の発現（例えば、転写又は翻訳）を増加又は減少させる。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、遺伝子の翻訳を改変し（例えば、アミノ酸配列を改変し）、開始若しくは停止コドンを挿入するか若しくは欠失させ、遺伝子の翻訳フレームを改変若しくは修復する。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、例えば、スプライスアクセプター又はドナー部位を挿入し、欠失させ、又は改変することにより、遺伝子のスプライシングを改変する。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、転

写物又はタンパク質の半減期を改変する。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、細胞におけるタンパク質局在化を改変する（例えば、細胞質からミトコンドリアにかけて、細胞質から細胞外空間内へ（例えば、分泌タグを付加する））。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、タンパク質フォールディングを改変する（例えば、改善する）（例えば、ミスフォールドタンパク質の蓄積を阻止するため）。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、遺伝子、例えば、遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を改変し、増加させ、減少させる。

【００９０】

例示的な遺伝子組換えポリペプチド、及びそれらを含むシステム及びそれらを使用する方法が、例えば、アミノ酸及びその中の核酸配列を含め、レトロウイルスＲＴドメインに関して参照により本明細書に組み込まれるＰＣＴ／ＵＳ２０２１／０２０９４８号明細書に記載される。

【００９１】

例示的な遺伝子組換えポリペプチド及びレトロウイルスＲＴドメイン配列は、例えば、２０２１年３月４日に出願された国際特許出願番号ＰＣＴ／ＵＳ２１／２０９４８号明細書、例えばその中の表３０、表３１及び表４４にも記載され；この出願全体が例えば前記配列及び表中のレトロウイルスＲＴに関して参照により本明細書に組み込まれる。従って、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドは、この段落に記載された表のいずれかに従うアミノ酸配列又はそのドメイン（例えば、レトロウイルスＲＴドメイン）、又は上記のいずれかのその機能的フラグメント若しくはバリアント、又はそれと少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【００９２】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステムのいずれかにおける使用のためのポリペプチドは、複数の相同タンパク質の整列されたポリペプチド配列に基づく、分子再構築体又は祖先再構築体であり得る。一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステムのいずれかにおける使用のための逆転写酵素ドメインは、分子再構築体若しくは祖先再構築体であり得、又は同じ又は異なる源からの逆転写酵素ドメインのアラインメントに基づいて、特定の残基において修飾され得る。当業者は、本明細書に提供される受入番号に基づき、例えば、保存ドメイン分析のためのＢａｓｉｃ　Ｌｏｃａｌ　Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ　Ｓｅａｒｃｈ　Ｔｏｏｌ（ＢＬＡＳＴ）又はＣＤ－Ｓｅａｒｃｈのような常用の配列分析ツールを使用することにより、ポリペプチド又は核酸配列を整列させることができる。分子再構築体は、配列コンセンサスに基づき、例えば、Ｉｖｉｃｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１９９７，５０１－５１０；Ｗａｇｓｔａｆｆ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ　２０１３，８８－９９に記載の手法を用いて作製され得る。

【００９３】

遺伝子組換えシステムのポリペプチド成分

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＤＮＡ標的部位結合、鋳型核酸（例えば、ＲＮＡ）結合、ＤＮＡ標的部位切断、及び鋳型核酸（例えば、ＲＮＡ）ライティング、例えば、逆転写の機能を有する。一部の実施形態では、各機能は、異なるドメイン内に含まれる。一部の実施形態では、機能は、２つ以上のドメインに起因し得る（例えば、２つ以上のドメインは、一緒に機能性を示す）。一部の実施形態では、２つ以上のドメインは、同一又は類似機能を有し得る（例えば、２つ以上のドメインは、それぞれ独立して、例えば、２つの異なるＤＮＡ配列において、ＤＮＡ結合機能性を有する）。他の実施形態では、１つ又は複数のドメインは、１つ又は複数の機能を実行可能であり、例えば、Ｃａｓ９ドメインは、ＤＮＡ結合及び標的部位切断の両方を実行可能であり得る。一部の実施形態では、ドメインは全て、単一のポリペプチド内部に位置する。一部の実施形態では、第１ドメインは、第１ポリペプチド中に存在し、第２ドメインは、第２ポリペプチド

中に存在する。例えば、一部の実施形態では、配列は、第１ポリペプチドと第２ポリペプチドとの間で分割され得、例えば、第１ポリペプチドは、逆転写酵素（ＲＴ）ドメインを含み、且つ第２ポリペプチドは、ＤＮＡ結合ドメイン及びエンドヌクレアーゼドメイン、例えばニッカーゼドメインを含む。更なる例として、一部の実施形態では、第１ポリペプチド及び第２ポリペプチドのそれぞれは、ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、第１ＤＮＡ結合ドメイン及び第２ＤＮＡ結合ドメイン）を含む。一部の実施形態では、第１及び第２のポリペプチドは、翻訳後、スプリットインテインを介して結合されて、単一の遺伝子組換えポリペプチドを形成し得る。

【００９４】

いくつかの態様では、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドは、（例えば、本明細書に記載されるシステムは、以下を含む遺伝子組換えポリペプチドを含む）：１）Ｃａｓドメイン（例えば、Ｃａｓニッカーゼドメイン、例えばＣａｓ９ニッカーゼドメイン）；２）表Ｄの逆転写酵素（ＲＴ）ドメイン又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列であって、ＲＴドメインが、ＣａｓドメインのＣ末端である、逆転写酵素（ＲＴ）ドメイン；及びＲＴドメインとＣａｓドメインとの間に配置されるリンカーであって、表ＤのＲＴドメインと同じ行からの配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を有する、リンカーを含む。

【００９５】

一部の実施形態では、ＲＴドメインは、表ＤのＲＴドメインとの１００％の同一性を有する配列を有し、リンカーは、表ＤのＲＴドメインと同じ行からのリンカー配列との１００％の同一性を有する配列を有する。一部の実施形態では、Ｃａｓドメインは、表４の配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、配列表中の配列番号１～３３３２のいずれかに従うアミノ酸配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を含む。

【００９６】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、Ｃａｓドメインとリンカーとの間のＧＧアミノ酸配列、ＲＴドメインと第２のＮＬＳとの間のＡＧアミノ酸配列、及び／又はリンカーとＲＴドメインとの間のＧＧアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、第１のＮＬＳ及びＣａｓドメインを含む配列番号４０００の配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、第２のＮＬＳを含む配列番号４００１の配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を含む。

例示的なＮ末端ＮＬＳ－Ｃａｓ９ドメイン

【化１】

MPAAKRVKLDGGDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF
DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHP
IFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV
DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS
LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVN
TEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFY
KFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNR
EKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKN
LPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLK
EDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDR
EMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNF
MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPE
NIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRD
MYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQ
LLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKL
IREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDY
KVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKG
RDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAY
SVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFE
LENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEI
IEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDR
KRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGG(配列番号: 4000)

例示的なＣ末端配列

ＡＧＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＡＫＶＥ（配列番号４００１）

【００９７】

ライティングドメイン

本発明の特定の態様では、遺伝子組換えシステムのライティングドメインは、ポリメラーゼ官能基を用いて、ゲノムＤＮＡに対する修飾を駆動する。ポリメラーゼ官能基は、例えば、核酸鋳型からＤＮＡを合成するＤＮＡポリメラーゼであり得る。核酸鋳型は、例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡであり得る。ＲＮＡ鋳型を使用し得るＤＮＡポリメラーゼ、例えば、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ、例えば、逆転写酵素の場合、遺伝子組換えポリペプチド成分には、上記のものなどの鋳型ＲＮＡが提供され得る。１つのこのような例は、ＤＮＡポリメラーゼθ（ＰＯＬＱによってコードされる、本明細書において「ＰＯＬＱ」又は「Ｐｏｌθ」と呼ばれ得るポリペプチド産物））、鋳型としてＤＮＡ又はＲＮＡのいずれかを使用することが示されている真核生物ＤＮＡポリメラーゼである。Ｃｈａｎｄｒａｍｏｕｌｙ　ｅｔ　ａｌ．２０２１（ＤＯＩ：１０．１１２６／ｓｃｉａｄｖ．ａｂｆ１７７１）。従って、（任意選択でリンカーを介して）ＰＯＬＱ（又はＰＯＬＱの構成要素）に融合されるＣａｓ９官能基は、（ｇＲＮＡスペーサーを介して）修飾に望ましいゲノム部位を標的とする鋳型ＲＮＡと共に生物又は細胞に投与されるとき、ゲノム修飾のためのドライバーとして使用され得、（ｇＲＮＡスカフォールドを介して）Ｃａｓ９官能基を動員し、（鋳型ＲＮＡを介して）ＤＮＡ合成をプライム及び鋳型化する。

【００９８】

鋳型としてＤＮＡを使用するＤＮＡポリメラーゼは、ゲノム修飾を行うためにＣａｓ９官能基と一緒にも融合に組み込まれ得る。この場合、鋳型核酸は、共有結合又はリンカーによって互いに末端間で結合される、ｓｇＲＮＡ及びＤＮＡ鋳型の融合である。ｐｏｌθ（又はその構成要素）も、ＤＮＡ鋳型からＤＮＡを合成し得るため、このように機能し得

る。本明細書に記載されるように、鋳型ＲＮＡに言及する実施形態は、リボヌクレオチドを含む鋳型核酸、又はリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドを含む鋳型核酸（例えば、１つ又は複数のＤＮＡ領域に結合された１つ又は複数のＲＮＡ領域を含む鋳型ＲＮＡ）を含み得ることが理解される。一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドは、表１に従うアミノ酸配列又はそれと少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を有するポリメラーゼドメインを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸は、表１に従うアミノ酸配列又はそれと少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を有するポリメラーゼドメインをコードする。

【００９９】

本明細書に記載されるように、逆転写酵素又は逆転写酵素ドメインに言及する実施形態は、表１に列挙されるポリメラーゼを含み得ることが理解される。

【０１００】

【表１－１】

表1: ゲノム改変ポリペプチドにおける使用のための例示的なポリメラーゼ。

行	Pol	配列	長さ
1	イータ (η)	MATGQDRVVALVDMDCFFVQVEQRQNPHLRNKPCAVVQYKSWKGGGIIAVSYEARAFGVTRSMWADDAKKLCPDLLLAQVRESR GKANLTKYREASVEVMEIMSRFAVIERASIDEAYVDLTSAVQERLQKLQGQPISADLLPSTYIEGLPQGPTTAEETVQKEGMRKQGLF QWLDSLQIDNLTSPDLQLTVGAVIVEEMRAAIERETGFQCSAGISHNKVLAKLACGLNKPNRQTLVSHGSVPQLFSQMPIRKIRSLGG KLGASVIEILGIEYMGELTQFTESQLQSHFGEKNGSWLYAMCRGIEHDPVKPRQLPKTIGCSKNFPGKTALATREQVQWWLLQLAQ ELEERLTKDRNDNDRVATQLVVSIRVQGDKRLSSLRRCCALTRYDAHKMSHDAFTVIKNCNTSGIQTEWSPPLTMLFLCATKFSASA PSSSTDITSFLSSDPSSLPKVPVTSSEAKTQGSGPAVTATKKATTSLESFFQKAAERQKVKEASLSSLTAPTQAPMSNSPSKPSLPF QTSQSTGTEPFFKQKSLLLKQKQLNNSSVSSPQQNPWSNCKALPNSLPTEYPGCVPVCEGVSKLEESSKATPAEMDLAHNSQSM HASSASKSVLEVTQKATPNPSLLAAEDQVPCEKCGSLVPVWDMPEHMDYHFALELQKSFLQPHSSNPQVVSAVSHQGKRNPKSPL ACTNKRPRPEGMQTLESFFKPLTH	713
2	イオタ (ι)	MEKLGVEPEEEGGGDDDEEDAEAWAMELADVGAAASSQGVHDQVLPTPNASSRVIVHVDLDCFYAQVEMISNPELKDKPLGVQQ KYLVVTCNYEARKLGVKKLMNVRDAKEKCPQLVLVNGEDLTRYREMSYKVTELLEEFSPVVERLGFDENFVDLTEMVEKRLQQLQS DELSAVTVSGHVYNNQSINLLDVLHIRLLVGSQIAAEMREAMYNQLGLTGCAGVASNKLLAKLVSGVFKPNQQTVLLPESCQHLIHSL NHIKEIPGIGYKTAKCLEALGINSVRDLQTFSPKILEKELGISVAQRIQKLSFGEDNSPVILSGPPQSFSEEDSFKKCSSEVEAKNKIEEL LASLLNRVCQDGRKPHTVRLIIRRYSSEKHYGRESRQCPIPSHVIQKLGTGNYDVMTPMVDILMKLFRNMVNVKMPFHLTLLSVCFC NLKALNTAKKGLIDYYLMPSLSTTSRSGKHSFKMKDTHMEDFPKDKETNRDFLPSGRIESTRTRESPLDTTNFSKEKDINEFPLCSLP EGVDQEVFKQLPVDIQEEILSGKSREKFQGKGSVSCPLHASRGVLSFFSKKQMQDIPINPRDHLSSSKQVSSVSPCEPGTSGFNSS SSSYMSSQKDYSYYLDNRLKDERISQGPKEPQGFHFTNSNPAVSAFHSFPNLQSEQLFSRNHTTDSHKQTVATDSHEGLTENREP DSVDEKITFPSDIDPQVFYELPEAVQKELLAEWKRAGSDFHIGHK	740

【０１０１】

【表１－２】

行	Pol	配列	長さ
3	カッパ (κ)	MDSTKEKCDSYKDDLLLRMGLNDNKAGMEGLDKEKINKIIMEATKGSRFYGNELKKEKQVNQRIENMMQQKAQITSQQLRKAQLQV DRFAMELEQSRNLSNTIVHIDMDAFYAAVEMRDNPELKDKPIAVGSMSMLSTSNYHARRFGVRAAMPGFIAKRLCPQLIIVPPNFDK YRAVSKEVKEILADYDPNFMAMSLDEAYLNITKHLEERQNWPEDKRRYFIKMGSSVENDNPGKEVNKLSEHERSISPLLFEESPSDV QPPGDPFQVNFEEQNNPQILQNSVVFGTSAQEVVKEIRFRIEQKTTLTASAGIAPNTMLAKVCSDKNKPNGQYQILPNRQAVMDFIK DLPIRKVSGIGKVTEKMLKALGIITCTELYQQRALLSLLFSETSWHYFLHISLGLGSTHLTRDGERKSMSVERTFSEINKAEEQYSLCQ ELCSELAQDLQKERLKGRTVTIKLKNVNFEVKTRASTVSSVVSTAEEIFAIAKELLKTEIDADFPHPLRLRLMGVRISSFPNEEDRKHQ QRSIIGFLQAGNQALSATECTLEKTDKDKFVKPLEMSHKKSFFDKKRSERKWSHQDTFKCEAVNKQSFQTSQPFQVLKKKMNENLE ISENSDDCQILTCPVCFRAQGCISLEALNKHVDECLDGPSISENFKMFSCSHVSATKVNKKENVPASSLCEKQDYEAHPKIKEISSVD CIALVDTIDNSSKAESIDALSNKHSKEECSSLPSKSFNIEHCHQNSSSTVSLENEDVGSFRQEYRQPYLCEVKTGQALVCPVCNVEQ KTSDLTLFNVHVDVCLNKSFIQELRKDKFNPVNQPKESSRSTGSSSGVQKAVTRTKRPGLMTKYSTSKKIKPNNPKHTLDIFFK	870
4	REV1	MRRGGWRKRAENDGWETWGGYMAAKVQKLEEQFRSDAAMQKDGTSSTIFSGVAIYVNGYTDPSAEELRKLMMLHGGQYHVYYS RSKTTHIIATNLPNAKIKELKGEKVIRPEWIVESIKAGRLLSYIPYQLYTKQSSVQKGLSFNPVCRPEDPLPGPSNIAKQLNNRVNHIVK KIETENEVKVNGMNSWNEEDENNDFSFVDLEQTSPGRKQNGIPHPRGSTAIFNGHTPSSNGALKTQDCLVPMVNSVASRLSPAFS QEEDKAEKSSTDFRDCTLQQLQQSTRNTDALRNPHRTNSFSLSPLHSNTKINGAHHSTVQGPSSTKSTSSVSTFSKAAPSVPSKPS DCNFISNFYSHSRLHHISMWKCELTEFVNTLQRQSNGIFPGREKLKKMKTGRSALVVTDTGDMSVLNSPRHQSCIMHVDMDCFFVS VGIRNRPDLKGKPVAVTSNRGTGRAPLRPGANPQLEWQYYQNKILKGKAADIPDSSLWENPDSAQANGIDSVLSRAEIASCSYEAR QLGIKNGMFFGHAKQLCPNLQAVPYDFHAYKEVAQTLYETLASYTHNIEAVSCDEALVDITEILAETKLTPDEFANAVRMEIKDQTKC AASVGIGSNILLARMATRKAKPDGQYHLKPEEVDDFIRCQLVTNLPGVGHSMESKLASLGIKTCGDLQYMTMAKLQKEFGPKTGQM LYRFCRGLDDRPVRTEKERKSVSAEINYGIRFTQPKEAEAFLLSLSEEIQRRLEATGMKGKRLTLKIMVRKPGAPVETAKFGGHGICD NIARTVTLDQATDNAKIIGKAMLNMFHTMKLNISDMRGVGIHVNQLVPTNLNPSTCPSRPSVQSSHFPSGSYSVRDVFQVQKAKKST EEEEHKEVFRAAVDLEISSASRTCTFLPPFPAHLPTSPDTNKAESSGKWNGLHTPVSVQSRLNLSIEVPSPSQLDQSVLEALPPDLRE QVEQVCAVQQAESHGDKKKEPVNGCNTGILPQPVGTVLLQIPEPQESNSDAGINLIALPAFSQVDPEVFAALPAELQRELKAAYDQR QRQGENSTHQQSASASVPKNPLLHLKAAVKEKKRNKKKKTIGSPKRIQSPLNNKLLNSPAKTLPGACGSPQKLIDGFLKHEGPPAEK PLEELSASTSGVPGLSSLQSDPAGCVRPPAPNLAGAVEFNDVKTLLREWITTISDPMEEDILQVVKYCTDLIEEKDLEKLDLVIKYMKR LMQQSVESVWNMAFDFILDNVQVVLQQTYGSTLKVT	1251
5	ベータ (β)	MSKRKAPQETLNGGITDMLTELANFEKNVSQAIHKYNAYRKAASVIAKYPHKIKSGAEAKKLPGVGTKIAEKIDEFLATGKLRKLEKIR QDDTSSSINFLTRVSGIGPSAARKFVDEGIKTLEDLRKNEDKLNHHQRIGLKYFGDFEKRIPREEMLQMQDIVLNEVKKVDSEYIATV CGSFRRGAESSGDMDVLLTHPSFTSESTKQPKLLHQVVEQLQKVHFITDTLSKGETKFMGVCQLPSKNDEKEYPHRRIDIRLIPKDQ YYCGVLYFTGSDIFNKNMRAHALEKGFTINEYTIRPLGVTGVAGEPLPVDSEKDIFDYIQWKYREPKDRSE	335
6	ラムダ (λ)	MDPRGILKAFPKRQKIHADASSKVLAKIPRREEGEEAEEWLSSLRAHVVRTGIGRARAELFEKQIVQHGGQLCPAQGPGVTHIVVDE GMDYERALRLLRLPQLPPGAQLVKSAWLSLCLQERRLVDVAGFSIFIPSRYLDHPQPSKAEQDASIPPGTHEALLQTALSPPPPPTR PVSPPQKAKEAPNTQAQPISDDEASDGEETQVSAADLEALISGHYPTSLEGDCEPSPAPAVLDKWVCAQPSSQKATNHNLHITEKL EVLAKAYSVQGDKWRALGYAKAINALKSFHKPVTSYQEACSIPGIGKRMAEKIIEILESGHLRKLDHISESVPVLELFSNIWGAGTKTA QMWYQQGFRSLEDIRSQASLTTQQAIGLKHYSDFLERMPREEATEIEQTVQKAAQAFNSGLLCVACGSYRRGKATCGDVDVLITHP DGRSHRGIFSRLLDSLRQEGFLTDDLVSQEENGQQQKYLGVCRLPGPGRRHRRLDIIVVPYSEFACALLYFTGSAHFNRSMRALAK TKGMSLSEHALSTAVVRNTHGCKVGPGRVLPTPTEKDVFRLLGLPYREPAERDW	575
7	ミュー (μ)	MLPKRRRARVGSPSGDAASSTPPSTRFPGVAIYLVEPRMGRSRRAFLTGLARSKGFRVLDACSSEATHVVMEETSAEEAVSWQER RMAAAPPGCTPPALLDISWLTESLGAGQPVPVECRHRLEVAGPRKGPLSPAWMPAYACQRPTPLTHHNTGLSEALEILAEAAGFEG SEGRLLTFCRAASVLKALPSPVTTLSQLQGLPHFGEHSSRVVQELLEHGVCEEVERVRRSERYQTMKLFTQIFGVGVKTADRWYRE GLRTLDDLREQPQKLTQQQKAGLQHHQDLSTPVLRSDVDALQQVVEEAVGQALPGATVTLTGGFRRGKLQGHDVDFLITHPKEGQ EAGLLPRVMCRLQDQGLILYHQHQHSCCESPTRLAQQSHMDAFERSFCIFRLPQPPGAAVGGSTRPCPSWKAVRVDLVVAPVSQF PFALLGWTGSKLFQRELRRFSRKEKGLWLNSHGLFDPEQKTFFQAASEEDIFRHLGLEYLPPEQRNA	494
8	TdT	MDPPRASHLSPRKKRPRQTGALMASSPQDIKFQDLVVFILEKKMGTTRRAFLMELARRKGFRVENELSDSVTHIVAENNSGSDVLE WLQAQKVQVSSQPELLDVSWLIECIRAGKPVEMTGKHQLVVRRDYSDSTNPGPPKTPPIAVQKISQYACQRRTTLNNCNQIFTDAF DILAENCEFRENEDSCVTFMRAASVLKSLPFTIISMKDTEGIPCLGSKVKGIIEEIIEDGESSEVKAVLNDERYQSFKLFTSVFGVGLKT	509

【０１０２】

【表１－３】

行	Pol	配列	長さ
		SEKWFRMGFRTLSKVRSDKSLKFTRMQKAGFLYYEDLVSCVTRAEAEAVSVLVKEAVWAFLPDAFVTMTGGFRRGKKMGHDVDF LITSPGSTEDEEQLLQKVMNLWEKKGLLLYYDLVESTFEKLRLPSRKVDALDHFQKCFLIFKLPRQRVDSDQSSWQEGKTWKAIRVD LVLCPYERRAFALLGWTGSRQFERDLRRYATHERKMILDNHALYDKTKRIFLKAESEEEIFAHLGLDYIEPWERNA	
9	シータ (θ)	MNLLRRSGKRRRSESGSDSFSGSGGDSSASPQFLSGSVLSPPPGLGRCLKAAAAGECKPTVPDYERDKLLLANWGLPKAVLEKYH SFGVKKMFEWQAECLLLGQVLEGKNLVYSAPTSAGKTLVAELLILKRVLEMRKKALFILPFVSVAKEKKYYLQSLFQEVGIKVDGYMG STSPSRHFSSLDIAVCTIERANGLINRLIEENKMDLLGMVVVDELHMLGDSHRGYLLELLLTKICYITRKSASCQADLASSLSNAVQIVG MSATLPNLELVASWLNAELYHTDFRPVPLLESVKVGNSIYDSSMKLVREFEPMLQVKGDEDHVVSLCYETICDNHSVLLFCPSKKW CEKLADIIAREFYNLHHQAEGLVKPSECPPVILEQKELLEVMDQLRRLPSGLDSVLQKTVPWGVAFHHAGLTFEERDIIEGAFRQGLI RVLAATSTLSSGVNLPARRVIIRTPIFGGRPLDILTYKQMVGRAGRKGVDTVGESILICKNSEKSKGIALLQGSLKPVRSCLQRREGEE VTGSMIRAILEIIVGGVASTSQDMHTYAACTFLAASMKEGKQGIQRNQESVQLGAIEACVMWLLENEFIQSTEASDGTEGKVYHPTH LGSATLSSSLSPADTLDIFADLQRAMKGFVLENDLHILYLVTPMFEDWTTIDWYRFFCLWEKLPTSMKRVAELVGVEEGFLARCVKG KVVARTERQHRQMAIHKRFFTSLVLLDLISEVPLREINQKYGCNRGQIQSLQQSAAVYAGMITVFSNRLGWHNMELLLSQFQKRLTF GIQRELCDLVRVSLLNAQRARVLYASGFHTVADLARANIVEVEVILKNAVPFKSARKAVDEEEEAVEERRNMRTIWVTGRKGLTERE AAALIVEEARMILQQDLVEMGVQWNPCALLHSSTCSLTHSESEVKEHTFISQTKSSYKKLTSKNKSNTIFSDSYIKHSPNIVQDLNKSR EHTSSFNCNFQNGNQEHQTCSIFRARKRASLDINKEKPGASQNEGKTSDKKVVQTFSQKTKKAPLNFNSEKMSRSFRSWKRRKHL KRSRDSSPLKDSGACRIHLQGQTLSNPSLCEDPFTLDEKKTEFRNSGPFAKNVSLSGKEKDNKTSFPLQIKQNCSWNITLTNDNFVE HIVTGSQSKNVTCQATSVVSEKGRGVAVEAEKINEVLIQNGSKNQNVYMKHHDIHPINQYLRKQSHEQTSTITKQKNIIERQMPCEAV SSYINRDSNVTINCERIKLNTEENKPSHFQALGDCISRTVIPSEVLPSAGAFSKSEGQHENFLNISRLQEKTGTYTTNKTKNNHVSDLG LVLCDFEDSFYLDTQSEKIIQQMATENAKLGAKDTNLAAGIMQKSLVQQNSMNSFQKECHIPFPAEQHPLGATKIDHLDLKTVGTMK QSSDSHGVDILTPESPIFHSPILLEENGLFLKKNEVSVTDSQLNSFLQGYQTQETVKPVILLIPQKRTPTGVEGECLPVPETSLNMSDS LLFDSFSDDYLVKEQLPDMQMKEPLPSEVTSNHFSDSLCLQEDLIKKSNVNENQDTHQQLTCSNDESIIFSEMDSVQMVEALDNVDI FPVQEKNHTVVSPRALELSDPVLDEHHQGDQDGGDQDERAEKSKLTGTRQNHSFIWSGASFDLSPGLQRILDKVSSPLENEKLKS MTINFSSLNRKNTELNEEQEVISNLETKQVQGISFSSNNEVKSKIEMLENNANHDETSSLLPRKESNIVDDNGLIPPTPIPTSASKLTFP GILETPVNPWKTNNVLQPGESYLFGSPSDIKNHDLSPGSRNGFKDNSPISDTSFSLQLSQDGLQLTPASSSSESLSIIDVASDQNLFQ TFIKEWRCKKRFSISLACEKIRSLTSSKTATIGSRFKQASSPQEIPIRDDGFPIKGCDDTLVVGLAVCWGGRDAYYFSLQKEQKHSEIS ASLVPPSLDPSLTLKDRMWYLQSCLRKESDKECSVVIYDFIQSYKILLLSCGISLEQSYEDPKVACWLLDPDSQEPTLHSIVTSFLPHE LPLLEGMETSQGIQSLGLNAGSEHSGRYRASVESILIFNSMNQLNSLLQKENLQDVFRKVEMPSQYCLALLELNGIGFSTAECESQK HIMQAKLDAIETQAYQLAGHSFSFTSSDDIAEVLFLELKLPPNREMKNQGSKKTLGSTRRGIDNGRKLRLGRQFSTSKDVLNKLKALH PLPGLILEWRRITNAITKVVFPLQREKCLNPFLGMERIYPVSQSHTATGRITFTEPNIQNVPRDFEIKMPTLVGESPPSQAVGKGLLPM GRGKYKKGFSVNPRCQAQMEERAADRGMPFSISMRHAFVPFPGGSILAADYSQLELRILAHLSHDRRLIQVLNTGADVFRSIAAEW KMIEPESVGDDLRQQAKQICYGIIYGMGAKSLGEQMGIKENDAACYIDSFKSRYTGINQFMTETVKNCKRDGFVQTILGRRRYLPGIK DNNPYRKAHAERQAINTIVQGSAADIVKIATVNIQKQLETFHSTFKSHGHREGMLQSDQTGLSRKRKLQGMFCPIRGGFFILQLHDEL LYEVAEEDVVQVAQIVKNEMESAVKLSVKLKVKVKIGASWGELKDFDV	
10	ニュー (ν)	MENYEALVGFDLCNTPLSSVAQKIMSAMHSGDLVDSKTWGKSTETMEVINKSSVKYSVQLEDRKTQSPEKKDLKSLRSQTSRGSA KLSPQSFSVRLTDQLSADQKQKSISSLTLSSCLIPQYNQEASVLQKKGHKRKHFLMENINNENKGSINLKRKHITYNNLSEKTSKQMA LEEDTDDAEGYLNSGNSGALKKHFCDIRHLDDWAKSQLIEMLKQAAALVITVMYTDGSTQLGADQTPVSSVRGIVVLVKRQAEGGH GCPDAPACGPVLEGFVSDDPCIYIQIEHSAIWDQEQEAHQQFARNVLFQTMKCKCPVICFNAKDFVRIVLQFFGNDGSWKHVADFIG LDPRIAAWLIDPSDATPSFEDLVEKYCEKSITVKVNSTYGNSSRNIVNQNVRENLKTLYRLTMDLCSKLKDYGLWQLFRTLELPLIPIL AVMESHAIQVNKEEMEKTSALLGARLKELEQEAHFVAGERFLITSNNQLREILFGKLKLHLLSQRNSLPRTGLQKYPSTSEAVLNALR DLHPLPKIILEYRQVHKIKSTFVDGLLACMKKGSISSTWNQTGTVTGRLSAKHPNIQGISKHPIQITTPKNFKGKEDKILTISPRAMFVS SKGHTFLAADFSQIELRILTHLSGDPELLKLFQESERDDVFSTLTSQWKDVPVEQVTHADREQTKKVVYAVVYGAGKERLAACLGVP IQEAAQFLESFLQKYKKIKDFARAAIAQCHQTGCVVSIMGRRRPLPRIHAHDQQLRAQAERQAVNFVVQGSAADLCKLAMIHVFTAV AASHTLTARLVAQIHDELLFEVEDPQIPECAALVRRTMESLEQVQALELQLQVPLKVSLSAGRSWGHLVPLQEAWGPPPGPCRTES PSNSLAAPGSPASTQPPPLHFSPSFCL	

【０１０３】

【表１ａ】

表 1a: 表 1 に列記されるポリメラーゼの特性

行	ファミリー	Pol	宿主	遺伝子記号	UniProt 受託番号	UniProt 名	触媒サブユニット質量 (kDa)	更なるサブユニット	生物学的経路	鋳型核酸
1	Y	イータ (η)	ヒト (Homo sapiens)	POLH	Q9Y253	POLH_HUMAN	78	モノマー	TLS	
2	Y	イオタ (ι)	ヒト (Homo sapiens)	POLI	Q9UNA4	POLI_HUMAN	80	モノマー	TLS	
3	Y	カッパ (κ)	ヒト (Homo sapiens)	POLK	Q9UBT6	POLK_HUMAN	76	モノマー	TLS	
4	Y	REV1	ヒト (Homo sapiens)	REV1	Q9UBZ9	REV1_HUMAN	138	モノマー	TLS	
5	X	ベータ (β)	ヒト (Homo sapiens)	POLB	P06746	DPOLB_HUMAN	39	モノマー	BER	
6	X	ラムダ (λ)	ヒト (Homo sapiens)	POLL	Q9UGP5	DPOLL_HUMAN	66	モノマー	BER, NHEJ, TLS	
7	X	ミュー (μ)	ヒト (Homo sapiens)	POLM	Q9NP87	DPOLM_HUMAN	55	モノマー	NHEJ, V(D)J	
8	X	TdT	ヒト (Homo sapiens)	DNTT	P04053	TDT_HUMAN	56	モノマー	V(D)J	鋳型非依存的
9	A	シータ (θ)	ヒト (Homo sapiens)	POLQ	O75417	DPOLQ_HUMAN	290	モノマー	TLS, MMEJ, RTDR	DNA 及び/又は RNA
10	A	ニュー (ν)	ヒト (Homo sapiens)	POLN	Q7Z5Q5	DPOLN_HUMAN	100	モノマー	ICL 修復	

生物学的経路について、TLS = 損傷乗り越え合成; BER = 塩基除去修復; NHEJ = 非相同末端結合; V(D)J = V(D)J 組換えプロセス; MMEJ = マイクロホモロジー媒介末端結合; RTDR = RNA 鋳型化 DNA 修復。

【０１０４】

本発明の特定の態様では、遺伝子組換えシステムのライティングドメインは、逆転写酵素活性を有し、逆転写酵素ドメイン（ＲＴドメイン）とも称される。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、ＲＴ触媒部分、ＲＮＡ結合領域（例えば、鋳型ＲＮＡに結合する領域）を含む。

【０１０５】

一部の実施形態では、逆転写酵素をコードする核酸は、例えばヒト細胞について改善された、改変されたコドン使用を有するように、その天然配列から改変される。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、レトロウイルスからの異種の逆転写酵素である。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドを含むＲＴドメインは、その元のアミノ酸配列から突然変異されている、例えば、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０若しくは１００の置換を有する。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、レトロウイルスのＲＴ、例えば、ＨＩＶ－１ＲＴ、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍｏｌｏｎｅｙ Ｍｕｒｉｎｅ Ｌｅｕｋｅｍｉａ Ｖｉｒｕｓ）（ＭＭＬＶ）ＲＴ、トリ骨髄芽球症ウイルス（ａｖｉａｎ ｍｙｅｌｏｂｌａｓｔｏｓｉｓ ｖｉｒｕｓ）（ＡＭＶ）ＲＴ、又はラウス肉腫ウイルス（Ｒｏｕｓ Ｓａｒｃｏｍａ Ｖｉｒｕｓ）（ＲＳＶ）ＲＴに由来する。

【０１０６】
一部の実施形態では、レトロウイルス逆転写酵素（ＲＴ）ドメインは、ターゲットプライム逆転写（ＴＰＲＴ）開始の、例えば内因性ＲＴドメインと比較して増加したストリンジェンシーを示す。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、第１の鎖ニックの直ぐ上流の標的部位内の３ｎｔ、例えばＲＮＡ鋳型をプライムするゲノムＤＮＡが、ＲＮＡ鋳型中の相同性の３ｎｔに対して少なくとも６６％若しくは１００％の相補性を有するとき、ＴＰＲＴを開始する。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、鋳型ＲＮＡの相同性と標的ＤＮＡプライミング逆転写との間で５ｎｔ未満が一致しない（例えば、１、２、３、４又は５ｎｔ未満が一致しない）とき、ＴＰＲＴを開始する。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、ＴＰＲＴ反応のプライミングでのミスマッチにおけるストリンジェンシーが増加するように修飾され、例えば、ＲＴドメインは、野生型（例えば、非修飾）ＲＴドメインと比較して、プライミング領域内でのミスマッチを全く許容しないか、又はミスマッチをより少なければ許容する。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、ＨＩＶ－１　ＲＴドメインを含む。複数の実施形態では、ＨＩＶ－１　ＲＴドメインは、代替的なＲＴドメイン（例えば、Ｊａｍｂｕｒｕｔｈｕｇｏｄａ　ａｎｄ　Ｅｉｃｋｂｕｓｈ　Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　４０７（５）：６６１－６７２（２０１１）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）によって記載のとおり）と比較して、３つのヌクレオチドミスマッチであっても、より低いレベルで合成を開始する。

【０１０７】
一部の実施形態では、ＲＴドメインは、二量体（例えば、ヘテロ二量体又はホモ二量体）を形成する。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、単量体である。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、天然には単量体又は二量体（例えば、ヘテロ二量体又はホモ二量体）として機能する。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、天然には単量体として機能する、例えば、単量体として機能するウイルスに由来する。複数の実施形態では、ＲＴドメインは、マウス白血病ウイルス（ｍｕｒｉｎｅ　ｌｅｕｋｅｍｉａ　ｖｉｒｕｓ）（ＭＬＶ；時としてＭｏＭＬＶと称される）（例えば、Ｐ０３３５５）、ブタ内因性レトロウイルス（ｐｏｒｃｉｎｅ　ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓ　ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）（ＰＥＲＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｑ４ＶＦＺ２）、マウス乳腺腫瘍ウイルス（ｍｏｕｓｅ　ｍａｍｍａｒｙ　ｔｕｍｏｒ　ｖｉｒｕｓ）（ＭＭＴＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０３３６５）、マソン・ファイザー・サルウイルス（Ｍａｓｏｎ－Ｐｆｉｚｅｒ　ｍｏｎｋｅｙ　ｖｉｒｕｓ）（ＭＰＭＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０７５７２）、ウシ白血病ウイルス（ｂｏｖｉｎｅ　ｌｅｕｋｅｍｉａ　ｖｉｒｕｓ）（ＢＬＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０３３６１）、ヒトＴ細胞白血病ウイルス－１（ｈｕｍａｎ　Ｔ－ｃｅｌｌ　ｌｅｕｋｅｍｉａ　ｖｉｒｕｓ－１）（ＨＴＬＶ－１）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０３３６２）、ヒト泡沫状ウイルス（ｈｕｍａｎ　ｆｏａｍｙ　ｖｉｒｕｓ）（ＨＦＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１４３５０）、サル泡沫状ウイルス（ｓｉｍｉａｎ　ｆｏａｍｙ　ｖｉｒｕｓ）（ＳＦＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ２３０７４）若しくはウシ泡沫状／シンシチウムウイルス（ｂｏｖｉｎｅ　ｆｏａｍｙ／ｓｙｎｃｙｔｉａｌ　ｖｉｒｕｓ）（ＢＦＶ／ＢＳＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｏ４１８９４）、又はその機能性断片若しくは変異体（例えば、それと少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列）からのＲＴドメインから選択される。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、その天然機能性において二量体である。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、二量体として機能するウイルスに由来する。複数の実施形態では、ＲＴドメインは、トリ肉腫／白血病ウイルス（ａｖｉａｎ　ｓａｒｃｏｍａ／ｌｅｕｋｅｍｉａ　ｖｉｒｕｓ）（ＡＳＬＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ａ０Ａ１４２ＢＫＨ１）、ラウス肉腫ウイルス（Ｒｏｕｓ　ｓａｒｃｏｍａ　ｖｉｒｕｓ）（ＲＳＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０３３５４）、トリ骨髄芽球症ウイルス（ａｖｉａｎ　ｍｙｅｌｏｂｌａｓｔｏｓｉｓ　ｖｉｒｕｓ）（ＡＭＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｑ８３１３３）、ヒト免疫不全ウイルスＩ型（ｈｕｍａｎ　ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ　ｖｉｒｕｓ　ｔｙｐｅ　Ｉ）（ＨＩＶ－１）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０３３６９）、ヒ

ト免疫不全ウイルスＩＩ型（ｈｕｍａｎ ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｖｉｒｕｓ ｔｙｐｅ ＩＩ）（ＨＩＶ－２）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ Ｐ１５８３３）、サル免疫不全ウイルス（ｓｉｍｉａｎ ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｖｉｒｕｓ）（ＳＩＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ Ｐ０５８９６）、ウシ免疫不全ウイルス（ｂｏｖｉｎｅ ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｖｉｒｕｓ）（ＢＩＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ Ｐ１９５６０）、ウマ感染性貧血ウイルス（ｅｑｕｉｎｅ ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ ａｎｅｍｉａ ｖｉｒｕｓ）（ＥＩＡＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ Ｐ０３３７１）、又はネコ免疫不全ウイルス（ｆｅｌｉｎｅ ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｖｉｒｕｓ）（ＦＩＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ Ｐ１６０８８）（Ｈｅｒｓｃｈｈｏｒｎ ａｎｄ Ｈｉｚｉ Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ ６７（１６）：２７１７－２７４７（２０１０））、又はその機能性断片若しくは変異体（例えば、それと少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列）からのＲＴドメインから選択される。天然には、ヘテロ二量体ＲＴドメインは、一部の実施形態では、ホモ二量体として機能的でもあり得る。一部の実施形態では、二量体ＲＴドメインは、融合タンパク質として、例えば、ホモ二量体融合タンパク質又はヘテロ二量体融合タンパク質として発現される。一部の実施形態では、システムのＲＴ機能は、（例えば、本明細書に記載のような）複数のＲＴドメインによって満たされる。更なる実施形態では、複数のＲＴドメインは、融合されるか又は分かれており、例えば、同じポリペプチド上又は異なるポリペプチド上に存在し得る。

【０１０８】

一部の実施形態では、本明細書に記載の遺伝子組換えシステムは、インテグラーゼドメインを含み、例えば、インテグラーゼドメインは、ＲＴドメインの一部であり得る。一部の実施形態では、ＲＴドメイン（例えば、本明細書に記載される）は、インテグラーゼドメインを含む。一部の実施形態では、ＲＴドメイン（例えば、本明細書に記載される）は、インテグラーゼドメインを欠いており、又は突然変異若しくは欠失によって不活性化されているインテグラーゼドメインを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の遺伝子組換えシステムは、リボヌクレアーゼＨドメインを含み、例えば、リボヌクレアーゼＨドメインは、ＲＴドメインの一部であり得る。一部の実施形態では、ＲＮａｓｅ Ｈドメインは、ＲＴドメインの一部ではなく、フレキシブルリンカーを介して共有結合的に連結される。一部の実施形態では、ＲＴドメイン（例えば、本明細書に記載される）は、リボヌクレアーゼＨドメイン、例えば、内因性リボヌクレアーゼＨドメイン又は異種リボヌクレアーゼＨドメインを含む。一部の実施形態では、ＲＴドメイン（例えば、本明細書に記載される）は、リボヌクレアーゼＨドメインを欠いている。一部の実施形態では、ＲＴドメイン（例えば、本明細書に記載される）は、異種リボヌクレアーゼＨドメインに対して、付加、欠失、突然変異、又は交換されているリボヌクレアーゼＨドメインを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、不活性化内因性ＲＮａｓｅ Ｈドメインを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドの他のドメインの１つからの内因性ＲＮａｓｅ Ｈドメインは、それがポリペプチドに含まれないように遺伝子的に除去され、例えば、内因性ＲＮａｓｅ Ｈドメインは、ドメインを含むポリペプチドから部分的に又は完全に切断される。一部の実施形態では、リボヌクレアーゼＨドメインの突然変異は、例えば、Ｋｏｔｅｗｉｃｚ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ １６（１）：２６５－２７７（１９８８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）における方法による測定として、例えば、突然変異を有しない他の類似ドメインと比較して、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％若しくは９０％だけより低い、より低いリボヌクレアーゼ活性を示すポリペプチドを生成する。一部の実施形態では、リボヌクレアーゼＨ活性は、消失する。

【０１０９】

一部の実施形態では、ＲＴドメインは、突然変異を受け、突然変異を有しない他の類似ドメインと比較して忠実度が増加する。例えば、一部の実施形態では、ＲＴドメイン内（例えば、逆転写酵素中）のＹＡＤＤ又はＹＭＤＤモチーフは、ＹＶＤＤと置換される。複

数の実施形態では、ＹＡＤＤ、又はＹＭＤＤ、又はＹＶＤＤの置換は、レトロウイルス逆転写酵素活性において、より高い忠実度をもたらす（例えば、Ｊａｍｂｕｒｕｔｈｕｇｏｄａ ａｎｄ Ｅｉｃｋｂｕｓｈ Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２０１１に記載される；その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０１１０】

一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドは、表２に従うアミノ酸配列又はそれと少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を有するＲＴドメインを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸は、表２に従うアミノ酸配列又はそれと少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を有するＲＴドメインをコードする。

【０１１１】

【表２－１】

表2: レトロウイルスからの例示的な逆転写酵素ドメイン

RT名	RTアミノ酸配列
AVIRE_P03360	TAPLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALPVRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLP VRKSGTSEYRMVQDLREVNKRVETIHPTVPNPYTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDAFFCIPLAPESQLIFAFEWADAEEGESGQLTWTRLPQGFKNSPT LFDEALNRDLQGFRLDHPSVSLLQYVDDLLIAADTQAACLSATRDLLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQAILQIPVPK TKRQVREFLGTIGYCRLWIPGFAELAQPLYAATRGGNDPLVWGEKEEEAFQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKR PVAYLSKRLDPVAAGWPRCLRAIAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPPDKWLTNARITQYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETD DTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTDQPLAQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSVIWAEPLPIGTSAQKAELIALTKALEWSKDKSVNIYTDSRY AFATLHVHGMIYRERGLLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPKRVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATIS
AVIRE_P03360_3mut	TAPLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALPVRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLP VRKSGTSEYRMVQDLREVNKRVETIHPTVPNPYTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDAFFCIPLAPESQLIFAFEWADAEEGESGQLTWTRLPQGFKNSPT LFNEALNRDLQGFRLDHPSVSLLQYVDDLLIAADTQAACLSATRDLLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQAILQIPVPK TKRQVREFLGTIGYCRLWIPGFAELAQPLYAATRPGNDPLVWGEKEEEAFQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKR PVAYLSKRLDPVAAGWPRCLRAIAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPPDKWLTNARITQYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETD DTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTDQPLAQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSVIWAEPLPIGTSAQKAELIALTKALEWSKDKSVNIYTDSRY AFATLHVHGMIYRERGWLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPKRVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATIS
AVIRE_P03360_3mutA	TAPLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALPVRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLP VRKSGTSEYRMVQDLREVNKRVETIHPTVPNPYTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDAFFCIPLAPESQLIFAFEWADAEEGESGQLTWTRLPQGFKNSPT LFNEALNRDLQGFRLDHPSVSLLQYVDDLLIAADTQAACLSATRDLLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQAILQIPVPK TKRQVREFLGKIGYCRLFIPGFAELAQPLYAATRPGNDPLVWGEKEEEAFQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKR PVAYLSKRLDPVAAGWPRCLRAIAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPPDKWLTNARITQYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETD DTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTDQPLAQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSVIWAEPLPIGTSAQKAELIALTKALEWSKDKSVNIYTDSRY AFATLHVHGMIYRERGWLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPKRVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATIS
BAEVM_P10272	TVSLQDEHRLFDIPVTTSLPDVWLQDFPQAWAETGGLGRAKCQAPIIIDLKPTAVPVSIKQYPMSLEAHMGIRQHIIKFLELGVLRPCRSPWNTPLLP VKKPGTQDYRPVQDLREINKRTVDIHPTVPNPYNLLSTLKPDYSWYTVLDLKDAFFCLPLAPQSQELFAFEWKDPERGISGQLTWTRLPQGFKNSP TLFDEALHRDLTDFRTQHPEVTLLQYVDDLLLAAPTKKACTQGTRHLLQELGEKGYRASAKKAQICQTKVTYLGYILSEGKRWLTPGRIETVARIPPP RNPREVREFLGTAGFCRLWIPGFAELAAPLYALTKESTPFTWQTEHQLAFEALKKALLSAPALGLPDTSKPFTLFLDERQGIAKGVLTQKLGPWKRP VAYLSKKLDPVAAGWPPCLRIMAATAMLVKDSAKLTLGQPLTVITPHTLEAIVRQPPDRWITNARLTHYQALLLDTDRVQFGPPVTLNPATLLPVPEN QPSPHDCRQVLAETHGTREDLKDQELPDADHTWYTDGSSYLDSGTRRAGAAVVDGHNTIWAQSLPPGTSAQKAELIALTKALELSKGKKANIYTD SRYAFATAHTHGSIYERRGLLTSEGKEIKNKAEIIALLKALFLPQEVAIIHCPGHQKGQDPVAVGNRQADRVARQAAMAEVLTLATEPDNTSHIT
BAEVM_P10272_3mut	TVSLQDEHRLFDIPVTTSLPDVWLQDFPQAWAETGGLGRAKCQAPIIIDLKPTAVPVSIKQYPMSLEAHMGIRQHIIKFLELGVLRPCRSPWNTPLLP VKKPGTQDYRPVQDLREINKRTVDIHPTVPNPYNLLSTLKPDYSWYTVLDLKDAFFCLPLAPQSQELFAFEWKDPERGISGQLTWTRLPQGFKNSP TLFNEALHRDLTDFRTQHPEVTLLQYVDDLLLAAPTKKACTQGTRHLLQELGEKGYRASAKKAQICQTKVTYLGYILSEGKRWLTPGRIETVARIPPP RNPREVREFLGTAGFCRLWIPGFAELAAPLYALTKPSTPFTWQTEHQLAFEALKKALLSAPALGLPDTSKPFTLFLDERQGIAKGVLTQKLGPWKRP VAYLSKKLDPVAAGWPPCLRIMAATAMLVKDSAKLTLGQPLTVITPHTLEAIVRQPPDRWITNARLTHYQALLLDTDRVQFGPPVTLNPATLLPVPEN QPSPHDCRQVLAETHGTREDLKDQELPDADHTWYTDGSSYLDSGTRRAGAAVVDGHNTIWAQSLPPGTSAQKAELIALTKALELSKGKKANIYTD SRYAFATAHTHGSIYERRGWLTSEGKEIKNKAEIIALLKALFLPQEVAIIHCPGHQKGQDPVAVGNRQADRVARQAAMAEVLTLATEPDNTSHIT
BAEVM_P10272_3mutA	TVSLQDEHRLFDIPVTTSLPDVWLQDFPQAWAETGGLGRAKCQAPIIIDLKPTAVPVSIKQYPMSLEAHMGIRQHIIKFLELGVLRPCRSPWNTPLLP VKKPGTQDYRPVQDLREINKRTVDIHPTVPNPYNLLSTLKPDYSWYTVLDLKDAFFCLPLAPQSQELFAFEWKDPERGISGQLTWTRLPQGFKNSP TLFNEALHRDLTDFRTQHPEVTLLQYVDDLLLAAPTKKACTQGTRHLLQELGEKGYRASAKKAQICQTKVTYLGYILSEGKRWLTPGRIETVARIPPP RNPREVREFLGKAGFCRLFIPGFAELAAPLYALTKPSTPFTWQTEHQLAFEALKKALLSAPALGLPDTSKPFTLFLDERQGIAKGVLTQKLGPWKRP

【０１１２】

【表２－２】

RT名	RTアミノ酸配列
	VAYLSKKLDPVAAGWPPCLRIMAATAMLVKDSAKLTLGQPLTVITPHTLEAIVRQPPDRWITNARLTHYQALLLDTDRVQFGPPVTLNPATLLPVPEN QPSPHDCRQVLAETHGTREDLKDQELPDADHTWYTDGSSYLDSGTRRAGAAVVDGHNTIWAQSLPPGTSAQKAELIALTKALELSKGKKANIYTD SRYAFATAHTHGSIYERRGWLTSEGKEIKNKAEIIALLKALFLPQEVAIIHCPGHQKGQDPVAVGNRQADRVARQAAMAEVLTATEPDNTSHIT
BLVAU_P25059	GVLDAPPSHIGLEHLPPPPEVPQFPLNLERLQALQDLVHRSLEAGYISPWDGPGNNPVFPVRKPNGAWRFVHDLRVTNALTKPIPALSPGPPDLTAI PTHLPHIICLDLKDAFFQIPVEDRFRSYFAFTLPTPGGLQPHRRFAWRVLPQGFINSPALFERALQEPLRQVSAAFSQSLLVSYMDDILYVSPTEEQR LQCYQTMAAHLRDLGFQVASEKTRQTPSPVPFLGQMVHERMVTYQSLPTLQISSPISLHQLQTVLGDLQWVSRGTPTTRRPLQLLYSSLKGIDDPR AIIHLSPEQQQGIAELRQALSHNARSRYNEQEPLLAYVHLTRAGSTLVLFQKGAQFPLAYFQTPLTDNQASPWGLLLLLGCQYLQAQALSSYAKTILK YYHNLPKTSLDNWIQSSEDPRVQELLQLWPQISSQGIQPPGPWKTLVTRAEVFLTPQFSPEPIPAALCLFSDGAARRGAYCLWKDHLLDFQAVPAP ESAQKGELAGLLAGLAAAPPEPLNIWVDSKYLYSLLRTLVLGAWLQPDPVPSYALLYKSLLRHPAIFVGHVRSHSSASHPIASLNNYVDQL
BLVAU_P25059_2mut	GVLDAPPSHIGLEHLPPPPEVPQFPLNLERLQALQDLVHRSLEAGYISPWDGPGNNPVFPVRKPNGAWRFVHDLRVTNALTKPIPALSPGPPDLTAI PTHLPHIICLDLKDAFFQIPVEDRFRSYFAFTLPTPGGLQPHRRFAWRVLPQGFINSPALFQRALQEPLRQVSAAFSQSLLVSYMDDILYVSPTEEQR LQCYQTMAAHLRDLGFQVASEKTRQTPSPVPFLGQMVHERMVTYQSLPTLQISSPISLHQLQTVLGDLQWVSRGTPTTRRPLQLLYSSLKPIDDPR AIIHLSPEQQQGIAELRQALSHNARSRYNEQEPLLAYVHLTRAGSTLVLFQKGAQFPLAYFQTPLTDNQASPWGLLLLLGCQYLQAQALSSYAKTILK YYHNLPKTSLDNWIQSSEDPRVQELLQLWPQISSQGIQPPGPWKTLVTRAEVFLTPQFSPDPIPAALCLFSDGAARRGAYCLWKDHLLDFQAVPAPE SAQKGELAGLLAGLAAAPPEPVNIWVDSKYLYSLLRTLVLGAWLQPDPVPSYALLYKSLLRHPAIVVGHVRSHSSASHPIASLNNYVDQL
BLVJ_P03361	GVLDTPPSHIGLEHLPPPPEVPQFPLNLERLQALQDLVHRSLEAGYISPWDGPGNNPVFPVRKPNGAWRFVHDLRATNALTKPIPALSPGPPDLTAI PTHPPHIICLDLKDAFFQIPVEDRFRFYLSFTLPSPGGLQPHRRFAWRVLPQGFINSPALFERALQEPLRQVSAAFSQSLLVSYMDDILYASPTEEQR SQCYQALAARLRDLGFQVASEKTSQTPSPVPFLGQMVHEQIVTYQSLPTLQISSPISLHQLQAVLGDLQWVSRGTPTTRRPLQLLYSSLKRHHDPR AIIQLSPEQLQGIAELRQALSHNARSRYNEQEPLLAYVHLTRAGSTLVLFQKGAQFPLAYFQTPLTDNQASPWGLLLLLGCQYLQTQALSSYAKPILK YYHNLPKTSLDNWIQSSEDPRVQELLQLWPQISSQGIQPPGPWKTLITRAEVFLTPQFSPDPIPAALCLFSDGATGRGAYCLWKDHLLDFQAVPAPE SAQKGELAGLLAGLAAAPPEPVNIWVDSKYLYSLLRTLVLGAWLQPDPVPSYALLYKSLLRHPAIVVGHVRSHSSASHPIASLNNYVDQL
BLVJ_P03361_2mut	GVLDTPPSHIGLEHLPPPPEVPQFPLNLERLQALQDLVHRSLEAGYISPWDGPGNNPVFPVRKPNGAWRFVHDLRATNALTKPIPALSPGPPDLTAI PTHPPHIICLDLKDAFFQIPVEDRFRFYLSFTLPSPGGLQPHRRFAWRVLPQGFINSPALFQRALQEPLRQVSAAFSQSLLVSYMDDILYASPTEEQR SQCYQALAARLRDLGFQVASEKTSQTPSPVPFLGQMVHEQIVTYQSLPTLQISSPISLHQLQAVLGDLQWVSRGTPTTRRPLQLLYSSLKRHHDPR AIIQLSPEQLQGIAELRQALSHNARSRYNEQEPLLAYVHLTRAGSTLVLFQKGAQFPLAYFQTPLTDNQASPWGLLLLLGCQYLQTQALSSYAKPILK YYHNLPKTSLDNWIQSSEDPRVQELLQLWPQISSQGIQPPGPWKTLITRAEVFLTPQFSPDPIPAALCLFSDGATGRGAYCLWKDHLLDFQAVPAPE SAQKGELAGLLAGLAAAPPEPVNIWVDSKYLYSLLRTWVLGAWLQPDPVPSYALLYKSLLRHPAIVVGHVRSHSSASHPIASLNNYVDQL
BLVJ_P03361_2mutB	GVLDTPPSHIGLEHLPPPPEVPQFPLNLERLQALQDLVHRSLEAGYISPWDGPGNNPVFPVRKPNGAWRFVHDLRATNALTKPIPALSPGPPDLTA PPTHPPHIICLDLKDAFFQIPVEDRFRFYLSFTLPSPGGLQPHRRFAWRVLPQGFINSPALFQRALQEPLRQVSAAFSQSLLVSYMDDILYASPTEEQ RSQCYQALAARLRDLGFQVASEKTSQTPSPVPFLGQMVHEQIVTYQSLPTLQISSPISLHQLQAVLGDLQWVSRGTPTTRRPLQLLYSSLKRHHDP RAIIQLSPEQLQGIAELRQALSHNARSRYNEQEPLLAYVHLTRAGSTLVLFQKGAQFPLAYFQTPLTDNQASPWGLLLLLGCQYLQTQALSSYAKPIL KYYHNLPKTSLDNWIQSSEDPRVQELLQLWPQISSQGIQPPGPWKTLITRAEVFLTPQFSPDPIPAALCLFSDGATGRGAYCLWKDHLLDFQAVPAP ESAQKGELAGLLAGLAAAPPEPVNIWVDSKYLYSLLRTWVLGAWLQPDPVPSYALLYKSLLRHPAIVVGHVRSHSSASHPIASLNNYVDQL
FFV_O93209	MDLLKPLTVERKGVKIKGYWNSQADITCVPKDLLQGEEPVRQQNVTTIHGTQEGDVYYVNLKIDGRRINTEVIGTTLDYAIITPGDVPWILKKPLELTIK LDLEEQQGTLLNNSILSKKGKEELKQLFEKYSALWQSWENQVGHRRIRPHKIATGTVKPTPQKQYHINPKAKPDIQIVINDLLKQGVLIQKESTMNTP VYPVPKPNGRWRMVLDYRAVNKVTPLIAVQNQHSYGILGSLFKGRYKTTIDLSNGFWAHPIVPEDYWITAFTWQGKQYCWTVLPQGFLNSPGLFT GDVVDLLQGIPNVEVYVDDVYISHDSEKEHLEYLDILFNRLKEAGYIISLKKSNIANSIVDFLGFQITNEGRGLTDTFKEKLENITAPTTLKQLQSILGLLN FARNFIPDFTELIAPLYALIPKSTKNYVPWQIEHSTTLETLITKLNGAEYLQGRKGDKTLIMKVNASYTTGYIRYYNEGEKKPISYVSIVFSKTELKFTEL EKLLTTVHKGLLKALDLSMGQNIHVYSPIVSMQNIQKTPQTAKKALASRWLSWLSYLEDPRIRFFYDPQMPALKDLPAVDTGKDNKKHPSNFQHIFY TDGSAITSPTKEGHLNAGMGIVYFINKDGNLQKQQEWSISLGNHTAQFAEIAAFEFALKKCLPLGGNILVVTDSNYVAKAYNEELDVWASNGFVNNR KKPLKHISKWKSVADLKRLRPDVVVTHEPGHQKLDSSPHAYGNNLADQLATQASFKVH
FFV_O93209_2mut	MDLLKPLTVERKGVKIKGYWNSQADITCVPKDLLQGEEPVRQQNVTTIHGTQEGDVYYVNLKIDGRRINTEVIGTTLDYAIITPGDVPWILKKPLELTIK LDLEEQQGTLLNNSILSKKGKEELKQLFEKYSALWQSWENQVGHRRIRPHKIATGTVKPTPQKQYHINPKAKPDIQIVINDLLKQGVLIQKESTMNTP VYPVPKPNGRWRMVLDYRAVNKVTPLIAVQNQHSYGILGSLFKGRYKTTIDLSNGFWAHPIVPEDYWITAFTWQGKQYCWTVLPQGFLNSPGLFN GDVVDLLQGIPNVEVYVDDVYISHDSEKEHLEYLDILFNRLKEAGYIISLKKSNIANSIVDFLGFQITNEGRGLTDTFKEKLENITAPTTLKQLQSILGLLN FARNFIPDFTELIAPLYALIPKSPKNYVPWQIEHSTTLETLITKLNGAEYLQGRKGDKTLIMKVNASYTTGYIRYYNEGEKKPISYVSIVFSKTELKFTEL EKLLTTVHKGLLKALDLSMGQNIHVYSPIVSMQNIQKTPQTAKKALASRWLSWLSYLEDPRIRFFYDPQMPALKDLPAVDTGKDNKKHPSNFQHIFY TDGSAITSPTKEGHLNAGMGIVYFINKDGNLQKQQEWSISLGNHTAQFAEIAAFEFALKKCLPLGGNILVVTDSNYVAKAYNEELDVWASNGFVNNR KKPLKHISKWKSVADLKRLRPDVVVTHEPGHQKLDSSPHAYGNNLADQLATQASFKVH
FFV_O93209_2mutA	MDLLKPLTVERKGVKIKGYWNSQADITCVPKDLLQGEEPVRQQNVTTIHGTQEGDVYYVNLKIDGRRINTEVIGTTLDYAIITPGDVPWILKKPLELTIK LDLEEQQGTLLNNSILSKKGKEELKQLFEKYSALWQSWENQVGHRRIRPHKIATGTVKPTPQKQYHINPKAKPDIQIVINDLLKQGVLIQKESTMNTP VYPVPKPNGRWRMVLDYRAVNKVTPLIAVQNQHSYGILGSLFKGRYKTTIDLSNGFWAHPIVPEDYWITAFTWQGKQYCWTVLPQGFLNSPGLFN GDVVDLLQGIPNVEVYVDDVYISHDSEKEHLEYLDILFNRLKEAGYIISLKKSNIANSIVDFLGFQITNEGRGLTDTFKEKLENITAPTTLKQLQSILGLLN FARNFIPDFTELIAPLYALIPKSPKNYVPWQIEHSTTLETLITKLNGAEYLQGRKGDKTLIMKVNASYTTGYIRYYNEGEKKPISYVSIVFSKTELKFTEL EKLLTTVHKGLLKALDLSMGQNIHVYSPIVSMQNIQKTPQTAKKALASRWLSWLSYLEDPRIRFFYDPQMPALKDLPAVDTGKDNKKHPSNFQHIFY TDGSAITSPTKEGHLNAGMGIVYFINKDGNLQKQQEWSISLGNHTAQFAEIAAFEFALKKCLPLGGNILVVTDSNYVAKAYNEELDVWASNGFVNNR KKPLKHISKWKSVADLKRLRPDVVVTHEPGHQKLDSSPHAYGNNLADQLATQASFKVH
FFV_O93209-Pro	VPWILKKPLELTIKLDLEEQQGTLLNNSILSKKGKEELKQLFEKYSALWQSWENQVGHRRIRPHKIATGTVKPTPQKQYHINPKAKPDIQIVINDLLKQ GVLIQKESTMNTPVYPVPKPNGRWRMVLDYRAVNKVTPLIAVQNQHSYGILGSLFKGRYKTTIDLSNGFWAHPIVPEDYWITAFTWQGKQYCWTVL PQGFLNSPGLFTGDVVDLLQGIPNVEVYVDDVYISHDSEKEHLEYLDILFNRLKEAGYIISLKKSNIANSIVDFLGFQITNEGRGLTDTFKEKLENITAPT TLKQLQSILGLLNFARNFIPDFTELIAPLYALIPKSTKNYVPWQIEHSTTLETLITKLNGAEYLQGRKGDKTLIMKVNASYTTGYIRYYNEGEKKPISYVSI VFSKTELKFTELEKLLTTVHKGLLKALDLSMGQNIHVYSPIVSMQNIQKTPQTAKKALASRWLSWLSYLEDPRIRFFYDPQMPALKDLPAVDTGKDN KKHPSNFQHIFYTDGSAITSPTKEGHLNAGMGIVYFINKDGNLQKQQEWSISLGNHTAQFAEIAAFEFALKKCLPLGGNILVVTDSNYVAKAYNEELD VWASNGFVNNRKKPLKHISKWKSVADLKRLRPDVVVTHEPGHQKLDSSPHAYGNNLADQLATQASFKVH
FFV_O93209-	VPWILKKPLELTIKLDLEEQQGTLLNNSILSKKGKEELKQLFEKYSALWQSWENQVGHRRIRPHKIATGTVKPTPQKQYHINPKAKPDIQIVINDLLKQ GVLIQKESTMNTPVYPVPKPNGRWRMVLDYRAVNKVTPLIAVQNQHSYGILGSLFKGRYKTTIDLSNGFWAHPIVPEDYWITAFTWQGKQYCWTVL PQGFLNSPGLFNGDVVDLLQGIPNVEVYVDDVYISHDSEKEHLEYLDILFNRLKEAGYIISLKKSNIANSIVDFLGFQITNEGRGLTDTFKEKLENITAPT

【０１１３】

【表２－３】

RT名	RTアミノ酸配列
Prc_2mut	TLKQLQSILGLLNFARNFIPDFTELIAPLYALIPKSPKNYVPWQIEHSTTLETLITKLNGAEYLQGRKGDKTLIMKVNASYTTGYIRYYNEGEKKPISYVSI VFSKTELKFTELEKLLTTVHKGLLKALDLSMGQNIHVYSPIVSMQNIQKTPQTAKKALASRWLSWLSYLEDPRIRFFYDPQMPALKDLPAVDTGKDN KKHPSNFQHIFYTDGSAITSPTKEGHLNAGMGIVYFINKDGNLQKQQEWSISLGNHTAQFAEIAAFEFALKKCLPLGGNILVVTDSNYVAKAYNEELD VWASNGFVNNRKKPLKHISKWKSVADLKRLRPDVVVTHEPGHQKLDSSPHAYGNNLADQLATQASFKVH
FFV_O93209-Prc_2mutA	VPWLKKPLELTIKLDLEEQQGTLLNNSILSKKGKEELKQLFEKYSALWQSWENQVGHRRIRPHKIATGTVKPTPQKQYHINPKAKPDIQIVINDLLKQ GVLIQKESTMNTPVYPVPKPNGRWRMVLDYRAVNKVTPLIAVQNQHSYGILGSLFKGRYKTTIDLSNGFWAHPIVPEDYWITAFTWQGKQYCWTVL PQGFLNSPGLFNGDVVDLLQGIPNVEVYVDDVYISHDSEKEHLEYLDILFNRLKEAGYIISLKKSNIANSIVDFLGFQITNEGRGLTDTFKEKLENITAPT TLKQLQSILGKLNFARNFIPDFTELIAPLYALIPKSPKNYVPWQIEHSTTLETLITKLNGAEYLQGRKGDKTLIMKVNASYTTGYIRYYNEGEKKPISYVS IVFSKTELKFTELEKLLTTVHKGLLKALDLSMGQNIHVYSPIVSMQNIQKTPQTAKKALASRWLSWLSYLEDPRIRFFYDPQMPALKDLPAVDTGKDN KKHPSNFQHIFYTDGSAITSPTKEGHLNAGMGIVYFINKDGNLQKQQEWSISLGNHTAQFAEIAAFEFALKKCLPLGGNILVVTDSNYVAKAYNEELD VWASNGFVNNRKKPLKHISKWKSVADLKRLRPDVVVTHEPGHQKLDSSPHAYGNNLADQLATQASFKVH
FLV_P10273	TLQLEEEYRLFEPESTQKQEMDIWLKNFPQAWAETGGMGTAHCQAPVLIQLKATATPISIRQYPMPHEAYQGIKPHIRRMLDQGILKPCQSPWNTP LLPVKKPGTEDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSTLPPSHPWYTVLDLKDAFFCLRLHSESQLLFAFEWRDPEIGLSGQLTWTRLPQGFK NSPTLFDEALHSDLADFRVRYPALVLLQYVDDLLLAAATRTEQLEGTKALLETLGNKGYRASAKKAQICLQEVTYLGYSLKDGQRWLTKARKEAILSI PVPKNSRQVREFLGTAGYCRLWIPGFAELAAPLYPLTRPGTLFQWGTEQQLAFEDIKKALLSSPALGLPDITKPFELFIDENSGFAKGVLVQKLGPW KRPVAYLSKKLDTVASGWPPCLRMVAAIAILVKDAGKLTLGQPLTILTSHPVEALVRQPPNKWLSNARMTHYQAMLLDAERVHFGPTVSLNPATLLP LPSGGNHHDCLQILAETHGTRPDLTDQPLPDADLTWYTDGSSFIRNGEREAGAAVTTESEVIWAAPLPPGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLTVYT DSRYAFATTHVHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKNEILALLEALFLPKRLSIIHCPGHQKGDSPQAKGNRLADDTAKKAATETHSSLTVLP
FLV_P10273_3mut	TLQLEEEYRLFEPESTQKQEMDIWLKNFPQAWAETGGMGTAHCQAPVLIQLKATATPISIRQYPMPHEAYQGIKPHIRRMLDQGILKPCQSPWNTP LLPVKKPGTEDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSTLPPSHPWYTVLDLKDAFFCLRLHSESQLLFAFEWRDPEIGLSGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHSDLADFRVRYPALVLLQYVDDLLLAAATRTEQLEGTKALLETLGNKGYRASAKKAQICLQEVTYLGYSLKDGQRWLTKARKEAILSI PVPKNSRQVREFLGTAGYCRLWIPGFAELAAPLYPLTRPGTLFQWGTEQQLAFEDIKKALLSSPALGLPDITKPFELFIDENSGFAKGVLVQKLGPW KRPVAYLSKKLDTVASGWPPCLRMVAAIAILVKDAGKLTLGQPLTILTSHPVEALVRQPPNKWLSNARMTHYQAMLLDAERVHFGPTVSLNPATLLP LPSGGNHHDCLQILAETHGTRPDLTDQPLPDADLTWYTDGSSFIRNGEREAGAAVTTESEVIWAAPLPPGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLTVYT DSRYAFATTHVHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKNEILALLEALFLPKRLSIIHCPGHQKGDSPQAKGNRLADDTAKKAATETHSSLTVLP
FLV_P10273_3mutA	TLQLEEEYRLFEPESTQKQEMDIWLKNFPQAWAETGGMGTAHCQAPVLIQLKATATPISIRQYPMPHEAYQGIKPHIRRMLDQGILKPCQSPWNTP LLPVKKPGTEDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSTLPPSHPWYTVLDLKDAFFCLRLHSESQLLFAFEWRDPEIGLSGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHSDLADFRVRYPALVLLQYVDDLLLAAATRTEQLEGTKALLETLGNKGYRASAKKAQICLQEVTYLGYSLKDGQRWLTKARKEAILSI PVPKNSRQVREFLGKAGYCRLFIPGFAELAAPLYPLTRPGTLFQWGTEQQLAFEDIKKALLSSPALGLPDITKPFELFIDENSGFAKGVLVQKLGPWK RPVAYLSKKLDTVASGWPPCLRMVAAIAILVKDAGKLTLGQPLTILTSHPVEALVRQPPNKWLSNARMTHYQAMLLDAERVHFGPTVSLNPATLLPL PSGGNHHDCLQILAETHGTRPDLTDQPLPDADLTWYTDGSSFIRNGEREAGAAVTTESEVIWAAPLPPGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLTVYT DSRYAFATTHVHGEIYRRRGWLTSECKEIKNKNEILALLEALFLPKRLSIIHCPGHQKGDSPQAKGNRLADDTAKKAATETHSSLTVLP
FOAMV_P14350	MNPLQLLQPLPAEIKGTKLLAHWNSGATITCIPESFLEDEQPIKKTLIKTIHGEKQQNVYYVTFKVKGRKVEAEVIASPYEYILLSPTDVPWLTQQPLQL TILVPLQEYQEKILSKTALPEDQKQQLKTLFVKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLTPQNSTM NTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFLNSPA LFTADVVDLLKEIPNVQVYVDDIYLSHDDPKEHVQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQKTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNITPPKDLKQLQSI LGLLNFARNFIPNFAELVQPLYNLIASAKGKYIEWSEENTKQLNMVIEALNTASNLEERLPEQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNETGKKPIMYLNYVFSKA ELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYTSSQSPVKHPSQ YEGVFYTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHATYKPEYQVLNQWSIPLGNHTAQMAEIAAVEFACKKALKIPGPVLVITDSFYVAESANKELPYWKSNG FVNNKKKPLKHISKWKSIAECLSMKPDITIQHEKGISLQIPVFILKGNALADKLATQGSYVVN
FOAMV_P14350_2mut	MNPLQLLQPLPAEIKGTKLLAHWNSGATITCIPESFLEDEQPIKKTLIKTIHGEKQQNVYYVTFKVKGRKVEAEVIASPYEYILLSPTDVPWLTQQPLQL TILVPLQEYQEKILSKTALPEDQKQQLKTLFVKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLTPQNSTM NTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFLNSPA LFNADVVDLLKEIPNVQVYVDDIYLSHDDPKEHVQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQKTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNITPPKDLKQLQSI LGKLNFARNFIPNFAELVQPLYNLIAPAKGKYIEWSEENTKQLNMVIEALNTASNLEERLPEQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNETGKKPIMYLNYVFSKA ELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYTSSQSPVKHPSQ YEGVFYTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHATYKPEYQVLNQWSIPLGNHTAQMAEIAAVEFACKKALKIPGPVLVITDSFYVAESANKELPYWKSNG FVNNKKKPLKHISKWKSIAECLSMKPDITIQHEKGISLQIPVFILKGNALADKLATQGSYVVN
FOAMV_P14350_2mutA	MNPLQLLQPLPAEIKGTKLLAHWNSGATITCIPESFLEDEQPIKKTLIKTIHGEKQQNVYYVTFKVKGRKVEAEVIASPYEYILLSPTDVPWLTQQPLQL TILVPLQEYQEKILSKTALPEDQKQQLKTLFVKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLTPQNSTM NTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFLNSPA LFNADVVDLLKEIPNVQVYVDDIYLSHDDPKEHVQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQKTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNITPPKDLKQLQSI LGKLNFARNFIPNFAELVQPLYNLIAPAKGKYIEWSEENTKQLNMVIEALNTASNLEERLPEQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNETGKKPIMYLNYVFSKA ELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYTSSQSPVKHPSQ YEGVFYTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHATYKPEYQVLNQWSIPLGNHTAQMAEIAAVEFACKKALKIPGPVLVITDSFYVAESANKELPYWKSNG FVNNKKKPLKHISKWKSIAECLSMKPDITIQHEKGISLQIPVFILKGNALADKLATQGSYVVN
FOAMV_P14350-Pro	VPWLTQQPLQLTILVPLQEYQEKILSKTALPEDQKQQLKTLFVKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLK QGVLTPQNSTMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWT RLPQGFLNSPALFTADVVDLLKEIPNVQVYVDDIYLSHDDPKEHVQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQKTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNI TPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFAELVQPLYNLIASAKGKYIEWSEENTKQLNMVIEALNTASNLEERLPEQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNETGKK PIMYLNYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYT SSQSPVKHPSQYEGVFYTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHATYKPEYQVLNQWSIPLGNHTAQMAEIAAVEFACKKALKIPGPVLVITDSFYVAESA NKELPYWKSNGFVNNKKKPLKHISKWKSIAECLSMKPDITIQHEKGISLQIPVFILKGNALADKLATQGSYVVN
FOAMV_P14350-	VPWLTQQPLQLTILVPLQEYQEKILSKTALPEDQKQQLKTLFVKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLK QGVLTPQNSTMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWT RLPQGFLNSPALFNADVVDLLKEIPNVQVYVDDIYLSHDDPKEHVQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQKTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNI TPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFAELVQPLYNLIAPAKGKYIEWSEENTKQLNMVIEALNTASNLEERLPEQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNETGKK

【０１１４】

【表２－４】

RT名	RTアミノ酸配列
Prc_2mut	PIMYLNYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYT SSQSPVKHPSQYEGVFYTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHATYKPEYQVLNQWSIPLGNHTAQMAEIAAVEFACKKALKIPGPVLVITDSFYVAESA NKELPYWKSNGFVNNKKKPLKHISKWKSIAECLSMKPDITIQHEKGISLQIPVFILKGNALADKLATQGSYVVN
FOAMV_P14350-Prc_2mutA	VPWLTQQPLQLTILVPLQEYQEKILSKTALPEDQKQQLKTLFVKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLK QGVLTPQNSTMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWT RLPQGFLNSPALFNADVVDLLKEIPNVQVYVDDIYLSHDDPKEHVQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQKTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNI TPPKDLKQLQSILGKLNFARNFIPNFAELVQPLYNLIAPAKGKYIEWSEENTKQLNMVIEALNTASNLEERLPEQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNETCKK PIMYLNYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYT SSQSPVKHPSQYEGVFYTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHATYKPEYQVLNQWSIPLGNHTAQMAEIAAVEFACKKALKIPGPVLVITDSFYVAESA NKELPYWKSNGFVNNKKKPLKHISKWKSIAECLSMKPDITIQHEKGISLQIPVFILKGNALADKLATQGSYVVN
GALV_P21414	VLNLEEEYRLHEKPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPVAVRQYPMSKEARECIRPHIQKFLDLGVLVPCRSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSYTWYSVLDLKDAFFCLRLHPNSQPLFAFEWKDPEKGNTGQLTWTRLPQGFK NSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLVAAPTYEDCKKGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQREVTYLGYLLKEGKRWLTPARKATVM KIPVPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKPSIPFIWTEEHQQAFDHIKKALLSAPALALPDLTKPFTLYIDERAGVARGVLTQTLGPW RRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLTLGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPATLLPV ESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLEDQPLPGVPTWYTDGSSFITEGKRRAGAPIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQALRLAEGKNINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPRRVAIIHCPGHQRGSNPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAGTTKP
GALV_P21414_3mut	VLNLEEEYRLHEKPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPVAVRQYPMSKEARECIRPHIQKFLDLGVLVPCRSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSYTWYSVLDLKDAFFCLRLHPNSQPLFAFEWKDPEKGNTGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLVAAPTYEDCKKGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQREVTYLGYLLKEGKRWLTPARKATVM KIPVPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKPSIPFIWTEEHQQAFDHIKKALLSAPALALPDLTKPFTLYIDERAGVARGVLTQTLGPW RRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLTLGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPATLLPV ESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLEDQPLPGVPTWYTDGSSFITEGKRRAGAPIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQALRLAEGKNINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPRRVAIIHCPGHQRGSNPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAGTTKP
GALV_P21414_3mutA	VLNLEEEYRLHEKPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPVAVRQYPMSKEARECIRPHIQKFLDLGVLVPCRSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSYTWYSVLDLKDAFFCLRLHPNSQPLFAFEWKDPEKGNTGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLVAAPTYEDCKKGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQREVTYLGYLLKEGKRWLTPARKATVM KIPVPTTPRQVREFLGKAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTKPSIPFIWTEEHQQAFDHIKKALLSAPALALPDLTKPFTLYIDERAGVARGVLTQTLGPW RRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLTLGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPATLLPV ESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLEDQPLPGVPTWYTDGSSFITEGKRRAGAPIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQALRLAEGKNINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPRRVAIIHCPGHQRGSNPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAGTTKP
HTL1A_P03362	AVLGLEHLPRPPQISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTIDLSSSSPGPPDLSSLPTTLAHLQ TIDLRDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWKVLPQGFKNSPTLFEMQLAHILQPIRQAFPQCTILQYMDDILLASPSHEDLLLLSEATM ASLISHGLPVSENKTQQTPGTIKFLGQIISPNHLTYDAVPTVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQRHTDPRDQIYLNPSQV QSLVQLRQALSQNCRSRLVQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKEQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNISTQT FNQFIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTAAPLAPVKALMPVFTLSPVIINTAPCLFSDGSTSRAAYILWDKQILSQRSFPLPPPHKS AQRAELLGLLHGLSSARSWRCLNIFLDSKYLYHYLRTLALGTFQGRSSQAPFQALLPRLLSRKVVYLHHVRSHTNLPDPISRLNALTDALLITPVLQL
HTL1A_P03362_2mut	AVLGLEHLPRPPQISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTIDLSSSSPGPPDLSSLPTTLAHLQ TIDLRDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWKVLPQGFKNSPTLFQMQLAHILQPIRQAFPQCTILQYMDDILLASPSHEDLLLLSEATM ASLISHGLPVSENKTQQTPGTIKFLGQIISPNHLTYDAVPTVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQRHTDPRDQIYLNPSQV QSLVQLRQALSQNCRSRLVQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKEQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNISTQT FNQFIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTAAPLAPVKALMPVFTLSPVIINTAPCLFSDGSTSRAAYILWDKQILSQRSFPLPPPHKS AQRAELLGLLHGLSSARSWRCLNIFLDSKYLYHYLRTLALGTFQGRSSQAPFQALLPRLLSRKVVYLHHVRSHTNLPDPISRLNALTDALLITPVLQL
HTL1A_P03362_2mutB	AVLGLEHLPRPPQISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTIDLSSSSPGPPDLSSPTTLAHLQ TIDLRDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWKVLPQGFKNSPTLFQMQLAHILQPIRQAFPQCTILQYMDDILLASPSHEDLLLLSEATM ASLISHGLPVSENKTQQTPGTIKFLGQIISPNHLTYDAVPTVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQPHTDPRDQIYLNPSQV QSLVQLRQALSQNCRSRLVQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKEQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNISTQT FNQFIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTAAPLAPVKALMPVFTLSPVIINTAPCLFSDGSTSRAAYILWDKQILSQRSFPLPPPHKS AQRAELLGLLHGLSSARSWRCLNIFLDSKYLYHYLRTLALGTFQGRSSQAPFQALLPRLLSRKVVYLHHVRSHTNLPDPISRLNALTDALLITPVLQL
HTL1C_P14078	AVLGLEHLPRPPEISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTIDLSSSSPGPPDLSSLPTTLAHLQ TIDLKDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWRVLPQGFKNSPTLFQMQLAHILQPIRQAFPQCTILQYMDDILLASPSHADLQLLSEATM ASLISHGLPVSENKTQQTPGTIKFLGQIISPNHLTYDAVPKVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQPHTDPRDQIYLNPSQV QSLVQLRQALSQNCRSRLVQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKQQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNISTQT FNQFIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTTAPLAPVKALMPVFTLSPVIINTAPCLFSDGSTSQAAYILWDKHILSQRSFPLPPPHKS AQRAELLGLLHGLSSARSWRCLNIFLDSKYLYHYLRTLALGTFQGRSSQAPFQALLPRLLSRKVVYLHHVRSHTNLPDPISRLNALTDALLITPVLQL
HTL1C_P14078_2mut	AVLGLEHLPRPPEISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTIDLSSSSPGPPDLSSLPTTLAHLQ TIDLKDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWRVLPQGFKNSPTLFQMQLAHILQPIRQAFPQCTILQYMDDILLASPSHADLQLLSEATM ASLISHGLPVSENKTQQTPGTIKFLGQIISPNHLTYDAVPKVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQPHTDPRDQIYLNPSQV QSLVQLRQALSQNCRSRLVQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKQQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNISTQT FNQFIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTTAPLAPVKALMPVFTLSPVIINTAPCLFSDGSTSQAAYILWDKHILSQRSFPLPPPHKS AQRAELLGLLHGLSSARSWRCLNIFLDSKYLYHYLRTLALGTFQGRSSQAPFQALLPRLLSRKVVYLHHVRSHTNLPDPISRLNALTDALLITPVLQL
HTL1L_P0C211	GLEHLPRPPEISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTVDLSSSSPGPPDLSSLPTTLAHLQTID LKDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWKVLPQGFKNSPTLFEMQLASILQPIRQAFPQCVILQYMDDILLASPSPEDLQQLSEATMAS LISHGLPVSQDKTQQTPGTIKFLGQIISPNHITYDAVPTVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQGHTDPRDQIYLNPSQVQSL MQLQQALSQNCRSRLAQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKQQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNISIQTFNQ FIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTAAPLAPVKALTPVFTLSPIIINTAPCLFSDGSTSQAAYILWDKHILSQRSFPLPPPHKSAQQA ELLGLLHGLSSARSWHCLNIFLDSKYLYHYLRTLALGTFQGKSSQAPFQALLPRLLAHKVIYLHHVRSHTNLPDPISKLNALTDALLITPIL

【０１１５】

【表２－５】

RT名	RTアミノ酸配列
HTL1L_P0C211_2mut	GLEHLPRPPEISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTVDLSSSSPGPPDLSSLPTTLAHLQTID LKDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWKVLPQGFKNSPTLFQMQLASILQPIRQAFPQCVILQYMDDILLASPSPEDLQQLSEATMAS LISHGLPVSQDKTQQTPGTIKFLGQIISPNHITYDAVPTVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQGHTDPRDQIYLNPSQVQSL MQLQQALSQNCRSRLAQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKQQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNISIQTFNQ FIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTAAPLAPVKALTPVFTLSPIIINTAPCLFSDGSTSQAAYILWDKHILSQRSFPLPPPHKSAQQA ELLGLLHGLSSARSWHCLNIFLDSKYLYHYLRTLAWGTFQGKSSQAPFQALLPRLLAHKVIYLHHVRSHTNLPDPISKLNALTDALLITPIL
HTL1L_P0C211_2mutB	GLEHLPRPPEISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTVDLSSSSPGPPDLSSPPTTLAHLQTID LKDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWKVLPQGFKNSPTLFQMQLASILQPIRQAFPQCVILQYMDDILLASPSPEDLQQLSEATMAS LISHGLPVSQDKTQQTPGTIKFLGQIISPNHITYDAVPTVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQGHTDPRDQIYLNPSQVQSL MQLQQALSQNCRSRLAQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKQQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNISIQTFNQ FIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTAAPLAPVKALTPVFTLSPIIINTAPCLFSDGSTSQAAYILWDKHILSQRSFPLPPPHKSAQQA ELLGLLHGLSSARSWHCLNIFLDSKYLYHYLRTLAWGTFQGKSSQAPFQALLPRLLAHKVIYLHHVRSHTNLPDPISKLNALTDALLITPIL
HTL32_Q0R5R2	GLEHLPPPPEVSQFPLNPERLQALTDLVSRALEAKHIEPYQGPGNNPIFPVKKPNGKWRFIHDLRATNSVTRDLASPSPGPPDLTSLPQGLPHLRTI DLTDAFFQIPLPTIFQPYFAFTLPQPNNYGPGTRYSWRVLPQGFKNSPTLFEQQLSHILTPVRKTFPNSLIIQYMDDILLASPAPGELAALTDKVTNAL TKEGLPLSPEKTQATPGPIHFLGQVISQDCITYETLPSINVKSTWSLAELQSMLGELQWVSKGTPVLRSSLHQLYLALRGHRDPRDTIKLTSIQVQAL RTIQKALTLNCRSRLVNQLPILALIMLRPTGTTAVLFQTKQKWPLVWLHTPHPATSLRPWGQLLANAVIILDKYSLQHYGQVCKSFHHNISNQALTYY LHTSDQSSVAILLQHSHRFHNLGAQPSGPWRSLLQMPQIFQNIDVLRPPFTISPVVINHAPCLFSDGSASKAAFIIWDRQVIHQQVLSLPSTCSAQAG ELFGLLAGLQKSQPWVALNIFLDSKFLIGHLRRMALGAFPGPSTQCELHTQLLPLLQGKTVYVHHVRSHTLLQDPISRLNEATDALMLAPLLPL
HTL32_Q0R5R2_2mut	GLEHLPPPPEVSQFPLNPERLQALTDLVSRALEAKHIEPYQGPGNNPIFPVKKPNGKWRFIHDLRATNSVTRDLASPSPGPPDLTSLPQGLPHLRTI DLTDAFFQIPLPTIFQPYFAFTLPQPNNYGPGTRYSWRVLPQGFKNSPTLFQQQLSHILTPVRKTFPNSLIIQYMDDILLASPAPGELAALTDKVTNAL TKEGLPLSPEKTQATPGPIHFLGQVISQDCITYETLPSINVKSTWSLAELQSMLGELQWVSKGTPVLRSSLHQLYLALRGHRDPRDTIKLTSIQVQAL RTIQKALTLNCRSRLVNQLPILALIMLRPTGTTAVLFQTKQKWPLVWLHTPHPATSLRPWGQLLANAVIILDKYSLQHYGQVCKSFHHNISNQALTYY LHTSDQSSVAILLQHSHRFHNLGAQPSGPWRSLLQMPQIFQNIDVLRPPFTISPVVINHAPCLFSDGSASKAAFIIWDRQVIHQQVLSLPSTCSAQAG ELFGLLAGLQKSQPWVALNIFLDSKFLIGHLRRMAWGAFPGPSTQCELHTQLLPLLQGKTVYVHHVRSHTLLQDPISRLNEATDALMLAPLLPL
HTL32_Q0R5R2_2mutB	GLEHLPPPPEVSQFPLNPERLQALTDLVSRALEAKHIEPYQGPGNNPIFPVKKPNGKWRFIHDLRATNSVTRDLASPSPGPPDLTSPPQGLPHLRTI DLTDAFFQIPLPTIFQPYFAFTLPQPNNYGPGTRYSWRVLPQGFKNSPTLFQQQLSHILTPVRKTFPNSLIIQYMDDILLASPAPGELAALTDKVTNAL TKEGLPLSPEKTQATPGPIHFLGQVISQDCITYETLPSINVKSTWSLAELQSMLGELQWVSKGTPVLRSSLHQLYLALRGHRDPRDTIKLTSIQVQAL RTIQKALTLNCRSRLVNQLPILALIMLRPTGTTAVLFQTKQKWPLVWLHTPHPATSLRPWGQLLANAVIILDKYSLQHYGQVCKSFHHNISNQALTYY LHTSDQSSVAILLQHSHRFHNLGAQPSGPWRSLLQMPQIFQNIDVLRPPFTISPVVINHAPCLFSDGSASKAAFIIWDRQVIHQQVLSLPSTCSAQAG ELFGLLAGLQKSQPWVALNIFLDSKFLIGHLRRMAWGAFPGPSTQCELHTQLLPLLQGKTVYVHHVRSHTLLQDPISRLNEATDALMLAPLLPL
HTL3P_Q4U0X6	GLEHLPPPPEVSQFPLNPERLQALTDLVSRALEAKHIEPYQGPGNNPIFPVKKPNGKWRFIHDLRATNSLTRDLASPSPGPPDLTSLPQDLPHLRTID LTDAFFQIPLPAVFQPYFAFTLPQPNNHGPGTRYSWRVLPQGFKNSPTLFEQQLSHILAPVRKAFPNSLIIQYMDDILLASPALRELTALTDKVTNALT KEGLPMSLEKTQATPGSIHFLGQVISPDCITYETLPSIHVKSIWSLAELQSMLGELQWVSKGTPVLRSSLHQLYLALRGHRDPRDTIELTSTQVQALK TIQKALALNCRSRLVSQLPILALIILRPTGTTAVLFQTKQKWPLVWLHTPHPATSLRPWGQLLANAIITLDKYSLQHYGQICKSFHHNISNQALTYYLHT SDQSSVAILLQHSHRFHNLGAQPSGPWRSLLQVPQIFQNIDVLRPPFISPVVIDHAPCLFSDGATSKAAFILWDKQVIHQQVLPLPSTCSAQAGELF GLLAGLQKSKPWPALNIFLDSKFLIGHLRRMALGAFLGPSTQCDLHARLFPLLQGKTVYVHHVRSHTLLQDPISRLNEATDALMLAPLLPL
HTL3P_Q4U0X6_2mut	GLEHLPPPPEVSQFPLNPERLQALTDLVSRALEAKHIEPYQGPGNNPIFPVKKPNGKWRFIHDLRATNSLTRDLASPSPGPPDLTSLPQDLPHLRTID LTDAFFQIPLPAVFQPYFAFTLPQPNNHGPGTRYSWRVLPQGFKNSPTLFQQQLSHILAPVRKAFPNSLIIQYMDDILLASPALRELTALTDKVTNALT KEGLPMSLEKTQATPGSIHFLGQVISPDCITYETLPSIHVKSIWSLAELQSMLGELQWVSKGTPVLRSSLHQLYLALRGHRDPRDTIELTSTQVQALK TIQKALALNCRSRLVSQLPILALIILRPTGTTAVLFQTKQKWPLVWLHTPHPATSLRPWGQLLANAIITLDKYSLQHYGQICKSFHHNISNQALTYYLHT SDQSSVAILLQHSHRFHNLGAQPSGPWRSLLQVPQIFQNIDVLRPPFISPVVIDHAPCLFSDGATSKAAFILWDKQVIHQQVLPLPSTCSAQAGELF GLLAGLQKSKPWPALNIFLDSKFLIGHLRRMAWGAFLGPSTQCDLHARLFPLLQGKTVYVHHVRSHTLLQDPISRLNEATDALMLAPLLPL
HTL3P_Q4U0X6_2mutB	GLEHLPPPPEVSQFPLNPERLQALTDLVSRALEAKHIEPYQGPGNNPIFPVKKPNGKWRFIHDLRATNSLTRDLASPSPGPPDLTSPPQDLPHLRTI DLTDAFFQIPLPAVFQPYFAFTLPQPNNHGPGTRYSWRVLPQGFKNSPTLFQQQLSHILAPVRKAFPNSLIIQYMDDILLASPALRELTALTDKVTNAL TKEGLPMSLEKTQATPGSIHFLGQVISPDCITYETLPSIHVKSIWSLAELQSMLGELQWVSKGTPVLRSSLHQLYLALRGHRDPRDTIELTSTQVQAL KTIQKALALNCRSRLVSQLPILALIILRPTGTTAVLFQTKQKWPLVWLHTPHPATSLRPWGQLLANAIITLDKYSLQHYGQICKSFHHNISNQALTYYLH TSDQSSVAILLQHSHRFHNLGAQPSGPWRSLLQVPQIFQNIDVLRPPFISPVVIDHAPCLFSDGATSKAAFILWDKQVIHQQVLPLPSTCSAQAGELF GLLAGLQKSKPWPALNIFLDSKFLIGHLRRMAWGAFLGPSTQCDLHARLFPLLQGKTVYVHHVRSHTLLQDPISRLNEATDALMLAPLLPL
HTLV2_P03363_2mut	HLPPPPQVDQFPLNLPERLQALNDLVSKALEAGHIEPYSGPGNNPVFPVKKPNGKWRFIHDLRATNAITTTLTSPSPGPPDLTSLPTALPHLQTIDLT DAFFQIPLPKQYQPYFAFTIPQPCNYGPGTRYAWTVLPQGFKNSPTLFQQQLAAVLNPMRKMFPTSTIVQYMDDILLASPTNEELQQLSQLTLQALT THGLPISQEKTQQTPGQIRFLGQVISPNHITYESTPTIPIKSQWTLTELQVILGEIQWVSKGTPILRKHLQSLYSALHPYRDPRACITLTPQQLHALHAIQ QALQHNCRGRLNPALPLLGLISLSTSGTTSVIFQPKQNWPLAWLHTPHPPTSLCPWGHLLACTILTLDKYTLQHYGQLCQSFHHNMSKQALCDFLR NSPHPSVGILIHHMGRFHNLGSQPSGPWKTLLHLPTLLQEPRLLRPIFTLSPVVLDTAPCLFSDGSPQKAAYVLWDQTILQQDITPLPSHETHSAQKG ELLALICGLRAAKPWPSLNIFLDSKYLIKYLHSLAIGAFLGTSAHQTLQAALPPLLQGKTIYLHHVRSHTNLPDPISTFNEYTDSLILAPLVPL
JSRV_P31623	PLGTSDSPVTHADPIDWKSEEPVWVDQWPLTQEKLSAAQQLVQEQLRLGHIEPSTSAWNSPIFVIKKKSGKWRLLQDLRKVNETMMHMGALQPGL PTPSAIPDKSYIIVIDLKDCFYTIPLAPQDCKRFAFSLPSVNFKEPMQRYQWRVLPQGMTNSPTLCQKFVATAIAPVRQRFPQLYLVHYMDDILLAHT DEHLLYQAFSILKQHLSLNGLVIADEKIQTHFPYNYLGFSLYPRVYNTQLVKLQTDHLKTLNDFQKLLGDINWIRPYLKLPTYTLQPLFDILKGDSDPAS PRTLSLEGRTALQSIEEAIRQQQITYCDYQRSWGLYILPTPRAPTGVLYQDKPLRWIYLSATPTKHLLPYYELVAKIIAKGRHEAIQYFGMEPPFICVPY ALEQQDWLFQFSDNWSIAFANYPGQITHHYPSDKLLQFASSHAFIFPKIVRRQPIPEATLIFTDGSSNGTAALIINHQTYYAQTSFSSAQVVELFAVHQ ALLTVPTSFNLFTDSSYVVGALQMIETVPIIGTTSPEVLNLFTLIQQVLHCRQHPCFFGHIRAHSTLPGALVQGNHTADVLTKQVFFQS
JSRV_P31623_2mutB	PLGTSDSPVTHADPIDWKSEEPVWVDQWPLTQEKLSAAQQLVQEQLRLGHIEPSTSAWNSPIFVIKKKSGKWRLLQDLRKVNETMMHMGALQPGL PTPSPIPDKSYIIVIDLKDCFYTIPLAPQDCKRFAFSLPSVNFKEPMQRYQWRVLPQGMTNSPTLCQKFVATAIAPVRQRFPQLYLVHYMDDILLAHT DEHLLYQAFSILKQHLSLNGLVIADEKIQTHFPYNYLGFSLYPRVYNTQLVKLQTDHLKTLNDFQKLLGDINWIRPYLKLPTYTLQPLFDILKGDSDPAS PRTLSLEGRTALQSIEEAIRQQQITYCDYQRSWGLYILPTPRAPTGVLYQDKPLRWIYLSATPTKHLLPYYELVAKIIAKGRHEAIQYFGMEPPFICVPY ALEQQDWLFQFSDNWSIAFANYPGQITHHYPSDKLLQFASSHAFIFPKIVRRQPIPEATLIFTDGSSNGTAALIINHQTYYAQTSFSSAQVVELFAVHQ ALLTVPTSFNLFTDSSYVVGALQMIETVPIIGTTSPEVLNLFTLIQQVLHCRQHPCFFGHIRAHSTLPGALVQGNHTADVLTKQVFFQS

【０１１６】

【表２－６】

RT名	RTアミノ酸配列
KORV_Q9TTC1	TLGDQGSRGSDPLPEPRVTLTVEGIPTEFLVNTGAEHSVLTKPMGKMGSKRTVVAGATGSKVYPWTTKRLLKIGQKQVTHSFLVIPECPAPLLGRD LLTKLKAQIQFSTEGPQVTWEDRPAMCLVLNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASPVAVRQYPMSKE AREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQP LFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSAKKAQL CREEVTYLGYLLKGGKRWLTPARKATVMKIPTPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAHQEAFGRIKEALLSAPALA LPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLTLGQNVLVIAPHNLESIVRQPPDRWMTNA RMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRDQPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVWASNLP EGTSAQKAELIALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQRGTDPVATGNRKAD EAAKQAAQSTRILTETTKN
KORV_Q9TTC1_3mut	TLGDQGSRGSDPLPEPRVTLTVEGIPTEFLVNTGAEHSVLTKPMGKMGSKRTVVAGATGSKVYPWTTKRLLKIGQKQVTHSFLVIPECPAPLLGRD LLTKLKAQIQFSTEGPQVTWEDRPAMCLVLNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASPVAVRQYPMSKE AREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQP LFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSAKKAQL CREEVTYLGYLLKGGKRWLTPARKATVMKIPTPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTRPKVPFTWTEAHQEAFGRIKEALLSAPALA LPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLTLGQNVLVIAPHNLESIVRQPPDRWMTNA RMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRDQPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVWASNLP EGTSAQKAELIALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQRGTDPVATGNRKA DEAAKQAAQSTRILTETTKN
KORV_Q9TTC1_3mutA	TLGDQGSRGSDPLPEPRVTLTVEGIPTEFLVNTGAEHSVLTKPMGKMGSKRTVVAGATGSKVYPWTTKRLLKIGQKQVTHSFLVIPECPAPLLGRD LLTKLKAQIQFSTEGPQVTWEDRPAMCLVLNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASPVAVRQYPMSKE AREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQP LFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSAKKAQL CREEVTYLGYLLKGGKRWLTPARKATVMKIPTPTTPRQVREFLGKAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTRPKVPFTWTEAHQEAFGRIKEALLSAPALAL PDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLTLGQNVLVIAPHNLESIVRQPPDRWMTNA RMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRDQPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVWASNLP EGTSAQKAELIALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQRGTDPVATGNRKA DEAAKQAAQSTRILTETTKN
KORV_Q9TTC1-Pro	LLGRDLLTKLKAQIQFSTEGPQVTWEDRPAMCLVLNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASPVAVRQY PMSKEAREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLH PNSQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSA KKAQLCREEVTYLGYLLKGGKRWLTPARKATVMKIPTPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAHQEAFGRIKEALLS APALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLTLGQNVLVIAPHNLESIVRQPPDR WMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRDQPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVW ASNLPEGTSAQKAELIALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQRGTDPVATG NRKADEAAKQAAQSTRILTETTKN
KORV_Q9TTC1-Prc_3mut	LLGRDLLTKLKAQIQFSTEGPQVTWEDRPAMCLVLNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASPVAVRQY PMSKEAREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLH PNSQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSA KKAQLCREEVTYLGYLLKGGKRWLTPARKATVMKIPTPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTRPKVPFTWTEAHQEAFGRIKEALLS APALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLTLGQNVLVIAPHNLESIVRQPPDR WMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRDQPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVW ASNLPEGTSAQKAELIALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQRGTDPVATG NRKADEAAKQAAQSTRILTETTKN
KORV_Q9TTC1-Prc_3mutA	LLGRDLLTKLKAQIQFSTEGPQVTWEDRPAMCLVLNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASPVAVRQY PMSKEAREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLH PNSQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSA KKAQLCREEVTYLGYLLKGGKRWLTPARKATVMKIPTPTTPRQVREFLGTAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTRPKVPFTWTEAHQEAFGRIKEALLS APALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLTLGQNVLVIAPHNLESIVRQPPDR WMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRDQPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTVW ASNLPEGTSAQKAELIALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQRGTDPVATG NRKADEAAKQAAQSTRILTETTKN
MLVAV_P03356	TLNLEDEYRLYETSAEPEVSPGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEAKLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHRWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQGF KNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLLTLGNLGYRASAKKAQLCQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLRKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALN PATLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGK RLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLL
MLVAV_P03356_3mut	TLNLEDEYRLYETSAEPEVSPGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEAKLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHRWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQGF KNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLLTLGNLGYRASAKKAQLCQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLRKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALN PATLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGK RLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLL
MLVAV_P0335	TLNLEDEYRLYETSAEPEVSPGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEAKLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHRWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQGF

【０１１７】

【表２－７】

RT名	RTアミノ酸配列
6_3mutA	KNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLLTLGNLGYRASAKKAQLCQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLRKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALN PATLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGK RLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLL
MLVBM_Q7SVK7	TLGIEDEYRLHETSTEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIQQYPMSHEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKETVMG QPVPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFSWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALNPA TLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAGALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKRL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLL
MLVBM_Q7SVK7	TLGIEDEYRLHETSTEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIQQYPMSHEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKETVMG QPVPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFSWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALNPA TLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAGALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKRL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLL
MLVBM_Q7SVK7_3mut	TLGIEDEYRLHETSTEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIQQYPMSHEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKETVMG QPVPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFSWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALNPA TLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAGALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKRL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLL
MLVBM_Q7SVK7_3mut	TLGIEDEYRLHETSTEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIQQYPMSHEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKETVMG QPVPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFSWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALNPA TLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAGALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKRL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLL
MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS	LGIEDEYRLHETSTEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIQQYPMSHEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKETVMGQ PVPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFSWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGP WRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALNPAT LLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAGALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKRLN VYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLLI
MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS	LGIEDEYRLHETSTEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIQQYPMSHEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLL PVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQGFKN SPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKETVMGQ PVPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFSWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGP WRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALNPAT LLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAGALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKRLN VYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLLI
MLVCB_P08361	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFDEALHRDLAGFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPIPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAFQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGP WRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALNPAT LLPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRSDLMDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNSAEARGNRMADQAAREVATRETPETSTLL
MLVCB_P08361_3mut	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLAGFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPIPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAFQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGP WRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPAT LLPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRSDLMDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNSAEARGNRMADQAAREVATRETPETSTLL
MLVCB_P08361_3mutA	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLAGFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPIPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAFQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGP WRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPAT

【０１１８】

【表２－８】

RT名	RTアミノ酸配列
	LLPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRSDLMDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNSAEARGNRMADQAARE VATRETPETSTLL
MLVF5_P26810	TLNIEDEYRLHETSKGPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAFRQAPLIISLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQSLFAFEWKDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPTPKTPRQLREFLGTAGLCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFKWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDVGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPIVALNPAT LLPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRRAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAAGKKL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNHAEARGNRMADQAAREVATRETPETSTLL
MLVF5_P26810_3mut	TLNIEDEYRLHETSKGPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAFRQAPLIISLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQSLFAFEWKDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPTPKTPRQLREFLGTAGLCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFKWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDVGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPIVALNPAT LLPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRRAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAAGKKLL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNHAEARGNRMADQAAREVATRETPETSTLL
MLVF5_P26810_3mutA	TLNIEDEYRLHETSKGPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAFRQAPLIISLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQSLFAFEWKDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPTPKTPRQLREFLGKAGLCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFKWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGP WRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDVGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPIVALNPATL LPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRRAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAAGKKLN VYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKR_SIIHCPGHQKGNHAEARGNRMADQAAREVATRETPETSTLL
MLVFF_P26809_3mut	TLNIEDEYRLHETSKGPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQSLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLVWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFEWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPIVALNPAT LLPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVVWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNRAEARGNRMADQAARE VATRETPETSTLL
MLVFF_P26809_3mutA	TLNIEDEYRLHETSKGPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQSLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFEWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGP WRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPIVALNPATL LPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVVWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLN VYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKR_SIIHCPGHQKGNRAEARGNRMADQAAREVATRETPETSTLL
MLVMS_P03355	TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPA TLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLL
MLVMS_P03355_3mut	TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPA TLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLL
MLVMS_P03355_3mut	TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPA TLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLL
MLVMS_P0335	TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK

【０１１９】

【表２－９】

RT名	RTアミノ酸配列
5_3mut A_WS	NSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPA TLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLL
MLVMS_P03355_3mutA_WS	TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPA TLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLL
MLVMS_P03355_PLV919	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPA TLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP SGGSKRTADGSEFE
MLVMS_P03355_PLV919	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG QPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPA TLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP SGGSKRTADGSEFE
MLVRD_P11227	TLNIEDEYRLHEISTEPDVSPGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEAKLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQGLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPTSHRWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFASEWRDPGMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFDEALHRGLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLKTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKETVMG QPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPRFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYHEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALNPA TLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTEPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKRL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYKRRGLLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLL
MLVRD_P11227_3mut	TLNIEDEYRLHEISTEPDVSPGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEAKLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQGLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPTSHRWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFASEWRDPGMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRGLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLKTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKETVMG QPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPRFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYHEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLG PWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALNPA TLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTEPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKRL NVYTDSRYAFATAHIHGEIYKRRGWLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLL
MMTVB_P03365	WVQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLNTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDI MKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQD LRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRD KYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKLT TGELKPLFEILNGDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIKG RHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGREPII KENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSLTRI LT
MMTVB_P03365	WVQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLNTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDI MKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQD LRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRD KYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKLT TGELKPLFEILNGDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIKG RHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGREPII KENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSLTRI LT
MMTVB_P03365_2mut	WVQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLNTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDI MKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQD LRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRD KYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKLT TGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIKG RHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGREPII KENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSLTRI LT

【０１２０】

【表２－１０】

RT名	RTアミノ酸配列
MMTVB_P03365_2mut_WS	VQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLDTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGREPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSLTRILTA	10
MMTVB_P03365_2mut_WS	VQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLDTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGREPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSLTRILTA	10
MMTVB_P03365_2mutB	WVQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLNTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAPPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGREPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSLTRILT	20
MMTVB_P03365_2mutB	WVQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLNTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAPPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGREPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSLTRILT	20
MMTVB_P03365_2mutB_WS	VQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLDTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPPAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGREPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSLTRILTA	30
MMTVB_P03365_2mutB_WS	VQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLDTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPPAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGREPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSLTRILTA	30
MMTVB_P03365_WS	VQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLDTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKLTTGELKPLFEILNGDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGREPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSLTRILTA	40
MMTVB_P03365_WS	VQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLDTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKLTTGELKPLFEILNGDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGREPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSLTRILTA	40
MMTVB_P03365-Pro	GRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPF	

【０１２１】

【表２－１１】

RT名	RTアミノ酸配列
	LKLTTGELKPLFEILNGDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQL IIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGR EPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSL TRILT
MMTVB_P03365-Pro	GRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWR LLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAIL TVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPF LKLTTGELKPLFEILNGDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQL IIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGR EPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSL TRILT
MMTVB_P03365-Pro_2mut	GRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWR LLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAIL TVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPF LKLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQL IIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGR EPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSL TRILT
MMTVB_P03365-Pro_2mutB	GRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWR LLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAPPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAIL TVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPF LKLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQL IIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGR EPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSL TRILT
MMTVB_P03365-Pro_2mutB	GRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWR LLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAPPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAIL TVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPF LKLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQL IIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGR EPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSL TRILT
MPMV_P07572	LTAAIDILAPQQQCAEPITWKSDEPVWVDQWPLTNDKLAAAQQLVQEQLEAGHITESSSPWNTPIFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMVLMGALQPG LPSPVAIPQGYLKIIIDLKDCFFSIPLHPSDQKRFAFSLPSTNFKEPMQRFQWKVLPQGMANSPTLCQKYVATAIHKVRHAWKQMYIIHYMDDILIAGK DGQQVLQCFDQLKQELTAAGLHIAPEKVQLQDPYTYLGFELNGPKITNQKAVIRKDKLQTLNDFQKLLGDINWLRPYLKLTTGDLKPLFDTLKGDSD PNSHRSLSKEALASLEKVETAIAEQFVTHINYSLPLIFLIFNTALTPTGLFWQDNPIMWIHLPASPKKVLLPYYDAIADLIILGRDHSKKYFGIEPSTIIQPY SKSQIDWLMQNTEMWPIACASFVGILDNHYPPNKLIQFCKLHTFVFPQIISKTPLNNALLVFTDGSSTGMAAYTLTDTTIKFQTNLNSAQLVELQALIA VLSAFPNQPLNIYTDSAYLAHSIPLLETVAQIKHISETAKLFLQCQQLIYNRSIPFYIGHVRAHSGLPGPIAQGNQRADLATKIVASNINT
MPMV_P07572_2mutB	LTAAIDILAPQQQCAEPITWKSDEPVWVDQWPLTNDKLAAAQQLVQEQLEAGHITESSSPWNTPIFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMVLMGALQPG LPSPVAPPQGYLKIIIDLKDCFFSIPLHPSDQKRFAFSLPSTNFKEPMQRFQWKVLPQGMANSPTLCQKYVATAIHKVRHAWKQMYIIHYMDDILIAG KDGQQVLQCFDQLKQELTAAGLHIAPEKVQLQDPYTYLGFELNGPKITNQKAVIRKDKLQTLNDFQKLLGDINWLRPYLKLTTGDLKPLFDTLKPDS DPNSHRSLSKEALASLEKVETAIAEQFVTHINYSLPLIFLIFNTALTPTGLFWQDNPIMWIHLPASPKKVLLPYYDAIADLIILGRDHSKKYFGIEPSTIIQP YSKSQIDWLMQNTEMWPIACASFVGILDNHYPPNKLIQFCKLHTFVFPQIISKTPLNNALLVFTDGSSTGMAAYTLTDTTIKFQTNLNSAQLVELQALI AVLSAFPNQPLNIYTDSAYLAHSIPLLETVAQIKHISETAKLFLQCQQLIYNRSIPFYIGHVRAHSGLPGPIAQGNQRADLATKIVASNINT
PERV_Q4VFZ2	TLQLDDEYRLYSPLVKPDQNIQFWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASATPVSVRQYPLSKEAQEGIRPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTP LLPVRKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLCALPPQRSWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGF KNSPTIFDEALHRDLANFRIQHPQVTLLQYVDDLLLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREVTYLGYSLRDGQRWLTEARKKTVV QIPAPTTAKQVREFLGTAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAPEHQKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGP WRRPVAYLSKKLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLTLGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPE ETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLTDIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGTRTIWASSLPEGTSAQKAELMALTQALRLAEGKSINIYT DSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGREIKNKEEILSLLEALHLPKRLAIIHCPGHQKAKDPISRGNQMADRVAKQAAQGVNLL
PERV_Q4VFZ2	TLQLDDEYRLYSPLVKPDQNIQFWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASATPVSVRQYPLSKEAQEGIRPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTP LLPVRKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLCALPPQRSWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGF KNSPTIFDEALHRDLANFRIQHPQVTLLQYVDDLLLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREVTYLGYSLRDGQRWLTEARKKTVV QIPAPTTAKQVREFLGTAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAPEHQKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGP WRRPVAYLSKKLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLTLGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPE ETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLTDIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGTRTIWASSLPEGTSAQKAELMALTQALRLAEGKSINIYT DSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGREIKNKEEILSLLEALHLPKRLAIIHCPGHQKAKDPISRGNQMADRVAKQAAQGVNLL

【０１２２】

【表２－１２】

RT名	RTアミノ酸配列
PERV_Q4VFZ2_3mut	TLQLDDEYRLYSPLVKPDQNIQFWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASATPVSVRQYPLSKEAQEGIRPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLLPVRKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLCALPPQRSWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFNEALHRDLANFRIQHPQVTLLQYVDDLLLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREVTYLGYSLRDGQRWLTEARKKTVVQIPAPTTAKQVREFLGTAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKPKGEFSWAPEHQKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLTLGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLTDIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGTRTIWASSLPEGTSAQKAELMALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGREIKNKEEILSLLEALHLPKRLAIIHCPGHQKAKDPISRGNQMADRVAKQAAQGVNLL	10
PERV_Q4VFZ2_3mut	TLQLDDEYRLYSPLVKPDQNIQFWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASATPVSVRQYPLSKEAQEGIRPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLLPVRKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLCALPPQRSWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFNEALHRDLANFRIQHPQVTLLQYVDDLLLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREVTYLGYSLRDGQRWLTEARKKTVVQIPAPTTAKQVREFLGTAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKPKGEFSWAPEHQKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLTLGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLTDIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGTRTIWASSLPEGTSAQKAELMALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGREIKNKEEILSLLEALHLPKRLAIIHCPGHQKAKDPISRGNQMADRVAKQAAQGVNLL	
PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS	LDDEYRLYSPLVKPDQNIQFWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASATPVSVRQYPLSKEAQEGIRPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLLPVRKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLCALPPQRSWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFNEALHRDLANFRIQHPQVTLLQYVDDLLLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREVTYLGYSLRDGQRWLTEARKKTVVQIPAPTTAKQVREFLGKAGFCRLFIPGFATLAAPLYPLTKPKGEFSWAPEHQKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLTLGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLTDIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGTRTIWASSLPEGTSAQKAELMALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGREIKNKEEILSLLEALHLPKRLAIIHCPGHQKAKDPISRGNQMADRVAKQAAQGVNLLP	
PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS	LDDEYRLYSPLVKPDQNIQFWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASATPVSVRQYPLSKEAQEGIRPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLLPVRKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLCALPPQRSWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFKNSPTIFNEALHRDLANFRIQHPQVTLLQYVDDLLLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREVTYLGYSLRDGQRWLTEARKKTVVQIPAPTTAKQVREFLGKAGFCRLFIPGFATLAAPLYPLTKPKGEFSWAPEHQKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLTLGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLTDIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGTRTIWASSLPEGTSAQKAELMALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGREIKNKEEILSLLEALHLPKRLAIIHCPGHQKAKDPISRGNQMADRVAKQAAQGVNLLPP	
SFV1_P23074	MDPLQLLQPLEAEIKGTKLKAHWNSGATITCVPEAFLEDERPIQTMLIKTIHGEKQQDVYYLTFKVQGRKVEAEVLASPYDYILLNPSDVPWLMKKPLQLTVLVPLHEYQERLLQQTALPKEQKELLQKLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHNIATGTLAPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLIQQNSTMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIYRGKYKTTLDLTNGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFLNSPALFTADVVDLLKEIPNVQAYVDDIYISHDDPQEHLEQLEKIFSILLNAGYVVSLKKSEIAQREVEFLGFNITKEGRGLTDTFKQKLLNITPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNYSELVKPLYTIVANANGKFISWTEDNSNQLQHIISVLNQADNLEERNPETRLIIKVNSSPSAGYIRYYNEGSKRPIMYVNYIFSKAEAKFTQTEKLLTTMHKGLIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQRTPLPERKALPVRWITWMTYLEDPRIQFHYDKSLPELQQIPNVTEDVIAKTKHPSEFAMVFYTDGSAIKHPDVNKSHSAGMGIAQVQFIPEYKIVHQWSIPLGDHTAQLAEIAAVEFACKKALKISGPVLIVTDSFYVAESANKELPYWKSNGFLNNKKKPLRHVSKWKSIAECLQLKPDIIIMHEKGHQQPMTTLHTEGNNLADKLATQGSYVVH	20
SFV1_P23074_2mut	MDPLQLLQPLEAEIKGTKLKAHWNSGATITCVPEAFLEDERPIQTMLIKTIHGEKQQDVYYLTFKVQGRKVEAEVLASPYDYILLNPSDVPWLMKKPLQLTVLVPLHEYQERLLQQTALPKEQKELLQKLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHNIATGTLAPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLIQQNSTMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIYRGKYKTTLDLTNGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFLNSPALFNADVVDLLKEIPNVQAYVDDIYISHDDPQEHLEQLEKIFSILLNAGYVVSLKKSEIAQREVEFLGFNITKEGRGLTDTFKQKLLNITPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNYSELVKPLYTIVAPANGKFISWTEDNSNQLQHIISVLNQADNLEERNPETRLIIKVNSSPSAGYIRYYNEGSKRPIMYVNYIFSKAEAKFTQTEKLLTTMHKGLIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQRTPLPERKALPVRWITWMTYLEDPRIQFHYDKSLPELQQIPNVTEDVIAKTKHPSEFAMVFYTDGSAIKHPDVNKSHSAGMGIAQVQFIPEYKIVHQWSIPLGDHTAQLAEIAAVEFACKKALKISGPVLIVTDSFYVAESANKELPYWKSNGFLNNKKKPLRHVSKWKSIAECLQLKPDIIIMHEKGHQQPMTTLHTEGNNLADKLATQGSYVVH	
SFV1_P23074_2mutA	MDPLQLLQPLEAEIKGTKLKAHWNSGATITCVPEAFLEDERPIQTMLIKTIHGEKQQDVYYLTFKVQGRKVEAEVLASPYDYILLNPSDVPWLMKKPLQLTVLVPLHEYQERLLQQTALPKEQKELLQKLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHNIATGTLAPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLIQQNSTMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIYRGKYKTTLDLTNGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFLNSPALFNADVVDLLKEIPNVQAYVDDIYISHDDPQEHLEQLEKIFSILLNAGYVVSLKKSEIAQREVEFLGFNITKEGRGLTDTFKQKLLNITPPKDLKQLQSILGKLNFARNFIPNYSELVKPLYTIVAPANGKFISWTEDNSNQLQHIISVLNQADNLEERNPETRLIIKVNSSPSAGYIRYYNEGSKRPIMYVNYIFSKAEAKFTQTEKLLTTMHKGLIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQRTPLPERKALPVRWITWMTYLEDPRIQFHYDKSLPELQQIPNVTEDVIAKTKHPSEFAMVFYTDGSAIKHPDVNKSHSAGMGIAQVQFIPEYKIVHQWSIPLGDHTAQLAEIAAVEFACKKALKISGPVLIVTDSFYVAESANKELPYWKSNGFLNNKKKPLRHVSKWKSIAECLQLKPDIIIMHEKGHQQPMTTLHTEGNNLADKLATQGSYVVH	
SFV1_P23074-Pro	VPWLMKKPLQLTVLVPLHEYQERLLQQTALPKEQKELLQKLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHNIATGTLAPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLIQQNSTMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIYRGKYKTTLDLTNGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFLNSPALFTADVVDLLKEIPNVQAYVDDIYISHDDPQEHLEQLEKIFSILLNAGYVVSLKKSEIAQREVEFLGFNITKEGRGLTDTFKQKLLNITPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNYSELVKPLYTIVANANGKFISWTEDNSNQLQHIISVLNQADNLEERNPETRLIIKVNSSPSAGYIRYYNEGSKRPIMYVNYIFSKAEAKFTQTEKLLTTMHKGLIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQRTPLPERKALPVRWITWMTYLEDPRIQFHYDKSLPELQQIPNVTEDVIAKTKHPSEFAMVFYTDGSAIKHPDVNKSHSAGMGIAQVQFIPEYKIVHQWSIPLGDHTAQLAEIAAVEFACKKALKISGPVLIVTDSFYVAESANKELPYWKSNGFLNNKKKPLRHVSKWKSIAECLQLKPDIIIMHEKGHQQPMTTLHTEGNNLADKLATQGSYVVH	
SFV1_P23074-Pro_2mut	VPWLMKKPLQLTVLVPLHEYQERLLQQTALPKEQKELLQKLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHNIATGTLAPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLIQQNSTMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIYRGKYKTTLDLTNGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFLNSPALFNADVVDLLKEIPNVQAYVDDIYISHDDPQEHLEQLEKIFSILLNAGYVVSLKKSEIAQREVEFLGFNITKEGRGLTDTFKQKLLNITPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNYSELVKPLYTIVAPANGKFISWTEDNSNQLQHIISVLNQADNLEERNPETRLIIKVNSSPSAGYIRYYNEGSKRPIMYVNYIFSKAEAKFTQTEKLLTTMHKGLIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQRTPLPERKALPVRWITWMTYLEDPRIQFHYDKSLPELQQIPNVTEDVIAKTKHPSEFAMVFYTDGSAIKHPDVNKSHSAGMGIAQVQFIPEYKIVHQWSIPLGDHTAQLAEIAAVEFACKKALKISGPVLIVTDSFYVAESANKELPYWKSNGFLNNKKKPLRHVSKWKSIAECLQLKPDIIIMHEKGHQQPMTTLHTEGNNLADKLATQGSYVVH	

【０１２３】

【表２－１３】

RT名	RTアミノ酸配列
SFV1_P23074-Prc_2mutA	VPWLMKKPLQLTVLVPLHEYQERLLQQTALPKEQKELLQKLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHNIATGTLAPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLK QGVLIQQNSTMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIYRGKYKTTLDLTNGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTR LPQGFLNSPALFNADVVDLLKEIPNVQAYVDDIYISHDDPQEHLEQLEKIFSILLNAGYVVSLKKSEIAQREVEFLGFNITKEGRGLTDTFKQKLLNITPP KDLKQLQSILGKLNFARNFIPNYSELVKPLYTIVAPANGKFISWTEDNSNQLQHIISVLNQADNLEERNPETRLIIKVNSSPSAGYIRYYNEGSKRPIMY VNYIFSKAEAKFTQTEKLLTTMHKGLIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQRTPLPERKALPVRWITWMTYLEDPRIQFHYDKSLPELQQIPNVTEDVI AKTKHPSEFAMVFYTDGSAIKHPDVNKSHSAGMGIAQVQRIPEYKIVHQWSIPLGDHTAQLAEIAAVEFACKKALKISGPVLIVTDSFYVAESANKELP YWKSNGFLNNKKKPLRHVSKWKSIAECLQLKPDIIIIMHEKGHQQPMTTLHTEGNNLADKLATQGSYVVH
SFV3L_P27401	MDPLQLLQPLEAEIKGTKLKAHWNSGATITCVPQAFLEEEVPIKNIWIKTIHGEKEQPVYYLTFKIQGRKVEAEVISSPYDYILVSPSDIPWLMKKPLQL TTLVPLQEYEERLLKQTMLTGSYKEKLQSLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHHIATGTVNPRPQKQYPINPKAKASIQTVINDLLKQGVLIQQNSIM NTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIFRGKYKTTLDLSNGFWAHSITPESYWLTAFTWLGQQYCWTRLPQGFLNSPAL FTADVVDLLKEVPNVQVYVDDIYISHDDPREHLEQLEKVFSLLLNAGYVVSLKKSEIAQHEVEFLGFNITKEGRGLTETFKQKLLNITPPRDLKQLQSIL GLLNFARNFIPNFSELVKPLYNIIATANGKYITWTTDNSQQLQNIISMLNSAENLEERNPEVRLIMKVNTSPSAGYIRFYNEFAKRPIMYLNYVYTKAEV KFTNTEKLLTTIHKGLIKALDLGMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMSYLEDPRIQFHYDKTLPELQQVPTVTDDIIAKIKHPSEFSMV FYTDGSAIKHPNVNKSHNAGMGIAQVQFKPEFTVINTWSIPLGDHTAQLAEVAAVEFACKKALKIDGPVLIVTDSFYVAESVNKELPYWQSNGFFNN KKKPLKHVSKWKSIADCIQLKPDIIIIHEKGHQPTASTFHTEGNNLADKLATQGSYVVN
SFV3L_P27401_2mut	MDPLQLLQPLEAEIKGTKLKAHWNSGATITCVPQAFLEEEVPIKNIWIKTIHGEKEQPVYYLTFKIQGRKVEAEVISSPYDYILVSPSDIPWLMKKPLQL TTLVPLQEYEERLLKQTMLTGSYKEKLQSLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHHIATGTVNPRPQKQYPINPKAKASIQTVINDLLKQGVLIQQNSIM NTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIFRGKYKTTLDLSNGFWAHSITPESYWLTAFTWLGQQYCWTRLPQGFLNSPAL FNADVVDLLKEVPNVQVYVDDIYISHDDPREHLEQLEKVFSLLLNAGYVVSLKKSEIAQHEVEFLGFNITKEGRGLTETFKQKLLNITPPRDLKQLQSIL GLLNFARNFIPNFSELVKPLYNIIATAPGKYITWTTDNSQQLQNIISMLNSAENLEERNPEVRLIMKVNTSPSAGYIRFYNEFAKRPIMYLNYVYTKAEV KFTNTEKLLTTIHKGLIKALDLGMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMSYLEDPRIQFHYDKTLPELQQVPTVTDDIIAKIKHPSEFSMV FYTDGSAIKHPNVNKSHNAGMGIAQVQFKPEFTVINTWSIPLGDHTAQLAEVAAVEFACKKALKIDGPVLIVTDSFYVAESVNKELPYWQSNGFFNN KKKPLKHVSKWKSIADCIQLKPDIIIIHEKGHQPTASTFHTEGNNLADKLATQGSYVVN
SFV3L_P27401_2mutA	MDPLQLLQPLEAEIKGTKLKAHWNSGATITCVPQAFLEEEVPIKNIWIKTIHGEKEQPVYYLTFKIQGRKVEAEVISSPYDYILVSPSDIPWLMKKPLQL TTLVPLQEYEERLLKQTMLTGSYKEKLQSLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHHIATGTVNPRPQKQYPINPKAKASIQTVINDLLKQGVLIQQNSIM NTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIFRGKYKTTLDLSNGFWAHSITPESYWLTAFTWLGQQYCWTRLPQGFLNSPAL FNADVVDLLKEVPNVQVYVDDIYISHDDPREHLEQLEKVFSLLLNAGYVVSLKKSEIAQHEVEFLGFNITKEGRGLTETFKQKLLNITPPRDLKQLQSIL GKLNFARNFIPNFSELVKPLYNIIATAPGKYITWTTDNSQQLQNIISMLNSAENLEERNPEVRLIMKVNTSPSAGYIRFYNEFAKRPIMYLNYVYTKAEV KFTNTEKLLTTIHKGLIKALDLGMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMSYLEDPRIQFHYDKTLPELQQVPTVTDDIIAKIKHPSEFSMV FYTDGSAIKHPNVNKSHNAGMGIAQVQFKPEFTVINTWSIPLGDHTAQLAEVAAVEFACKKALKIDGPVLIVTDSFYVAESVNKELPYWQSNGFFNN KKKPLKHVSKWKSIADCIQLKPDIIIIHEKGHQPTASTFHTEGNNLADKLATQGSYVVN
SFV3L_P27401-Pro	IPWLMKKPLQLTTLVPLQEYEERLLKQTMLTGSYKEKLQSLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHHIATGTVNPRPQKQYPINPKAKASIQTVINDLLK QGVLIQQNSIMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIFRGKYKTTLDLSNGFWAHSITPESYWLTAFTWLGQQYCWTR LPQGFLNSPALFTADVVDLLKEVPNVQVYVDDIYISHDDPREHLEQLEKVFSLLLNAGYVVSLKKSEIAQHEVEFLGFNITKEGRGLTETFKQKLLNIT PPRDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFSELVKPLYNIIATANGKYITWTTDNSQQLQNIISMLNSAENLEERNPEVRLIMKVNTSPSAGYIRFYNEFAKRPI MYLNYVYTKAEVKFTNTEKLLTTIHKGLIKALDLGMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMSYLEDPRIQFHYDKTLPELQQVPTVTDDII AKIKHPSEFSMVFYTDGSAIKHPNVNKSHNAGMGIAQVQFKPEFTVINTWSIPLGDHTAQLAEVAAVEFACKKALKIDGPVLIVTDSFYVAESVNKEL PYWQSNGFFNNKKKPLKHVSKWKSIADCIQLKPDIIIIHEKGHQPTASTFHTEGNNLADKLATQGSYVVN
SFV3L_P27401-Prc_2mut	IPWLMKKPLQLTTLVPLQEYEERLLKQTMLTGSYKEKLQSLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHHIATGTVNPRPQKQYPINPKAKASIQTVINDLLK QGVLIQQNSIMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIFRGKYKTTLDLSNGFWAHSITPESYWLTAFTWLGQQYCWTR LPQGFLNSPALFNADVVDLLKEVPNVQVYVDDIYISHDDPREHLEQLEKVFSLLLNAGYVVSLKKSEIAQHEVEFLGFNITKEGRGLTETFKQKLLNIT PPRDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFSELVKPLYNIIATAPGKYITWTTDNSQQLQNIISMLNSAENLEERNPEVRLIMKVNTSPSAGYIRFYNEFAKRPI MYLNYVYTKAEVKFTNTEKLLTTIHKGLIKALDLGMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMSYLEDPRIQFHYDKTLPELQQVPTVTDDII AKIKHPSEFSMVFYTDGSAIKHPNVNKSHNAGMGIAQVQFKPEFTVINTWSIPLGDHTAQLAEVAAVEFACKKALKIDGPVLIVTDSFYVAESVNKEL PYWQSNGFFNNKKKPLKHVSKWKSIADCIQLKPDIIIIHEKGHQPTASTFHTEGNNLADKLATQGSYVVN
SFV3L_P27401-Prc_2mutA	IPWLMKKPLQLTTLVPLQEYEERLLKQTMLTGSYKEKLQSLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHHIATGTVNPRPQKQYPINPKAKASIQTVINDLLK QGVLIQQNSIMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIFRGKYKTTLDLSNGFWAHSITPESYWLTAFTWLGQQYCWTR LPQGFLNSPALFNADVVDLLKEVPNVQVYVDDIYISHDDPREHLEQLEKVFSLLLNAGYVVSLKKSEIAQHEVEFLGFNITKEGRGLTETFKQKLLNIT PPRDLKQLQSILGKLNFARNFIPNFSELVKPLYNIIATAPGKYITWTTDNSQQLQNIISMLNSAENLEERNPEVRLIMKVNTSPSAGYIRFYNEFAKRPI MYLNYVYTKAEVKFTNTEKLLTTIHKGLIKALDLGMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMSYLEDPRIQFHYDKTLPELQQVPTVTDDII AKIKHPSEFSMVFYTDGSAIKHPNVNKSHNAGMGIAQVQFKPEFTVINTWSIPLGDHTAQLAEVAAVEFACKKALKIDGPVLIVTDSFYVAESVNKEL PYWQSNGFFNNKKKPLKHVSKWKSIADCIQLKPDIIIIHEKGHQPTASTFHTEGNNLADKLATQGSYVVN
SFVCP_Q87040	MNPLQLLQPLPAEVKGTKLLAHWNSGATITCIPESFLEDEQPIKQTLIKTIHGEKQQNVYYLTFKVKGRKVEAEVIASPYEYILLSPTDVPWLTQQPLQ LTILVPLQEYQDRILNKTALPEEQKQQLKALFTKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLTPQNST MNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPDSYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFLNSP ALFTADAVDLLKEVPNVQVYVDDIYLSHDNPHEHIQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQRTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNVTPPKDLKQLQ SILGLLNFARNFIPNFAELVQTLYNLIASSKGKYIEWTEDNTKQLNKVIEALNTASNLEERLPDQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNESGKKPIMYLNYVFSK AELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYTSSIPPLKHPSQ YEGVFCTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHAIYNPEYKILNQWSIPLGHHTAQMAEIAAVEFACKKALKVPGPVLVITDSFYVAESANKELPYWKSNGF VNNKKEPLKHISKWKSIAECLSIKPDITIQHEKGHQPINTSIHTEGNALADKLATQGSYVVN
SFVCP_Q87040_2mut	MNPLQLLQPLPAEVKGTKLLAHWNSGATITCIPESFLEDEQPIKQTLIKTIHGEKQQNVYYLTFKVKGRKVEAEVIASPYEYILLSPTDVPWLTQQPLQ LTILVPLQEYQDRILNKTALPEEQKQQLKALFTKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLTPQNST MNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPDSYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFLNSP ALFNADAVDLLKEVPNVQVYVDDIYLSHDNPHEHIQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQRTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNVTPPKDLKQLQ SILGLLNFARNFIPNFAELVQTLYNLIASSPGKYIEWTEDNTKQLNKVIEALNTASNLEERLPDQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNESGKKPIMYLNYVFSK AELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYTSSIPPLKHPSQ

【０１２４】

【表２－１４】

RT名	RTアミノ酸配列
	YEGVFCTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHAIYNPEYKILNQWSIPLGHHTAQMAEIAAVEFACKKALKVPGPVLVITDSFYVAESANKELPYWKSNGF VNNKKEPLKHISKWKSIAECLSIKPDITIQHEKGHQPINTSIHTEGNALADKLATQGSYVVN
SFVCP_Q87040_2mutA	MNPLQLLQPLPAEVKGTKLAHWNSGATITCIPESFLEDEQPIKQTLIKTIHGEKQQNVYYLTFKVKGRKVEAEVIASPYEYILLSPTDVPWLTQQPLQ LTILVPLQEYQDRILNKTALPEEQKQQLKALFTKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLTPQNST MNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPDSYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFLNSP ALFNADAVDLLKEVPNVQVYVDDIYLSHDNPHEHIQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQRTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNVTPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFAELVQTLYNLIASSKGKYIEWTEDNTKQLNKVIEALNTASNLEERLPDQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNESGKKPIMYLNYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYTQYEGVFCTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHAIYNPEYKILNQWSIPLGHHTAQMAEIAAVEFACKKALKVPGPVLVITDSFYVAESANKELPYWKSN GFVNNKKEPLKHISKWKSIAECLSIKPDITIQHEKGHQPINTSIHTEGNALADKLATQGSYVVN
SFVCP_Q87040-Pro	VPWLTQQPLQLTILVPLQEYQDRILNKTALPEEQKQQLKALFTKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLK QGVLTPQNSTMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPDSYWLTAFTWQGKQYCWT RLPQGFLNSPALFTADAVDLLKEVPNVQVYVDDIYLSHDNPHEHIQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQRTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNV TPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFAELVQTLYNLIASSKGKYIEWTEDNTKQLNKVIEALNTASNLEERLPDQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNESGKK PIMYLNYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYT SSIPPLKHPSQYEGVFCTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHAIYNPEYKILNQWSIPLGHHTAQMAEIAAVEFACKKALKVPGPVLVITDSFYVAESAN KELPYWKSNGFVNNKKEPLKHISKWKSIAECLSIKPDITIQHEKGHQPINTSIHTEGNALADKLATQGSYVVN
SFVCP_Q87040-Pro_2mut	VPWLTQQPLQLTILVPLQEYQDRILNKTALPEEQKQQLKALFTKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLK QGVLTPQNSTMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPDSYWLTAFTWQGKQYCWT RLPQGFLNSPALFNADAVDLLKEVPNVQVYVDDIYLSHDNPHEHIQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQRTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLN VTPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFAELVQTLYNLIASSPGKYIEWTEDNTKQLNKVIEALNTASNLEERLPDQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNESGK KPIMYLNYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVY TSSIPPLKHPSQYEGVFCTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHAIYNPEYKILNQWSIPLGHHTAQMAEIAAVEFACKKALKVPGPVLVITDSFYVAESAN KELPYWKSNGFVNNKKEPLKHISKWKSIAECLSIKPDITIQHEKGHQPINTSIHTEGNALADKLATQGSYVVN
SFVCP_Q87040-Pro_2mutA	VPWLTQQPLQLTILVPLQEYQDRILNKTALPEEQKQQLKALFTKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLK QGVLTPQNSTMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPDSYWLTAFTWQGKQYCWT RLPQGFLNSPALFNADAVDLLKEVPNVQVYVDDIYLSHDNPHEHIQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQRTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLN VTPPKDLKQLQSILGKLNFARNFIPNFAELVQTLYNLIASSPGKYIEWTEDNTKQLNKVIEALNTASNLEERLPDQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNESGK KPIMYLNYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVY TSSIPPLKHPSQYEGVFCTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHAIYNPEYKILNQWSIPLGHHTAQMAEIAAVEFACKKALKVPGPVLVITDSFYVAESAN KELPYWKSNGFVNNKKEPLKHISKWKSIAECLSIKPDITIQHEKGHQPINTSIHTEGNALADKLATQGSYVVN
SMRVH_P03364	PRSRAIDIPVPHADKISWKITDPVWVDQWPLTYEKTLAAIALVQEQLAAGHIEPTNSPWNTPIFIIKKKSGSWRLLQDLRAVNKVMVPMGALQPGLPS PVAIPLNYHKIVIDLKDCFFTIPLHPEDRPYFAFSVPQINFQSPMPRYQWKVLPQGMANSPTLCQKFVAAAIAPVRSQWPEAYILHYMDDILLACDSA EAAKACYAHIISCLTSYGLKIAPDKVQVSEPFSYLGFELHHQQVFTPRVCLKTDHLKTLNDFQKLLGDIQWLRPYLKLPTSALVPLNNILKGDPNPLSV RALTPEAKQSLALINKAIQNQSVQQISYNLPLVLLLLPTPHTPTAVFWQPNGTDPTKNGSPLLWLHLPASPSKVLLTYPSLLAMLIIKGRYTGRQLFGR DPHSIIIPYTQDQLTWLLQTSDEWAIALSSFTGDIDNHYPSDPVIQFAKLHQFIFPKITKCAPIPQATLVFTDGSSNGIAAYVIDNQPISIKSPYLSAQLVE LYAILQVFTVLAHQPFNLYTDSAYIAQSVPLLETVPFIKSSTNATPLFSKLQQLILNRQHPFFIGHLRAHLNLPGPLAEGNALADAATQIFPIISD
SMRVH_P03364_2mut	PRSRAIDIPVPHADKISWKITDPVWVDQWPLTYEKTLAAIALVQEQLAAGHIEPTNSPWNTPIFIIKKKSGSWRLLQDLRAVNKVMVPMGALQPGLPS PVAIPLNYHKIVIDLKDCFFTIPLHPEDRPYFAFSVPQINFQSPMPRYQWKVLPQGMANSPTLCQKFVAAAIAPVRSQWPEAYILHYMDDILLACDSA EAAKACYAHIISCLTSYGLKIAPDKVQVSEPFSYLGFELHHQQVFTPRVCLKTDHLKTLNDFQKLLGDIQWLRPYLKLPTSALVPLNNILKPDPNPLSV RALTPEAKQSLALINKAIQNQSVQQISYNLPLVLLLLPTPHTPTAVFWQPNGTDPTKNGSPLLWLHLPASPSKVLLTYPSLLAMLIIKGRYTGRQLFGR DPHSIIIPYTQDQLTWLLQTSDEWAIALSSFTGDIDNHYPSDPVIQFAKLHQFIFPKITKCAPIPQATLVFTDGSSNGIAAYVIDNQPISIKSPYLSAQLVE LYAILQVFTVLAHQPFNLYTDSAYIAQSVPLLETVPFIKSSTNATPLFSKLQQLILNRQHPFFIGHLRAHLNLPGPLAEGNALADAATQIFPIISD
SMRVH_P03364_2mutB	PRSRAIDIPVPHADKISWKITDPVWVDQWPLTYEKTLAAIALVQEQLAAGHIEPTNSPWNTPIFIIKKKSGSWRLLQDLRAVNKVMVPMGALQPGLPS PVAPPLNYHKIVIDLKDCFFTIPLHPEDRPYFAFSVPQINFQSPMPRYQWKVLPQGMANSPTLCQKFVAAAIAPVRSQWPEAYILHYMDDILLACDSA EAAKACYAHIISCLTSYGLKIAPDKVQVSEPFSYLGFELHHQQVFTPRVCLKTDHLKTLNDFQKLLGDIQWLRPYLKLPTSALVPLNNILKPDPNPLSV RALTPEAKQSLALINKAIQNQSVQQISYNLPLVLLLLPTPHTPTAVFWQPNGTDPTKNGSPLLWLHLPASPSKVLLTYPSLLAMLIIKGRYTGRQLFGR DPHSIIIPYTQDQLTWLLQTSDEWAIALSSFTGDIDNHYPSDPVIQFAKLHQFIFPKITKCAPIPQATLVFTDGSSNGIAAYVIDNQPISIKSPYLSAQLVE LYAILQVFTVLAHQPFNLYTDSAYIAQSVPLLETVPFIKSSTNATPLFSKLQQLILNRQHPFFIGHLRAHLNLPGPLAEGNALADAATQIFPIISD
SRV2_P51517	LATAVDILAPQRYADPITWKSDEPVWVDQWPLTQEKLAAAQQLVQEQLQAGHIIESNSPWNTPIFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMVLMGALQPG LPSPVAIPQGYFKIVIDLKDCFFTIPLQPVDQKRFAFSLPSTNFKQPMKRYQWKVLPQGMANSPTLCQKYVAAAIEPVRKSWAQMYIIHYMDDILIAG KLGEQVLQCFAQLKQALTTTGLQIAPEKVQLQDPYTYLGFQINGPKITNQKAVIRRDKLQTLNDFQKLLGDINWLRPYLHLTTGDLKPLFDILKGDSN PNSPRSLSEAALASLQKVETAIAEQFVTQIDYTQPLTFLIFNTTLTPTGLFWQNNPVMWVHLPASPKKVLLPYYDAIADLIILGRDNSKKYFGLEPSTI QPYSKSQIHWLMQNTETWPIACASYAGNIDNHYPPNKLIQFCKLHAVVFPRIISKTPLDNALLVFTDGSSTGIAAYTFEKTTVRFKTSHTSAQLVELQA LIAVLSAFPHRALNVYTDSAYLAHSIPLLETVSHIKHISDTAKFFLQCQQLIYNRSIPFYLGHIRAHSGLPGPLSQGNHITDLATKVVATTLTT
SRV2_P51517_2mutB	LATAVDILAPQRYADPITWKSDEPVWVDQWPLTQEKLAAAQQLVQEQLQAGHIIESNSPWNTPIFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMVLMGALQPG LPSPVAPPQGYFKIVIDLKDCFFTIPLQPVDQKRFAFSLPSTNFKQPMKRYQWKVLPQGMANSPTLCQKYVAAAIEPVRKSWAQMYIIHYMDDILIAG KLGEQVLQCFAQLKQALTTTGLQIAPEKVQLQDPYTYLGFQINGPKITNQKAVIRRDKLQTLNDFQKLLGDINWLRPYLHLTTGDLKPLFDILKGDSN PNSPRSLSEAALASLQKVETAIAEQFVTQIDYTQPLTFLIFNTTLTPTGLFWQNNPVMWVHLPASPKKVLLPYYDAIADLIILGRDNSKKYFGLEPSTI QPYSKSQIHWLMQNTETWPIACASYAGNIDNHYPPNKLIQFCKLHAVVFPRIISKTPLDNALLVFTDGSSTGIAAYTFEKTTVRFKTSHTSAQLVELQA LIAVLSAFPHRALNVYTDSAYLAHSIPLLETVSHIKHISDTAKFFLQCQQLIYNRSIPFYLGHIRAHSGLPGPLSQGNHITDLATKVVATTLTT
WDSV_O92815	SCQTKNTLNIDEYLLQFPDQLWASLPTDIGRMLVPPITIKIKDNASLPSIRQYPLPKDKTEGLRPLISSLENQGILIKCHSPCNTPIFPIKKAGRDEYRMI HDLRAINNIVAPLTAVVASPTTVLSNLAPSLHWFTVIDLSNAFFSVPIHKDSQYLFAFTFEGHQYTWTVLPQGFIHSPTLFSQALYQSLHKIKFKISSEIC IYMDDVLIASKDRDTNLKDTAVMLQHLASEGHKVSKKKLQLCQQEVVYLGQLLTPEGRKILPDRKVTVSQFQQPTTIRQIRAFLGLVGYCRHWIPEF SIHSKFLEKQLKKDTAEPFQLDDQQVEAFNKLKHAITTAPVLVVPDPAKPFQLYTSHSEHASIAVLTQKHAGRTRPIAFLSSKFDAIESGLPPCLKACA SIHRSLTQADSFILGAPLIIYTTHAICTLLQRDRSQLVTASRFSKWEADLLRPELTFVACSAVSPAHLYMQSCENNIPPHDCVLLTHTISRPRPDLSDLP

【０１２５】

【表２－１５】

RT名	RTアミノ酸配列
	IPDPDMTLFSDGSYTTGRGGAAVVMHRPVTDDFIIIHQQPGGASAQTAELLALAAACHLATDKTVNIYTDSRYAYGVVHDFGHLWMHRGFVTSAGT PIKNHKEIEYLLKQIMKPKQVSVIKIEAHTKGVSMEVRGNAAADEAAKNAVFLVQR
WDSV_O92815_2mut	SCQTKNTLNIDEYLLQFPDQLWASLPTDIGRMLVPPITIKIKDNASLPSIRQYPLPKDKTEGLRPLISSLENQGILIKCHSPCNTPIFPIKKAGRDEYRMI HDLRAINNIVAPLTAVVASPTTVLSNLAPSLHWFTVIDLSNAFFSVPIHKDSQYLFAFTFEGHQYTWTVLPQGFIHSPTLFNQALYQSLHKIKFKISSEIC IYMDDVLIASKDRDTNLKDTAVMLQHLASEGHKVSKKKLQLCQQEVVYLGQLLTPEGRKILPDRKVTVSQFQQPTTIRQIRAFLGLVGYCRHWIPEF SIHSKFLEKQLKPDTAEPFQLDDQQVEAFNKLKHAITTAPVLVVPDPAKPFQLYTSHSEHASIAVLTQKHAGRTRPIAFLSSKFDAIESGLPPCLKACA SIHRSLTQADSFILGAPLIIYTTHAICTLLQRDRSQLVTASRFSKWEADLLRPELTFVACSAVSPAHLYMQSCENNIPPHDCVLLTHTISRPRPDLSDLP IPDPDMTLFSDGSYTTGRGGAAVVMHRPVTDDFIIIHQQPGGASAQTAELLALAAACHLATDKTVNIYTDSRYAYGVVHDFGHLWMHRGFVTSAGT PIKNHKEIEYLLKQIMKPKQVSVIKIEAHTKGVSMEVRGNAAADEAAKNAVFLVQR
WDSV_O92815_2mutA	SCQTKNTLNIDEYLLQFPDQLWASLPTDIGRMLVPPITIKIKDNASLPSIRQYPLPKDKTEGLRPLISSLENQGILIKCHSPCNTPIFPIKKAGRDEYRMI HDLRAINNIVAPLTAVVASPTTVLSNLAPSLHWFTVIDLSNAFFSVPIHKDSQYLFAFTFEGHQYTWTVLPQGFIHSPTLFNQALYQSLHKIKFKISSEIC IYMDDVLIASKDRDTNLKDTAVMLQHLASEGHKVSKKKLQLCQQEVVYLGQLLTPEGRKILPDRKVTVSQFQQPTTIRQIRAFLGKVGYCRHFIPEFS IHSKFLEKQLKPDTAEPFQLDDQQVEAFNKLKHAITTAPVLVVPDPAKPFQLYTSHSEHASIAVLTQKHAGRTRPIAFLSSKFDAIESGLPPCLKACASI HRSLTQADSFILGAPLIIYTTHAICTLLQRDRSQLVTASRFSKWEADLLRPELTFVACSAVSPAHLYMQSCENNIPPHDCVLLTHTISRPRPDLSDLPIP DPDMTLFSDGSYTTGRGGAAVVMHRPVTDDFIIIHQQPGGASAQTAELLALAAACHLATDKTVNIYTDSRYAYGVVHDFGHLWMHRGFVTSAGTPI KNHKEIEYLLKQIMKPKQVSVIKIEAHTKGVSMEVRGNAAADEAAKNAVFLVQR
WMSV_P03359	VLNLEEEYRLHEKPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPVAVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGVLVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFK NSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQKEVTYLGYLLKEGKRWLTPARKATVM KIPPPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQKAFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPW RRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLTLGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPATLLPV ESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQPLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQALRLAEGKDINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKP
WMSV_P03359_3mut	VLNLEEEYRLHEKPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPVAVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGVLVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQKEVTYLGYLLKEGKRWLTPARKATVM KIPPPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKPSIPFIWTEEHQKAFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPW RRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLTLGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPATLLPV ESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQPLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQALRLAEGKDINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKP
WMSV_P03359_3mutA	VLNLEEEYRLHEKPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPVAVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGVLVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQKEVTYLGYLLKEGKRWLTPARKATVM KIPPPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKPSIPFIWTEEHQKAFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTLGPW RRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLTLGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPATLLPV ESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQPLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQALRLAEGKDINIYTD SRYAFATAHIHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKP
XMRV6_A1Z651	TLNIEDEYRLHETSKEPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSEQDCQRGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALN PATLLPLPEKEAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADYTWYTDGSSFLQEGQRRAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGK KLNVYTDSRYAFATAHVHGEIYRRRGLLTSEGREIKNKNEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNSAEARGNRMADQAARAAAMKAVLETSTLL
XMRV6_A1Z651_3mut	TLNIEDEYRLHETSKEPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSEQDCQRGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALN PATLLPLPEKEAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADYTWYTDGSSFLQEGQRRAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGK KLNVYTDSRYAFATAHVHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKNEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNSAEARGNRMADQAARAAAMKAVLETSTLL
XMRV6_A1Z651_3mutA	TLNIEDEYRLHETSKEPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFK NSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSEQDCQRGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVM GQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKL GPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVALN PATLLPLPEKEAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADYTWYTDGSSFLQEGQRRAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGK KLNVYTDSRYAFATAHVHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKNEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNSAEARGNRMADQAARAAAMKAVLETSTLL

【０１２６】

一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、例えば、部位特異的突然変異によって修飾される。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、改善された特性を有するように改変され、例えば、ＭＭＬＶ　ＲＴ由来のＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＶ（ＳＳＩＶ）逆転写酵素が挙げられる。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２００１０６８８９５号パンフレットに記載のように、より低いエラー率を有するように改変され得る。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、熱安定性が高まるように改変され得る。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、加工性が高まるように改変され得る。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、阻害剤に対する耐性を有するように改変され得る。一部の実施形態では、逆転写酵

素ドメインは、より高速であるように改変され得る。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、ＲＮＡ鋳型における修飾ヌクレオチドに対する耐性が高まるように改変され得る。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、修飾ＤＮＡヌクレオチドを挿入するように改変され得る。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、鋳型ＲＮＡに結合するように改変される。一部の実施形態では、１つ又は複数の突然変異は、マウス白血病ウイルス逆転写酵素のＲＴドメイン内のＤ２００Ｎ、Ｌ６０３Ｗ、Ｔ３３０Ｐ、Ｄ５２４Ｇ、Ｅ５６２Ｑ、Ｄ５８３Ｎ、Ｐ５１Ｌ、Ｓ６７Ｒ、Ｅ６７Ｋ、Ｔ１９７Ａ、Ｈ２０４Ｒ、Ｅ３０２Ｋ、Ｆ３０９Ｎ、Ｗ３１３Ｆ、Ｌ４３５Ｇ、Ｎ４５４Ｋ、Ｈ５９４Ｑ、Ｌ６７１Ｐ、Ｅ６９Ｋ若しくはＤ６５３Ｎ、又は別のＲＴドメインの対応する位置での対応する突然変異から選択される。

【０１２７】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、レトロウイルス逆転写酵素からのＲＴドメイン、例として、例えば、以下の配列を含む野生型Ｍ－ＭＬＶ　ＲＴを含む。

Ｍ－ＭＬＶ（ＷＴ）：

【化２】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSI
KQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNK
RVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGIS
GQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQG
TRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKT
PRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAP
ALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRM
VAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDR
VQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSL
LQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRY
AFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEAR
GNRMADQAARKAAITETPDTSTLLI (配列番号 : 4012)

【０１２８】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、レトロウイルス逆転写酵素からのＲＴドメイン、例として、例えば、以下の配列を含むＭ－ＭＬＶ　ＲＴを含む。

【化３】

TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSI
KQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNK
RVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGIS
GQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQG
TRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKT
PRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAP
ALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRM
VAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDR
VQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSL
LQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRY
AFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEAR
GNRMADQAARKAAITETPDTSTLL (配列番号 : 4013)

【０１２９】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＮＰ＿０５７９３３のアミノ酸６５９～１３２９の配列を含むレトロウイルス逆転写酵素からのＲＴドメインを含む。複数の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、例えば、以下に示される、ＮＰ＿０５７９３３のアミノ酸６５９～１３２９の配列のＮ末端に、１つの更なるアミノ酸を更に含む。

【化４】

TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSI
KQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLP**VKKPGTNDYRPVQDLREVN**
KRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDP
EMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAAT
SELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKE
TVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAY
QEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPV
AAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTH
YQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDAD
HTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGK
KLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPG
HQKGHSAEARGNRMADQAARKAA (配列番号 : 4014)

コアＲＴ（太字）、上記の注釈
ＲＮＡｓｅＨ（下線部）、上記の注釈

【０１３０】

実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＮＰ＿０５７９３３のアミノ酸６５９～１３２９の配列のＣ末端に、１つの更なるアミノ酸を更に含む。複数の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＲＮａｓｅＨ１ドメイン（例えば、ＮＰ＿０５７９３３のアミノ酸１１７８～１３１８）を含む。

【０１３１】

一部の実施形態では、レトロウイルス逆転写酵素ドメイン、例えば、Ｍ－ＭＬＶ　ＲＴは、ＲＴの特徴、例えば、熱安定性、処理能力、及び／又は鋳型結合を改善し得る、野生型配列からの１つ又は複数の突然変異を含み得る。一部の実施形態では、Ｍ－ＭＬＶ　Ｒ

Ｔドメインは、上のＭ－ＭＬＶ（ＷＴ）配列に対して、例えば、Ｄ２００Ｎ、Ｌ６０３Ｗ、Ｔ３３０Ｐ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｄ５２４Ｇ、Ｅ５６２Ｑ、Ｄ５８３Ｎ、Ｐ５１Ｌ、Ｓ６７Ｒ、Ｅ６７Ｋ、Ｔ１９７Ａ、Ｈ２０４Ｒ、Ｅ３０２Ｋ、Ｆ３０９Ｎ、Ｌ４３５Ｇ、Ｎ４５４Ｋ、Ｈ５９４Ｑ、Ｄ６５３Ｎ、Ｒ１１０Ｓ、Ｋ１０３Ｌから選択される１つ又は複数の突然変異、例えば、任意選択でＴ３０６Ｋ及びＷ３１３Ｆを更に含む、Ｄ２００Ｎ、Ｌ６０３Ｗ、及びＴ３３０Ｐなどの突然変異の組合せを含む。一部の実施形態では、本明細書で用いられるＭ－ＭＬＶ　ＲＴは、突然変異Ｄ２００Ｎ、Ｌ６０３Ｗ、Ｔ３３０Ｐ、Ｔ３０６Ｋ及びＷ３１３Ｆを含む。複数の実施形態では、突然変異体Ｍ－ＭＬＶ　ＲＴは、以下のアミノ酸配列を含む。

Ｍ－ＭＬＶ（ＰＥ２）：

【化５】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSI
KQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNK
RVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGIS
GQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQG
TRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKT
PRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAP
ALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRM
VAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDR
VQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSL
LQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRY
AFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEAR
GNRMADQAARKAAITETPDTSTLLI (配列番号 : 4015)

【０１３２】

一部の実施形態では、ライティングドメイン（例えば、ＲＴドメイン）は、例えば、ＲＮＡ配列に特異的に結合するＲＮＡ結合ドメインを含む。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、ライティングドメインのＲＮＡ結合ドメインによって特異的に結合されるＲＮＡ配列を含む。

【０１３３】

一部の実施形態では、逆転写ドメインは、単に、システムの特定の鋳型、例えば、鋳型ＲＮＡを認識し、逆転写する。一部の実施形態では、鋳型は、逆転写ドメインによって認識及び逆転写を可能にする配列又は構造を含む。一部の実施形態では、鋳型は、本明細書に記載されるゲノム改変システムのポリペプチド成分のＲＮＡ結合ドメインとの会合を可能にする配列又は構造を含む。一部の実施形態では、ゲノム改変システムは、会合配列を欠く鋳型より、会合配列を含む鋳型を好ましくは逆転写する。

【０１３４】

ライティングドメインは、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性も含み得、例えば、ＤＮＡを鋳型ＤＮＡ配列からのゲノムにライティングする能力がある酵素活性を含む。一部の実施形態では、ＤＮＡ依存性ＤＮＡ重合が、標的部位編集の第２の鎖合成を完了するのに用いられる。一部の実施形態では、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性は、ポリペプチド中のＤＮＡポリメラーゼドメインによって提供される。一部の実施形態では、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性は、ＤＮＡ依存性ＤＮＡ重合、例えば、第２の鎖合成も可能である逆転写酵素ドメインによって提供される。一部の実施形態では、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性は、システムの第２のポリペプチドによって提供される。一部の実

施形態では、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性は、任意選択で、ゲノム改変システムの成分により、標的部位に動員される内因性宿主細胞ポリメラーゼによって提供される。

【０１３５】

一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、インビトロで、参照逆転写酵素ドメインと比較してより低い確率で不十分な終結率（Ｐｏｆｆ）を有する。一部の実施形態では、参照逆転写酵素ドメインは、ウイルス逆転写酵素ドメイン、例えば、Ｍ－ＭＬＶからのＲＴドメインである。

【０１３６】

一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、例えば、１０９４ｎｔのＲＮＡでの測定によると、インビトロで、約５×１０$^{-3}$／ｎｔ、５×１０$^{-4}$／ｎｔ、又は５×１０$^{-6}$／ｎｔ未満の、より低い確率での不十分な終結率（Ｐｏｆｆ）を有する。複数の実施形態では、インビトロでの不十分な終結率は、Ｂｉｂｉｌｌｏ ａｎｄ Ｅｉｃｋｂｕｓｈ（２００２）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７７（３８）：３４８３６－３４８４５（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように決定される。

【０１３７】

一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、細胞における組み込みの少なくとも約３０％又は５０％を完了することができる。完全な組み込みのパーセントは、実質的に完全長の組み込み事象（例えば、予想された組み込み配列の少なくとも９８％を含むゲノム部位）の数をｂｙ細胞集団内の（実質的に完全長及び部分を含む）全体の組み込み事象の数で除することによって測定され得る。複数の実施形態では、細胞における組み込みは、例えば、Ｋａｒｓｔ ｅｔ ａｌ．（２０２０）ｂｉｏＲｘｉｖ ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／６４５９０３（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ロングリードアンプリコン配列決定を用いて（例えば、組み込み部位を通じて）決定される。

【０１３８】

複数の実施形態では、細胞における組み込みの定量化は、鋳型ＲＮＡ（例えば、少なくとも０．０５、０．１、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、１．５、２、３、４若しくは５ｋｂの長さ、例えば、０．５～０．６、０．６～０．７、０．７～０．８、０．８～０．９、１．０～１．２、１．２～１．４、１．４～１．６、１．６～１．８、１．８～２．０、２～３、３～４若しくは４～５ｋｂの長さを有する鋳型ＲＮＡ）に対応するＤＮＡ配列の少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％を含む組み込みの割合を計数することを含む。

【０１３９】

一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、インビトロでｄＮＴＰを重合可能である。複数の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、０．１～５０ｎｔ／秒（例えば、０．１～１、１～１０若しくは１０～５０ｎｔ／秒）の速度で、インビトロでｄＮＴＰを重合可能である。複数の実施形態では、逆転写酵素ドメインによるｄＮＴＰの重合は、例えば、Ｓｃｈｗａｒｔｚ ａｎｄ Ｑｕａｋｅ（２００９）ＰＮＡＳ １０６（４８）：２０２９４－２０２９９（その全体が参照により組み込まれる）に記載のように、単一分子アッセイによって測定される。

【０１４０】

一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、例えば、Ｙａｓｕｋａｗａ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ４９２（２）：１４７－１５３（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、１×１０$^{-3}$～１×１０$^{-4}$又は１×１０$^{-4}$～１×１０$^{-5}$個の置換／ｎｔのインビトロエラー率（例えば、ヌクレオチドの誤取り込み）を有する。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、例えば、Ｋａｒｓｔ ｅｔ ａｌ．（２０２０）ｂｉｏＲｘｉｖ ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／６４５９０３（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、例えば、ロングリードアンプリコン配列決定により、細胞（例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞）内で１×１０$^{-3}$～１×１０$^{-4}$又は１×１０$^{-4}$～１×１０$^{-5}$

個の置換／ｎｔのエラー率（例えば、ヌクレオチドの誤取り込み）を有する。
【０１４１】
一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、インビトロで標的ＲＮＡの逆転写を実施することが可能である。一部の実施形態では、逆転写酵素は、鋳型の逆転写を開始するため、少なくとも３ヌクレオチドのプライマーを必要とする。一部の実施形態では、標的ＲＮＡの逆転写は、例えば、Ｂｉｂｉｌｌｏ ａｎｄ Ｅｉｃｋｂｕｓｈ（２００２）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７７（３８）：３４８３６－３４８４５（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、（例として、例えば、３’末端に少なくとも３、４、５、６、７、８、９若しくは１０ｎｔを有する標的にアニールする、ｓｓＤＮＡプライマーが提供されるとき）標的ＲＮＡからのｃＤＮＡの検出によって判定される。
【０１４２】
一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、例えば、そのＲＮＡ鋳型をｃＤＮＡに変換する場合、逆転写を、例えば、タンパク質結合モチーフ（例えば、３’ＵＴＲ）が欠如したＲＮＡ鋳型と比較して、（例えば、ｃＤＮＡ生成により）少なくとも５倍又は１０倍より効率的に実施する。複数の実施形態では、逆転写の効率は、Ｙａｓｕｋａｗａ ｅｔａｌ．（２０１７）Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ４９２（２）：１４７－１５３（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように測定される。
【０１４３】
一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、例えば、細胞（例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞）内で発現されるとき、任意の内因性細胞ＲＮＡより高い頻度（例えば、約５倍又は１０倍高い頻度）で、特定のＲＮＡ鋳型に特異的に結合する。複数の実施形態では、逆転写酵素ドメインと鋳型ＲＮＡとの間の特異的結合の頻度は、例えば、Ｌｉｎ ａｎｄ Ｍｉｌｅｓ（２０１９）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４７（１１）：５４９０－５５０１（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ＣＬＩＰ－ｓｅｑによって測定される。
【０１４４】
鋳型核酸結合ドメイン
遺伝子組換えポリペプチドは、典型的に、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）と会合することが可能な領域を有する。一部の実施形態では、鋳型核酸結合ドメインは、ＲＮＡ結合ドメインである。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、特定のシグネチャー、例えば構造モチーフを含むＲＮＡ分子と会合し得るモジュラードメインである。他の実施形態では、鋳型核酸結合ドメイン（例えば、ＲＮＡ結合ドメイン）は、逆転写ドメイン内に含まれ、例えば、逆転写酵素由来の成分は、ＲＮＡの優先性についての既知のシグネチャーを有する。
【０１４５】
他の実施形態では、鋳型核酸結合ドメイン（例えば、ＲＮＡ結合ドメイン）は、標的ＤＮＡ結合ドメイン内に含まれる。例えば、一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、ｇＲＮＡを含む鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の構造を認識するＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質である。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＤＮＡ結合ドメインが標的ゲノムＤＮＡ配列に結合することを可能にする、ｇＲＮＡスカフォールドと会合するＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質を含むＤＮＡ結合ドメインを含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡスカフォールド及びｇＲＮＡスペーサーは、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）内部に含まれることで、ＤＮＡ結合ドメインは、鋳型核酸結合ドメインでもある。一部の実施形態では、ポリペプチドは、複数のドメイン内にＲＮＡ結合機能を有し、例えば、ＣＲＩＳＰＲ関連ＤＮＡ結合ドメイン内のｇＲＮＡ構造及び逆転写酵素ドメイン内の追加の配列又は構造に結合し得る。
【０１４６】
一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、標準ＲＮＡ結合ドメインよりも高い親和性で、鋳型ＲＮＡに結合することができる。一部の実施形態では、標準ＲＮＡ結合ドメイ

ンは、化膿性レンサ球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）のＣａｓ９由来のＲＮＡ結合ドメインである。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、１００ｐＭ～１０ｎＭ（例えば、１００ｐＭ～１ｎＭ又は１ｎＭ～１０ｎＭ）の親和性で、鋳型ＲＮＡに結合することができる。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインの、その鋳型ＲＮＡに対する親和性は、例えば、Ａｓｍａｒｉ ｅｔ ａｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １４６：１０７－１１９（２０１８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、例えば、熱泳動によりインビトロで測定される。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインの、その鋳型ＲＮＡに対する親和性は、細胞中で（例えば、ＦＲＥＴ又はＣＬＩＰ－Ｓｅｑにより）測定される。

【０１４７】

一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、鋳型ＲＮＡと、インビトロでスクランブルＲＮＡよりも少なくとも約５倍又は１０倍高い頻度で会合する。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインと鋳型ＲＮＡ又はスクランブルＲＮＡとの間の会合の頻度は、例えば、Ｌｉｎ ａｎｄ Ｍｉｌｅｓ（２０１９）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４７（１１）：５４９０－５５０１（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ＣＬＩＰ－ｓｅｑによって測定される。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、細胞内（例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞内）の鋳型ＲＮＡと、スクランブルＲＮＡよりも少なくとも約５倍又は１０倍高い頻度で会合する。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインと鋳型ＲＮＡ又はスクランブルＲＮＡとの間の会合の頻度は、例えば、Ｌｉｎ ａｎｄ Ｍｉｌｅｓ（２０１９）（前掲）に記載のように、ＣＬＩＰ－ｓｅｑによって測定される。

【０１４８】

エンドヌクレアーゼドメイン及びＤＮＡ結合ドメイン

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、エンドヌクレアーゼドメインを介したＤＮＡ標的部位切断の機能を有する。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、例えば、標的核酸に結合するためのＤＮＡ結合ドメインを含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドのドメイン（例えば、Ｃａｓドメイン）は、２つ以上のより小さいドメイン、例えば、ＤＮＡ結合ドメイン及びエンドヌクレアーゼドメインを含む。ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、Ｃａｓドメイン）が、標的核酸配列に結合すると記載される場合、一部の実施形態では、結合は、ｇＲＮＡによって媒介されることが理解される。

【０１４９】

一部の実施形態では、ドメインは、２つの機能を有する。例えば、一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ＤＮＡ結合ドメインでもある。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）結合ドメインでもある。例えば、一部の実施形態では、ポリペプチドは、ｇＲＮＡを含む鋳型ＲＮＡに結合し、標的ＤＮＡ配列（例えば、ｇＲＮＡの一部に対する相補性を有する）に結合し、且つ標的ＤＮＡ配列を切断する、ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼドメインを含む。一部の実施形態では、異種の源に由来するエンドヌクレアーゼドメイン又はエンドヌクレアーゼ／ＤＮＡ結合ドメインは、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムにおいて、使用され得るか又は（例えば、１つ又は複数の残基の挿入、欠失又は置換によって）修飾され得る。

【０１５０】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はエンドヌクレアーゼ／ＤＮＡ結合ドメインをコードする核酸は、例えばヒト細胞について改善された、改変されたコドン使用を有するように、その天然配列から改変される。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼエレメントは、異種エンドヌクレアーゼエレメント、例えば、Ｃａｓエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）、ＩＩ型制限エンドヌクレアーゼ（例えば、Ｆｏｋ１）、メガヌクレアーゼ（例えば、Ｉ－ＳｃｅＩ）、又は他のエンドヌクレアーゼドメインである。

【０１５１】
特定の態様では、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドのＤＮＡ結合ドメインは、所望の宿主ＤＮＡ標的配列への結合のため、選択、設計、又は構築される。特定の実施形態では、ポリペプチドのＤＮＡ結合ドメインは、異種ＤＮＡ結合因子である。一部の実施形態では、異種ＤＮＡ結合因子は、ジンクフィンガー因子又はＴＡＬエフェクター因子、例えば、ジンクフィンガー又はＴＡＬポリペプチド又はその機能的フラグメントである。一部の実施形態では、異種ＤＮＡ結合因子は、エンドヌクレアーゼ活性を有しないように改変されている、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、又は他のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質などの配列誘導性のＤＮＡ結合因子である。一部の実施形態では、異種ＤＮＡ結合因子は、エンドヌクレアーゼ活性を保持する。一部の実施形態では、異種ＤＮＡ結合因子は、ｓｓＤＮＡを切断するような部分的なエンドヌクレアーゼ活性を保持し、例えば、ニッカーゼ活性を有する。特定の実施形態では、異種ＤＮＡ結合ドメインは、Ｃａｓ９、ＴＡＬドメイン、ＺＦドメイン、Ｍｙｂドメイン、それらの組合せ、又はそれらの複合体のいずれか１つ又は複数であり得る。

【０１５２】
一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、例えば、部位特異的突然変異によって修飾されることで、ＤＮＡ結合因子（例えば、ジンクフィンガーの数及び／又は特異性）などを増加又は減少させ、ＤＮＡ－結合特異性及び親和性を改変する。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインをコードする核酸配列は、例えばヒト細胞について改善された、改変されたコドン使用を有するように、その天然配列から改変される。複数の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、野生型ＤＮＡ結合ドメインに対して１つ又は複数の修飾、例えば、指向性進化、例えば、ファージ支援連続進化（ＰＡＣＥ）による修飾を含む。

【０１５３】
一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、メガヌクレアーゼドメイン（例えば、エンドヌクレアーゼドメイン部分における、例えば、本明細書に記載されるもの）、又はその機能的フラグメントを含む。一部の実施形態では、メガヌクレアーゼドメインは、エンドヌクレアーゼ活性、例えば、二本鎖切断及び／又はニッカーゼ活性を有する。他の実施形態では、メガヌクレアーゼドメインは、低下した活性を有し、例えば、エンドヌクレアーゼ活性が欠失しており、例えば、メガヌクレアーゼは、触媒的に不活性である。一部の実施形態では、触媒的に不活性なメガヌクレアーゼは、例えば、Ｆｏｎｆａｒａ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４０（２）：８４７－８６０（２０１２）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ＤＮＡ結合ドメインとして使用される。

【０１５４】
一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、例えば、野生型ポリペプチドと比べて、ＤＮＡ結合ドメインに対する修飾を含む。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、元のＤＮＡ結合ドメインのアミノ酸配列に対する付加、欠失、置換、又は修飾を含む。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、目的の標的核酸（例えば、ＤＮＡ）配列に特異的に結合する異種機能ドメインを含むように修飾される。一部の実施形態では、機能ドメインは、ポリペプチドの先のＤＮＡ結合ドメインの少なくとも一部（例えば、その全体）で置換する。一部の実施形態では、機能ドメインは、ジンクフィンガー（例えば、目的の標的核酸（例えば、ＤＮＡ）配列に特異的に結合するジンクフィンガーを含む。一部の実施形態では、機能ドメインは、Ｃａｓドメイン（例えば、目的の標的核酸（例えば、ＤＮＡ）配列に特異的に結合するＣａｓドメインを含む。一部の実施形態では、Ｃａｓドメインは、Ｃａｓ９又はその突然変異体若しくは変異体（例えば、本明細書に記載される）を含む。複数の実施形態では、Ｃａｓドメインは、例えば、本明細書に記載されるように、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）と会合する。複数の実施形態では、Ｃａｓドメインは、ｇＲＮＡにより、目的の標的核酸（例えば、ＤＮＡ）配列に導かれる。複数の実施形態では、Ｃａｓドメインは、ｇＲＮＡと同じ核酸（例えば、ＲＮＡ）分子においてコードされる。複数の実施形態では、Ｃａｓドメインは、ｇＲＮＡと異なる核酸（例えば、ＲＮＡ

）分子においてコードされる。
【０１５５】
一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、標準ＤＮＡ結合ドメインよりも高い親和性で、標的配列（例えば、ｄｓＤＮＡ標的配列）に結合することができる。一部の実施形態では、標準ＤＮＡ結合ドメインは、化膿性レンサ球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）のＣａｓ９由来のＤＮＡ結合ドメインである。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、１００ｐＭ～１０ｎＭ（例えば、１００ｐＭ～１ｎＭ又は１ｎＭ～１０ｎＭ）の親和性で、標的配列（例えば、ｄｓＤＮＡ標的配列）に結合することができる。
【０１５６】
一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインの、その標的配列（例えば、ｄｓＤＮＡ標的配列）に対する親和性は、例えば、Ａｓｍａｒｉ ｅｔ ａｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １４６：１０７－１１９（２０１８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、例えば、熱泳動によりインビトロで測定される。
【０１５７】
実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、モル過剰の、例えば、約１００倍モル過剰のスクランブル配列競合ｄｓＤＮＡの存在下で、例えば、１００ｐＭ～１０ｎＭ（例えば、１００ｐＭ～１ｎＭ又は１ｎＭ～１０ｎＭ）の親和性で、その標的配列（例えば、ｄｓＤＮＡ標的配列）に結合することができる。
【０１５８】
一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、例えば、Ｈｅ ａｎｄ Ｐｕ（２０１０）Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ Ｃｈａｐｔｅｒ ２１（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、例えば、ＣｈＩＰ－ｓｅｑ（例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞中で）により測定して、標的細胞、例えば、ヒト標的細胞のゲノム中のいずれか他の配列よりも高い頻度で、その標的配列（例えば、ｄｓＤＮＡ標的配列）と結合していることが認められる。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、例えば、Ｈｅ ａｎｄ Ｐｕ（２０１０）（前掲）に記載のように、例えば、ＣｈＩＰ－ｓｅｑ（例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ中で）により測定して、標的細胞のゲノム中のいずれか他の配列よりも少なくとも約５倍又は１０倍高い頻度で、その標的配列（例えば、ｄｓＤＮＡ標的配列）と結合していることが認められる。
【０１５９】
一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ニッカーゼ活性を有し、標的ＤＮＡの１つの鎖を切断する。一部の実施形態では、ニッカーゼ活性は、標的部位における二本鎖切断の形成を減少させる。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、標的ＤＮＡの第１の鎖及び第２の鎖におけるねじれ型のニック構造を生成する。一部の実施形態では、ねじれ型のニック構造は、標的部位における遊離３’オーバーハングを生成する。一部の実施形態では、標的部位における遊離３’オーバーハングは、例えば、鋳型核酸の３’相同性領域のアクセス及びアニーリングを強化することによって編集効率を改善する。一部の実施形態では、ねじれ型のニック構造は、標的部位における二本鎖切断の形成を減少させる。
【０１６０】
一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、標的ＤＮＡの両方の鎖を切断し、例えば、切断部位のいずれの側にもｓｓＤＮＡオーバーハングを有さない標的の平滑末端切断をもたらす。本明細書に記載される遺伝子組換えシステムのエンドヌクレアーゼドメインのアミノ酸配列は、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼドメインのアミノ酸配列と、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％同一であり得る。
【０１６１】
特定の実施形態では、異種エンドヌクレアーゼは、Ｆｏｋ１又はその機能性断片である

。特定の実施形態では、異種エンドヌクレアーゼは、ホリデイジャンクションリゾルバーゼ又はその相同体、例えば、スルホロブス・ソルファタリカス（Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ ｓｏｌｆａｔａｒｉｃｕｓ）からのホリデイジャンクション切断酵素（Ｓｓｏｌ Ｈｊｅ）である（Ｇｏｖｉｎｄａｒａｊｕ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４４：７，２０１６）。特定の実施形態では、異種エンドヌクレアーゼは、Ｐｒｐ８などのスプライセオソームタンパク質の大きい断片のエンドヌクレアーゼである（Ｍａｈｂｕｂ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｂｉｌｅ ＤＮＡ ８：１６，２０１７）。特定の実施形態では、異種エンドヌクレアーゼは、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質、例えば、Ｃａｓ９に由来する。特定の実施形態では、異種エンドヌクレアーゼは、ｓｓＤＮＡ切断活性のみ、例えば、ニッカーゼ活性のみを有するように、例えば、Ｃａｓ９ニッカーゼ、例えば、Ｄ１０Ａ、Ｈ８４０Ａ、又はＮ８６３Ａ突然変異を有するＳｐＣａｓ９であるように改変される。表３は、例示的なＣａｓタンパク質及びニッカーゼ活性に関連する突然変異を示す。更に他の実施形態では、相同エンドヌクレアーゼドメインは、例えば、部位特異的突然変異によって修飾されることで、ＤＮＡエンドヌクレアーゼ活性を改変する。更に他の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、例えば、ＤＮＡ配列特異性を付与する領域を不活性化するために、ＤＮＡ配列特異性又は突然変異を付与するドメインを除去するための切断により、ＤＮＡ配列特異性を低下させるように修飾される。

【０１６２】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ニッカーゼ活性を有し、二本鎖切断を形成しない。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、二本鎖切断より高い頻度で一本鎖切断を形成し、例えば、切断の少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％は、一本鎖切断であり、又は切断の１０％、５％、４％、３％、２％若しくは１％未満は、二本鎖切断である。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼは、二本鎖切断を実質的に形成しない。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼは、検出可能なレベルの二本鎖切断を形成しない。

【０１６３】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、第１の鎖の標的部位ＤＮＡに切れ目を入れるニッカーゼ活性を有し；例えば、一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ライティングドメインによって伸長されることになる鎖上の改変部位近傍の標的部位のゲノムＤＮＡを切断する。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、第１の鎖の標的部位ＤＮＡに切れ目を入れ、第２の鎖の標的部位ＤＮＡに切れ目を入れないニッカーゼ活性を有する。例えば、ポリペプチドが、ニッカーゼ活性を有するＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼドメインを含むとき、一部の実施形態では、前記ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼドメインは、ＰＡＭ部位を含む標的部位ＤＮＡ鎖に切れ目を入れる（例えば、そしてＰＡＭ部位を含まない標的部位ＤＮＡ鎖に切れ目を入れない）。更なる例として、ポリペプチドが、ニッカーゼ活性を有するＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼドメインを含むとき、一部の実施形態では、前記ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼドメインは、ＰＡＭ部位を含まない標的部位ＤＮＡ鎖に切れ目を入れる（例えば、そしてＰＡＭ部位を含む標的部位ＤＮＡ鎖に切れ目を入れない）。

【０１６４】

いくつかの他の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、第１の鎖及び第２の鎖の標的部位ＤＮＡに切れ目を入れるニッカーゼ活性を有する。特定の理論に束縛されることを意図しないが、本明細書に記載のポリペプチドのライティングドメイン（例えば、ＲＴドメイン）が鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列から重合（例えば、逆転写）後、細胞ＤＮＡ修復機構は、第１のＤＮＡ鎖上のニックを修復しなければならない。標的部位ＤＮＡはここで、第１のＤＮＡ鎖に対して２つの異なる配列を含み：１番目は元のゲノムＤＮＡ（例えば、自由５’末端を有する）に対応し、２番目は異種目的配列（例えば、自由３’末端を有する）から重合されたものに対応する。２つの異なる配列が互いに平衡化し、まず一方、次いで他方が第２の鎖とハイブリダイズすると考えられ、ここで細胞ＤＮＡ修復装置のその修復標的部位への組み込みの順序は確率過程であると考えられ

る。特定の理論に束縛されることを意図しないが、更なるニックの第２の鎖への導入が、異種目的配列に基づく配列を元のゲノム配列よりも頻繁に用いるように、細胞ＤＮＡ修復機構をバイアスし得ると考えられる（Ａｎｚａｌｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　５７６：１４９－１５７（２０１９））。一部の実施形態では、更なるニックは、標的部位修飾（例えば、挿入、欠失又は置換）の５’若しくは３’又は第１の鎖上のニックに対して、少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５若しくは１５０ヌクレオチドに位置づけられる。

【０１６５】

代替的に又は追加的に、特定の理論に束縛されることを意図しないが、第２の鎖に対する更なるニックが第２の鎖合成を促進し得ると考えられる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムが第１の鎖の一部を挿入又は置換している場合、第２の鎖における挿入／置換に対応する新しい配列の合成が必要である。

【０１６６】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、エンドヌクレアーゼ活性を有する単一ドメイン（例えば、単一エンドヌクレアーゼドメイン）を含み、前記ドメインは、第１の鎖及び第２の鎖の両方に切れ目を入れる。例えば、こうした実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼドメインであり得、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、第１の鎖のニッキングを導くｇＲＮＡスペーサー及び第２の鎖のニッキングを導く更なるｇＲＮＡスペーサーを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、エンドヌクレアーゼ活性を有する複数のドメインを含み、第１のエンドヌクレアーゼドメインは、第１の鎖に切れ目を入れ、且つ第２のエンドヌクレアーゼドメインは、第２の鎖に切れ目を入れる（任意選択で、第１のエンドヌクレアーゼドメインは、第２の鎖に切れ目を入れず（例えば、それができず）、且つ第２のエンドヌクレアーゼドメインは、第１の鎖に切れ目を入れない（例えば、それができない））。

【０１６７】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、第１の鎖及び第２の鎖に切れ目を入れることができる。一部の実施形態では、第１の鎖及び第２の鎖ニックは、標的部位における同じ位置で起こるが、逆鎖上では起きない。一部の実施形態では、第２の鎖ニックは、例えば、第１ニックから上流又は下流の、ねじれた位置で起こる。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、第２の鎖ニックが第１の鎖ニックの上流にある場合、標的部位の欠失を生成する。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、第２の鎖ニックが第１の鎖ニックの下流にある場合、標的部位の重複を生成する。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、第１及び第２の鎖ニックが標的部位の同じ位置で起こる場合、重複及び／又は欠失を生成しない。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、例えば、（例えば、Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２００６に記載のとおり；その全体は参照により本明細書に組み込まれる）第１の鎖又は第２の鎖のニッキングを促進する、タンパク質立体構造又はＲＮＡ結合状態に応じた、改変された活性を有する。

【０１６８】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、メガヌクレアーゼ、又はその機能性断片を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ホーミングエンドヌクレアーゼ、又はその機能性断片を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、例えばファミリー名に示されるとおり、例えば、保存されたアミノ酸モチーフを有する、ＬＡＧＬＩＤＡＤＧ、ＧＩＹ－ＹＩＧ、ＨＮＨ、Ｈｉｓ－Ｃｙｓ　Ｂｏｘ、又はＰＤ－（Ｄ／Ｅ）ＸＫファミリーからのメガヌクレアーゼ、又はその機能性断片若しくは変異体を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、例えば、Ｉ－ＳｍａＭＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｆ７ＷＤ４２）、Ｉ－ＳｃｅＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｐ０３８８２）、Ｉ－ＡｎｉＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｐ０３８８０）、Ｉ－ＤｍｏＩ（Ｕｎｉｐｒ

ｏｔ　Ｐ２１５０５）、Ｉ－ＣｒｅＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｐ０５７２５）、Ｉ－ＴｅｖＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｐ１３２９９）、Ｉ－ＯｎｕＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｑ４ＶＷＷ５）、又はＩ－ＢｍｏＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｑ９ＡＮＲ６）から選択されるメガヌクレアーゼ、又はその断片を含む。一部の実施形態では、メガヌクレアーゼは、天然には、その機能的形態において、単量体、例えば、Ｉ－ＳｃｅＩ、Ｉ－ＴｅｖＩ、又は二量体、例えば、Ｉ－ＣｒｅＩである。例えば、ＬＡＧＬＩＤＡＤＧモチーフの単一コピーを有するＬＡＧＬＩＤＡＤＧメガヌクレアーゼは、一般にホモ二量体を形成する一方、ＬＡＧＬＩＤＡＤＧモチーフの２つのコピーを有するメンバーは、一般に単量体として見出される。一部の実施形態では、通常は二量体として形成するメガヌクレアーゼは、融合体として発現され、例えば、２つのサブユニットは、単一のＯＲＦとして、任意選択で、リンカーによって連結された、例えばＩ－ＣｒｅＩ二量体融合体として発現される（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ－Ｆｏｒｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　２０２０；その全体は参照により本明細書に組み込まれる）。一部の実施形態では、メガヌクレアーゼ、又はその機能性断片は、二本鎖ＤＮＡ分子、例えば、Ｉ－ＳｃｅＩ（Ｋ１２２Ｉ及び／又はＫ２２３Ｉ）（Ｎｉｕ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２００８）、Ｉ－ＡｎｉＩ（Ｋ２２７Ｍ）（ＭｃＣｏｎｎｅｌｌ　Ｓｍｉｔｈ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２００９）、Ｉ－ＤｍｏＩ（Ｑ４２Ａ及び／又はＫ１２０Ｍ）（Ｍｏｌｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２０１５）の一方の鎖においてニッカーゼ活性を優先するように改変される。一部の実施形態では、一本鎖切断についてのこの優先性を有するメガヌクレアーゼ又はその機能性断片は、例えばニッカーゼ活性を有するエンドヌクレアーゼドメインとして使用される。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、安全な港湾部位、例えば、Ｉ－ＣｒｅＩを標的にするＳＨ６部位を天然に標的にする、又は標的にするように改変された、メガヌクレアーゼ、又はその機能性断片を含む（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ－Ｆｏｒｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．、上記）。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、配列耐性触媒ドメインを有する、メガヌクレアーゼ、又はその機能性断片、例えば、最小モチーフＣＮＮＮＧを認識するＩ－ＴｅｖＩを含む（Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２０１２）。一部の実施形態では、標的配列耐性触媒ドメインは、ＤＮＡ結合ドメインに融合され、例として、例えば、Ｉ－ＴｅｖＩを、（ｉ）Ｔｅｖ－ＺＦＥを作出するためのＺｎフィンガー（Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２０１２）、（ｉｉ）ＭｅｇａＴｅｖを作出するための他のメガヌクレアーゼ（Ｗｏｌｆｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　２０１４）、及び／又は（ｉｉｉ）ＴｅｖＣａｓ９を作出するためのＣａｓ９（Ｗｏｌｆｓ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２０１６）に融合させることによって活性を誘導する。

【０１６９】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、制限酵素、例えば、タイプＩＩＳ又はタイプＩＩＰ制限酵素を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、タイプＩＩＳ制限酵素、例えば、ＦｏｋＩ又はその断片若しくは変異体を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、タイプＩＩＰ制限酵素、例えば、ＰｖｕＩＩ又はその断片若しくは変異体を含む。一部の実施形態では、二量体制限酵素は、それが一本鎖として機能するように、融合体、例えば、ＦｏｋＩ二量体融合体として発現される（Ｍｉｎｃｚｕｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　３６（１２）：３９２６－３９３８（２００８））。

【０１７０】

更なるエンドヌクレアーゼドメインの使用は、例えば、Ｇｕｈａ　ａｎｄ　Ｅｄｇｅｌｌ　Ｉｎｔ　Ｊ　Ｍｏｌ　Ｓｃｉ　１８（２２）：２５６５（２０１７）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０１７１】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、例えば、野生型Ｃａｓタンパク質と比べて、エンドヌクレアーゼドメインに対する修飾を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、野生型Ｃａｓタンパク質のアミノ酸配列に対する付加、欠失

、置換、又は修飾を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、目的の標的核酸（例えば、ＤＮＡ）配列に特異的に結合し、且つ／又はそのエンドヌクレアーゼ切断を誘導する異種機能ドメインを含むように修飾される。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ジンクフィンガーを含む。複数の実施形態では、Ｃａｓドメインを含むエンドヌクレアーゼドメインは、例えば、本明細書に記載される、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）と会合する。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、特定の標的核酸（例えば、ＤＮＡ）配列を標的にしない機能ドメインを含むように修飾される。複数の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、Ｆｏｋ１ドメインを含む。

【０１７２】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、標的ｄｓＤＮＡと、インビトロでスクランブルｄｓＤＮＡよりも少なくとも約５倍又は１０倍高い頻度で会合する。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、例えば、細胞（例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞）内で、標的ｄｓＤＮＡと、インビトロでスクランブルｄｓＤＮＡよりも少なくとも約５倍又は１０倍高い頻度で会合する。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインと標的ＤＮＡ又はスクランブルＤＮＡとの間の会合の頻度は、例えば、Ｈｅ ａｎｄ Ｐｕ（２０１０）Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ Ｃｈａｐｔｅｒ ２１（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ＣｈＩＰ－ｓｅｑによって測定される。

【０１７３】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、標的配列でのニックの形成を、例えば、非標的配列と比較して（例えば、標的細胞のゲノム中の任意の他のゲノム配列と比較して）、少なくとも約５倍又は１０倍の増加まで触媒し得る。一部の実施形態では、ニック形成のレベルは、例えば、Ｅｌａｃｑｕａ ｅｔ ａｌ．（２０１９）ｂｉｏＲｘｉｖ ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／８６７９３７（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ニックＳｅｑを用いて測定される。

【０１７４】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、インビトロでのＤＮＡのニッキングが可能である。複数の実施形態では、ニックは、露出された塩基をもたらす。複数の実施形態では、露出された塩基は、例えば、Ｃｈａｕｄｈｒｙ ａｎｄ Ｗｅｉｎｆｅｌｄ（１９９５）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ２３（１９）：３８０５－３８０９（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ヌクレアーゼ感受性アッセイを用いて検出され得る。複数の実施形態では、（例えば、ヌクレアーゼ感受性アッセイによって検出された）露出された塩基のレベルは、参照エンドヌクレアーゼドメインと比較して、少なくとも１０％、５０％若しくはそれ以上増加する。一部の実施形態では、参照エンドヌクレアーゼドメインは、化膿性レンサ球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）のＣａｓ９由来のエンドヌクレアーゼドメインである。

【０１７５】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、細胞内のＤＮＡのニッキングが可能である。複数の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞内のＤＮＡのニッキングが可能である。複数の実施形態では、Ｒａｄ５１の非存在下で複製を受ける未修復のニックは、例えば、Ｂｏｔｈｍｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ ８：１３９０５（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載の、例えば、Ｒａｄ５１阻害アッセイを用いることによって検出可能である、ニックの部位でのＮＨＥＪ率の増加をもたらす。複数の実施形態では、ＮＨＥＪ率は、０～５％超増加する。複数の実施形態では、ＮＨＥＪ率は、例えば、Ｒａｄ５１阻害時、２０～７０％（例えば、３０％～６０％又は４０～５０％）まで増加する。

【０１７６】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、切断後、標的を放出する。一部の実施形態では、標的の放出は、例えば、Ｙｏｕｒｉｋ ａｔ ａｌ．ＲＮＡ ２５（１）：３５－４４（２０１９）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載の

ように、また図２に示すように、酵素による複数のターンオーバーについて評価することによって間接的に示される。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインのk_{exp}は、こうした方法により測定して、1×10^{-3}～1×10^{-5}分－１である。

【０１７７】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、インビトロで約$1\times10^{8}s^{-1}M^{-1}$を超える触媒効率（$k_{cat}/K_m$）を有する。複数の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、インビトロで約1×10^{5}、1×10^{6}、1×10^{7}、又は$1\times10^{8}s^{-1}M^{-1}$を超える触媒効率を有する。複数の実施形態では、触媒効率は、Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　３６０（６３８７）：４３６－４３９（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように決定される。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、細胞内で約$1\times10^{8}s^{-1}M^{-1}$を超える触媒効率（$k_{cat}/K_m$）を有する。複数の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、細胞内で約1×10^{5}、1×10^{6}、1×10^{7}、又は$1\times10^{8}s^{-1}M^{-1}$を超える触媒効率を有する。

【０１７８】

Ｃａｓドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド

一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドは、Ｃａｓドメインを含む。一部の実施形態では、Ｃａｓドメインは、遺伝子組換えポリペプチドを、ｇＲＮＡスペーサーによって特定される標的部位に導き、それにより、「ｃｉｓ」における標的核酸配列を修飾し得る。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、Ｃａｓドメインに融合される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメイン（本明細書においてＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質とも呼ばれる）を含む。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システムに関与するタンパク質、例えば、Ｃａｓタンパク質を含み、任意選択で、ガイドＲＮＡ、例えば単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に結合する。

【０１７９】

ＣＲＩＳＰＲシステムは、最初に細菌及び古細菌において発見された適応防御システムである。ＣＲＩＳＰＲシステムは、外来ＤＮＡを切断するため、ＣＲＩＳＰＲ関連又は「Ｃａｓ」エンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１）と称されるＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼを使用する。例えば、典型的なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムにおいて、エンドヌクレアーゼは、一本鎖又は二本鎖ＤＮＡ配列を標的にする、配列特異的な非コード「ガイドＲＮＡ」により、標的ヌクレオチド配列（例えば、配列編集対象のゲノム中の部位）に導かれる。ＣＲＩＳＰＲシステムの３つのクラス（Ｉ～ＩＩＩ）は、同定されている。クラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲシステムは、（複数のＣａｓタンパク質ではなく）単一のＣａｓエンドヌクレアーゼを使用する。１つのクラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲシステムは、Ｃａｓ９、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（「ｃｒＲＮＡ」）、及びトランス活性化ｃｒＲＮＡ（「ｔｒａｃｒＲＮＡ」）などのＩＩ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼを含む。ｃｒＲＮＡは、典型的に、標的ＤＮＡ配列に対応する約２０ヌクレオチドのＲＮＡ配列である「スペーサー」配列（プロトスペーサー）を含む。野生型システムにおいて、またいくつかの改変システムにおいて、ｃｒＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡに結合し、リボヌクレアーゼＩＩＩによって切断される、部分的に二本鎖の構造を形成し、ｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒＲＮＡハイブリッド分子をもたらす領域も含む。次に、ｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒＲＮＡハイブリッドは、Ｃａｓエンドヌクレアーゼを、標的ＤＮＡ配列を認識し、切断するように導く。標的ＤＮＡ配列は、一般に、所与のＣａｓエンドヌクレアーゼに特異的であり、ｃｒＲＮＡのスペーサーに一致する標的部位における切断活性に必要とされる「プロトスペーサー隣接モチーフ」（「ＰＡＭ」）に隣接する。様々な原核生物種から同定されたＣＲＩＳＰＲエンドヌクレアーゼは、例えば、表３中の例示的なＣａｓ酵素について列挙される、固有のＰＡＭ配列の要件を有し；ＰＡＭ配列の例として、５’－ＮＧＧ（化膿レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ））、５’－ＮＮＡＧＡＡ（ストレプトコッカ

ス・サーモフィラス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ１）、５’－ＮＧＧＮＧ（ストレプトコッカス・サーモフィラス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ３）、及び５’－ＮＮＮＧＡＴＴ（髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ　ｍｅｎｉｎｇｉｄｉｔｉｓ））が挙げられる。いくつかのエンドヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、ＧリッチＰＡＭ部位、例えば５’－ＮＧＧと会合し、ＰＡＭ部位から上流（から５’側）の３つのヌクレオチドの位置で標的ＤＮＡの平滑末端切断を実施する。別のクラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲシステムは、Ｃａｓ９より小さいＶ型エンドヌクレアーゼＣｐｆ１を含み；例として、ＡｓＣｐｆ１（アシダミノコッカス種（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．）由来）及びＬｂＣｐｆ１（ラクノスピラセアエ種（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｓｐ．）由来）が挙げられる。Ｃｐｆ１関連ＣＲＩＳＰＲアレイは、ｔｒａｃｒＲＮＡを必要とせず、成熟ｃｒＲＮＡに処理され；換言すれば、Ｃｐｆ１システムは、一部の実施形態において、標的ＤＮＡ配列を切断するため、専らＣｐｆ１ヌクレアーゼ及びｃｒＲＮＡを含む。Ｃｐｆ１エンドヌクレアーゼは、典型的に、ＴリッチＰＡＭ部位、例えば５’－ＴＴＮと会合する。Ｃｐｆ１は、５’－ＣＴＡ　ＰＡＭモチーフも認識し得る。Ｃｐｆ１は、典型的に、オフセット又はねじれ型の二本鎖切断を４－又は５－ヌクレオチドの５’オーバーハングに導入し、例えば、コード鎖上のＰＡＭ部位から１８ヌクレオチド下流（３’側）及び相補鎖上のＰＡＭ部位から２３ヌクレオチド下流に位置する、５－ヌクレオチドのオフセット又はねじれ型切断によって標的ＤＮＡを切断することによって標的ＤＮＡを切断し；こうしたオフセット切断から得られる５－ヌクレオチドのオーバーハングは、平滑末端切断ＤＮＡでの挿入ではなく、相同組換えによるＤＮＡ挿入により、より正確なゲノム編集を可能にする。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｃｅｌｌ，１６３：７５９－７７１を参照されたい。

【０１８０】

種々のＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）遺伝子又はタンパク質は、本開示によって提供される技術において使用することができ、Ｃａｓタンパク質の選択は、その方法の特定条件に依存することになる。Ｃａｓタンパク質の具体例として、Ｃａｓ１、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１０、Ｃｐｆ１、Ｃ２Ｃ１、又はＣ２Ｃ３を含むクラスＩＩシステムが挙げられる。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質、例えば、Ｃａｓ９タンパク質は、種々の原核生物種のいずれに由来し得る。一部の実施形態では、特定のＣａｓタンパク質、例えば、特定のＣａｓ９タンパク質は、特定のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列を認識するように選択される。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメイン又はエンドヌクレアーゼドメインは、Ｃａｓタンパク質、例えば、Ｃａｓ９などの配列標的化ポリペプチドを含む。特定の実施形態では、Ｃａｓタンパク質、例えばＣａｓ９タンパク質は、細菌若しくは古細菌から得ることができるか、又は公知の方法を用いて合成され得る。特定の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、グラム陽性細菌又はグラム陰性細菌に由来し得る。特定の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）（例えば、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、又はＳ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ））、フランシセラ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ）（例えば、Ｆ．ノビシダ（Ｆ．ｎｏｖｉｃｉｄａ））、ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）（例えば、黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ））、アシダミノコッカス（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）（例えば、アシダミノコッカス種ＢＶ３Ｌ６（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６））、ナイセリア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）（例えば、髄膜炎菌（Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ））、クリプトコッカス（ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ヘモフィルス（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ）、真正細菌（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、パスツレラ（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ）、プレボテーラ（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ）、ベイロネラ（Ｖｅｉｌｌｏｎｅｌｌａ）、又はマリノバクター（Ｍａｒｉｎｏｂａｃｔｅｒ）に由来し得る。

【０１８１】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、表３若しくは４に列挙されるＣａｓドメイン又はその機能的フラグメント、又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％の同一性を有する配列を含み得る。

【０１８２】

【表３】

表 3. CRISPR/Cas タンパク質、種、及び突然変異

名称	*酵素*	*種*	*AA の数*	*PAM*	*PAM 認識を改変するための突然変異*	*触媒不活性化のための突然変異*
FnCas9	Cas9	*フランシセラ・ノビシダ(Francisella novicida)*	1629	5'-NGG-3'	Wt	D11A/H969A/N995A
FnCas9 RHA	Cas9	*フランシセラ・ノビシダ(Francisella novicida)*	1629	5'-YG-3'	E1369R/E1449H/R1556A	D11A/H969A/N995A
SaCas9	Cas9	*黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)*	1053	5'-NNGRRT-3'	Wt	D10A/H557A
SaCas9 KKH	Cas9	*黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)*	1053	5'-NNNRRT-3'	E782K/N968K/R1015H	D10A/H557A
SpCas9	Cas9	*化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)*	1368	5'-NGG-3'	Wt	D10A/D839A/H840A/N863A
SpCas9 VQR	Cas9	*化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)*	1368	5'-NGA-3'	D1135V/R1335Q/T1337R	D10A/D839A/H840A/N863A
AsCpf1 RR	Cpf1	*アシダミノコッカス属 (Acidaminococcus sp.)BV3L6*	1307	5'-TYCV-3'	S542R/K607R	E993A
AsCpf1 RVR	Cpf1	*アシダミノコッカス属 (Acidaminococcus sp.)BV3L6*	1307	5'-TATV-3'	S542R/K548V/N552R	E993A
FnCpf1	Cpf1	*フランシセラ・ノビシダ(Francisella novicida)*	1300	5'-NTTN-3'	Wt	D917A/E1006A/D1255A
NmCas9	Cas9	*髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis)*	1082	5'-NNNGATT-3'	Wt	D16A/D587A/H588A/N611A

【０１８３】

【表４－１】

表4 CRISPR/Casタンパク質、種、及び突然変異のアミノ酸配列

変異体	親宿主	タンパク質配列	ニッカーゼ (HNH)	ニッカーゼ (HNH)	ニッカーゼ (RuvC)
Nme2Cas9	髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis)	MAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPK TGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKS LPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELG ALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKD LQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCT FEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRK SKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEG LKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKF VQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRN PVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENR KDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNE KGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSR EWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVA DHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACS TVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEV MIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNR KMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIEL YEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNK KNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKG YRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGS KEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVR	N611A	H588A	D16A
PpnCas9	肺パスツレラ菌 (Pasteurella pneumotropica)	MQNNPLNYILGLDLGIASIGWAVVEIDEESSPIRLIDVGVRTFERAEVAKTGE SLALSRRLARSSRRLIKRRAERLKKAKRLLKAEKILHSIDEKLPINVWQLRVKGL KEKLERQEWAAVLLHLSKHRGYLSQRKNEGKSDNKELGALLSGIASNHQML QSSEYRTPAEIAVKKFQVEEGHIRNQRGSYTHTFSRLDLLAEMELLFQRQAEL	N605A	H582A	D13A

【０１８４】

【表４－２】

		GNSYTSTTLLENLTALLMWQKPALAGDAILKMLGKCTFEPSEYKAAKNSYSA ERFVWLTKLNNLRILENGTERALNDNERFALLEQPYEKSKLTYAQVRAMLAL SDNAIFKGVRYLGEDKKTVESKTTLIEMKFYHQIRKTLGSAELKKEWNELKGN SDLLDEIGTAFSLYKTDDDICRYLEGKLPERVLNALLENLNFDKFIQLSLKALHQ ILPLMLQGQRYDEAVSAIYGDHYGKKSTETTRLLPTIPADEIRNPVVLRTLTQA RKVINAVVRLYGSPARIHIETAREVGKSYQDRKKLEKQQEDNRKQRESAVKK FKEMFPHFVGEPKGKDILKMRLYELQQAKCLYSGKSLELHRLLEKGYVEVDH ALPFSRTWDDSFNNKVLVLANENQNKGNLTPYEWLDGKNNSERWQHFVV RVQTSGFSYAKKQRILNHKLDEKGFIERNLNDTRYVARFLCNFIADNMLLVG KGKRNVFASNGQITALLRHRWGLQKVREQNDRHHALDAVVVACSTVAMQ QKITRFVRYNEGNVFSGERIDRETGEIIPLHFPSPWAFFKENVEIRIFSENPKLE LENRLPDYPQYNHEWVQPLFVSRMPTRKMTGQGHMETVKSAKRLNEGLS VLKVPLTQLKLSDLERMVNRDREIALYESLKARLEQFGNDPAKAFAEPFYKKG GALVKAVRLEQTQKSGVLVRDGNGVADNASMVRVDVFTKGGKYFLVPIYT WQVAKGILPNRAATQGKDENDWDIMDEMATFQFSLCQNDLIKLVTKKKTI FGYFNGLNRATSNINIKEHDLDKSKGKLGIYLEVGVKLAISLEKYQVDELGKNI RPCRPTKRQHVR			
SauCas9	黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSA ALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK DGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYE GPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLN NLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTST GKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSE LTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKV DLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYS LEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQ YLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNL VDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKG YKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQ EYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVN NLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPL YKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKL SLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQA EFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPP RIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG	N580A	H557A	D10A
SauCas9-KKH	黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSA ALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK DGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYE GPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLN NLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTST GKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSE LTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKV DLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYS LEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQ YLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNL VDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKG YKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQ EYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIV NNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNP LYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVK LSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQ AEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRP PHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG	N580A	H557A	D10A

【０１８５】

【表４－３】

SauriCas9	スタフィロコッカス・アウリクラリス (Staphylococcus auricularis)	MQENQQKQNYILGLDIGITSVGYGLIDSKTREVIDAGVRLFPEADSENNSNR RSKRGARRLKRRRIHRLNRVKDLLADYQMIDLNNVPKSTDPYTIRVKGLREPL TKEEFAIALLHIAKRRGLHNISVSMGDEEQDNELSTKQQLQKNAQQLQDKY VCELQLERLTNINKVRGEKNRFKTEDFVKEVKQLCETQRQYHNIDDQFIQQY IDLVSTRREYFEGPGNGSPYGWDGDLLKWYEKLMGRCTYFPEELRSVKYAYS ADLFNALNDLNNLVVTRDDNPKLEYYEKYHIIENVFKQKKNPTLKQIAKEIGV QDYDIRGYRITKSGKPQFTSFKLYHDLKNIFEQAKYLEDVEMLDEIAKILTIYQ DEISIKKALDQLPELLTESEKSQIAQLTGYTGTHRLSLKCIHIVIDELWESPENQ MEIFTRLNLKPKKVEMSEIDSIPTTLVDEFILSPVVKRAFIQSIKVINAVINRFGL PEDIIIELAREKNSKDRRKFINKLQKQNEATRKKIEQLLAKYGNTNAKYMIEKI KLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLSNPTHYEVDHIIPRSVSFDNSLNNKVLVKQ SENSKKGNRTPYQYLSSNESKISYNQFKQHILNLSKAKDRISKKKRDMLLEER DINKFEVQKEFINRNLVDTRYATRELSNLLKTYFSTHDYAVKVKTINGGFTNH LRKVWDFKKHRNHGYKHHAEDALVIANADFLFKTHKALRRTDKILEQPGLE VNDTTVKVDTEEKYQELFETPKQVKNIKQFRDFKYSHRVDKKPNRQLINDTL YSTREIDGETYVVQTLKDLYAKDNEKVKKLFTERPQKILMYQHDPKTFEKLM TILNQYAEAKNPLAAYYEDKGEYVTKYAKKGNGPAIHKIKYIDKKLGSYLDVS NKYPETQNKLVKLSLKSFRFDIYKCEQGYKMVSIGYLDVLKKDNYYYIPKDKYE AEKQKKKIKESDLFVGSFYYNDLIMYEDELFRVIGVNSDINNLVELNMVDITY KDFCEVNNVTGEKRIKKTIGKRVVLIEKYTTDILGNLYKTPLPKKPQLIFKRGEL	N588A	H565A	D15A
SauriCas9-KKH	スタフィロコッカス・アウリクラリス (Staphylococcus auricularis)	MQENQQKQNYILGLDIGITSVGYGLIDSKTREVIDAGVRLFPEADSENNSNR RSKRGARRLKRRRIHRLNRVKDLLADYQMIDLNNVPKSTDPYTIRVKGLREPL TKEEFAIALLHIAKRRGLHNISVSMGDEEQDNELSTKQQLQKNAQQLQDKY VCELQLERLTNINKVRGEKNRFKTEDFVKEVKQLCETQRQYHNIDDQFIQQY IDLVSTRREYFEGPGNGSPYGWDGDLLKWYEKLMGRCTYFPEELRSVKYAYS ADLFNALNDLNNLVVTRDDNPKLEYYEKYHIIENVFKQKKNPTLKQIAKEIGV QDYDIRGYRITKSGKPQFTSFKLYHDLKNIFEQAKYLEDVEMLDEIAKILTIYQ DEISIKKALDQLPELLTESEKSQIAQLTGYTGTHRLSLKCIHIVIDELWESPENQ MEIFTRLNLKPKKVEMSEIDSIPTTLVDEFILSPVVKRAFIQSIKVINAVINRFGL PEDIIIELAREKNSKDRRKFINKLQKQNEATRKKIEQLLAKYGNTNAKYMIEKI KLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLSNPTHYEVDHIIPRSVSFDNSLNNKVLVKQ SENSKKGNRTPYQYLSSNESKISYNQFKQHILNLSKAKDRISKKKRDMLLEER DINKFEVQKEFINRNLVDTRYATRELSNLLKTYFSTHDYAVKVKTINGGFTNH LRKVWDFKKHRNHGYKHHAEDALVIANADFLFKTHKALRRTDKILEQPGLE VNDTTVKVDTEEKYQELFETPKQVKNIKQFRDFKYSHRVDKKPNRKLINDTL YSTREIDGETYVVQTLKDLYAKDNEKVKKLFTERPQKILMYQHDPKTFEKLM TILNQYAEAKNPLAAYYEDKGEYVTKYAKKGNGPAIHKIKYIDKKLGSYLDVS NKYPETQNKLVKLSLKSFRFDIYKCEQGYKMVSIGYLDVLKKDNYYYIPKDKYE AEKQKKKIKESDLFVGSFYKNDLIMYEDELFRVIGVNSDINNLVELNMVDITY KDFCEVNNVTGEKHIKKTIGKRVVLIEKYTTDILGNLYKTPLPKKPQLIFKRGEL	N588A	H565A	D15A
ScaCas9-Sc++	ストレプトコッカス・カニス (Streptococcus canis)	MEKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKFKVLGNTNRKSIKKNLMGALL FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRIRYLQEIFANEMAKLDDSFFQRLEESF LVEEDKKNERHPIFGNLADEVAYHRNYPTIYHLRKKLADSPEKADLRLIYLALA HIIKFRGHFLIEGKLNAENSDVAKLFYQLIQTYNQLFEESPLDEIEVDAKGILSA RLSKSKRLEKLIAVFPNEKKNGLFGNIIALALGLTPNFKSNFDLTEDAKLQLSKD TYDDDLDELLGQIGDQYADLFSAAKNLSDAILLSDILRSNSEVTKAPLSASMV KRYDEHHQDLALLKTLVRQQFPEKYAEIFKDDTKNGYAGYVDGADKKLRKRS GKLATEEEFYKFIKPILEKMDGAEELLAKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLK ELHAILRRQEEFYPFLKENREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWLTRKSEEA ITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDEQLPNKKVLPKHSLLYEYFTVYNEL TKVKYVTERMRKPEFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS VEIIGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRHYTGWGRLSRKMINGIRDKQSGKTILDFLKS DGFSNRNFMQLIHDDSLTFKEDIEKAQVSGQGDSLHEQIANLAGSPAIKKGIL QTVKIVDELVKVMGHKPENIVIEMARENQTTTKGLQQSRERKKRIEEGIKELE SQILKENPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVP QSFIKDDSIDNKVLTRSVENRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ RKFDNLTKAERGGLSEADKAGFIKRQLVETRQITKHVARILDSRMNTKRDKN DKPIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQLYKVRDINNYHHAHDAYLNAVVGTALIK	N872A	H849A	D10A

【０１８６】

【表４－４】

		KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKRFFYSNIMNFFKTEVKL ANGEIRKRPLIETNGETGEVVWNKEKDFATVRKVLAMPQVNIVKKTEVQTG GFSKESILSKRESAKLIPRKKGWDTRKYGGFGSPTVAYSILVVAKVEKGKAKKL KSVKVLVGITIMEKGSYEKDPIGFLEAKGYKDIKKELIFKLPKYSLFELENGRRR MLASAKELQKANELVLPQHLVRLLYYTQNISATTGSNNLGYIEQHREEFKEIF EKIIDFSEKYILKNKVNSNLKSSFDEQFAVSDSILLSNSFVSLLKYTSFGASGGFT FLDLDVKQGRLRYQTVTEVLDATLIYQSITGLYETRTDLSQLGGD			
SpyCas9	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA GELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A
SpyCas9- NG	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES IRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA RFLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPRAF KYFDTTIDRKVYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A

【０１８７】

【表４－５】

SpyCas9-SpRY	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAERTRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES IRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFLWPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVK ELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AKQLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDE IIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTRLGAPRAF KYFDTTIDRKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A
St1Cas9	ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)	MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTNRQG RRLARRKKHRRVRLNRLFEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFI ALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSKQLETKTPGQIQLER YQTYGQLRGDFTVEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEF INRYLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEF RAAKASYTAQEFNLLNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAK LFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETL DKLAYVLTLNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGW HNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIY NPVVAKSVRQAIKIVNAAIKEYGDFDNIVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKAN KDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYT GKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQEKGQRTPYQ ALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLV DTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDTYH HHAVDALIIAASSQLNLWKKQKNTLVSYSEDQLLDIETGELISDDEYKESVFK APYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATIYATRQAKVGKDKADE TYVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPILENYPN KQINEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYDSKLGNHIDIT PKDSNNKVVLQSVSPWRADVYFNKTTGKYEILGLKYADLQFEKGTGTYKISQ EKYNDIKKKEGVDSDSEFKFTLYKNDLLLVKDTETKEQQLFRFLSRTMPKQKH YVELKPYDKQKFEGGEALIKVLGNVANSGQCKKGLGKSNISIYKVRTDVLGN QHIIKNEGDKPKLDF	N622A	H599A	D9A
BlatCas9	ブレビバチルス・ラテロスポルス (Brevibacillus laterosporus)	MAYTMGIDVGIASCGWAIVDLERQRIIDIGVRTFEKAENPKNGEALAVPRRE ARSSRRRLRRKKHRIERLKHMFVRNGLAVDIQHLEQTLRSQNEIDVWQLRV DGLDRMLTQKEWLRVLIHLAQRRGFQSNRKTDGSSEDGQVLVNVTENDRL MEEKDYRTVAEMMVKDEKFSDHKRNKNGNYHGVVSRSSLLVEIHTLFETQ RQHHNSLASKDFELEYVNIWSAQRPVATKDQIEKMIGTCTFLPKEKRAPKAS WHFQYFMLLQTINHIRITNVQGTRSLNKEEIEQVVNMALTKSKVSYHDTRKI LDLSEEYQFVGLDYGKEDEKKKVESKETIIKLDDYHKLNKIFNEVELAKGETWE ADDYDTVAYALTFFKDDEDIRDYLQNKYKDSKNRLVKNLANKEYTNELIGKV STLSFRKVGHLSLKALRKIIPFLEQGMTYDKACQAAGFDFQGISKKKRSVVLP VIDQISNPVVNRALTQTRKVINALIKKYGSPETIHIETARELSKTFDERKNITKD YKENRDKNEHAKKHLSELGIINPTGLDIVKYKLWCEQQGRCMYSNQPISFER	N607A	H584A	D8A

【０１８８】

【表４－６】

		LKESGYTEVDHIIPYSRSMNDSYNNRVLVMTRENREKGNQTPFEYMGNDT QRWYEFEQRVTTNPQIKKEKRQNLLLKGFTNRRELEMLERNLNDTRYITKYL SHFISTNLEFSPSDKKKKVVNTSGRITSHLRSRWGLEKNRGQNDLHHAMDAI VIAVTSDSFIQQVTNYYKRKERRELNGDDKFPLPWKFFREEVIARLSPNPKEQ IEALPNHFYSEDELADLQPIFVSRMPKRSITGEAHQAQFRRVVGKTKEGKNIT AKKTALVDISYDKNGDFNMYGRETDPATYEAIKERYLEFGGNVKKAFSTDLH KPKKDGTKGPLIKSVRIMENKTLVHPVNKGKGVVYNSSIVRTDVFQRKEKYY LLPVYVTDVTKGKLPNKVIVAKKGYHDWIEVDDSFTFLFSLYPNDLIFIRQNPK KKISLKKRIESHSISDSKEVQEIHAYYKGVDSSTAAIEFIIHDGSYYAKGVGVQN LDCFEKYQVDILGNYFKVKGEKRLELETSDSNHKGKDVNSIKSTSR			
cCas9-v16	黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSA ALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK DGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYE GPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLN NLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTST GKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSE LTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKV DLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYS LEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQ YLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNL VDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKG YKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQ EYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIV NNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNP LYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVK LSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQ AEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNSDKNNLIEVNMIDITYREYLENMNDKRP PHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG	N580A	H557A	D10A
cCas9-v17	黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSA ALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK DGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYE GPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLN NLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTST GKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSE LTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKV DLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYS LEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQ YLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNL VDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKG YKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQ EYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIV NNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNP LYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVK LSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQ AEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNSTRNIVELNMIDITYREYLENMNDKRP PHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG	N580A	H557A	D10A
cCas9-v21	黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSA ALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK DGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYE GPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLN NLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTST GKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSE LTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKV DLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK	N580A	H557A	D10A

【０１８９】

【表４－７】

		DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYS LEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQ YLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNL VDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKG YKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQ EYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIV NNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNP LYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVK LSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQ AEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNSDDRNIIELNMIDITYREYLENMNDKRP PHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG			
cCas9-v42	黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSA ALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK DGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYE GPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLN NLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTST GKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSE LTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKV DLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYS LEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQ YLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNL VDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKG YKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQ EYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIV NNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNP LYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVK LSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQ AEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNNRLNKIELNMIDITYREYLENMNDKRP PHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG	N580A	H557A	D10A
CdiCas9	ジフテリア菌 (Corynebacterium diphtheriae)	MKYHVGIDVGTFSVGLAAIEVDDAGMPIKTLSLVSHIHDSGLDPDEIKSAVT RLASSGIARRTRRLYRRKRRRLQQLDKFIQRQGWPVIELEDYSDPLYPWKVR AELAASYIADEKERGEKLSVALRHIARHRGWRNPYAKVSSLYLPDGPSDAFK AIREEIKRASGQPVPETATVGQMVTLCELGTLKLRGEGGVLSARLQQSDYAR EIQEICRMQEIGQELYRKIIDVVFAAESPKGSASSRVGKDPLQPGKNRALKAS DAFQRYRIAALIGNLRVRVDGEKRILSVEEKNLVFDHLVNLTPKKEPEWVTIA EILGIDRGQLIGTATMTDDGERAGARPPTHDTNRSIVNSRIAPLVDWWKTA SALEQHAMVKALSNAEVDDFDSPEGAKVQAFFADLDDDVHAKLDSLHLPV GRAAYSEDTLVRLTRRMLSDGVDLYTARLQEFGIEPSWTPPTPRIGEPVGNP AVDRVLKTVSRWLESATKTWGAPERVIIEHVREGFVTEKRAREMDGDMRR RAARNAKLFQEMQEKLNVQGKPSRADLWRYQSVQRQNCQCAYCGSPITF SNSEMDHIVPRAGQGSTNTRENLVAVCHRCNQSKGNTPFAIWAKNTSIEG VSVKEAVERTRHWVTDTGMRSTDFKKFTKAVVERFQRATMDEEIDARSME SVAWMANELRSRVAQHFASHGTTVRVYRGSLTAEARRASGISGKLKFFDGV GKSRLDRRHHAIDAAVIAFTSDYVAETLAVRSNLKQSQAHRQEAPQWREFT GKDAEHRAAWRVWCQKMEKLSALLTEDLRDDRVVVMSNVRLRLGNGSA HKETIGKLSKVKLSSQLSVSDIDKASSEALWCALTREPGFDPKEGLPANPERHI RVNGTHVYAGDNIGLFPVSAGSIALRGGYAELGSSFHHARVYKITSGKKPAF AMLRVYTIDLLPYRNQDLFSVELKPQTMSMRQAEKKLRDALATGNAEYLG WLVVDDELVVDTSKIATDQVKAVEAELGTIRRWRVDGFFSPSKLRLRPLQM SKEGIKKESAPELSKIIDRPGWLPAVNKLFSDGNVTVVRRDSLGRVRLESTAH LPVTWKVQ	N597A	H573A	D8A
CjeCas9	カンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni)	MARILAFDIGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGESLALPRRLARSA RKRLARRKARLNHLKHLIANEFKLNYEDYQSFDESLAKAYKGSLISPYELRFRA LNELLSKQDFARVILHIAKRRGYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLANYQS VGEYLYKEYFQKFKENSKEFTNVRNKKESYERCIAQSFLKDELKLIFKKQREFG FSFSKKFEEEVLSVAFYKRALKDFSHLVGNCSFFTDEKRAPKNSPLAFMFVAL TRIINLLNNLKNTEGILYTKDDLNALLNEVLKNGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFK	N582A	H559A	D8A

【０１９０】

【表４－８】

		GEKGTYFIEFKKYKEFIKALGEHNLSQDDLNEIAKDITLIKDEIKLKKALAKYDLN QNQIDSLSKLEFKDHLNISFKALKLVTPLMLEGKKYDEACNELNLKVAINEDK KDFLPAFNETYYKDEVTNPVVLRAIKEYRKVLNALLKKYGKVHKINIELAREVG KNHSQRAKIEKEQNENYKAKKDAELECEKLGLKINSKNILKLRLFKEQKEFCAY SGEKIKISDLQDEKMLEIDHIYPYSRSFDDSYMNKVLVFTKQNQEKLNQTPFE AFGNDSAKWQKIEVLAKNLPTKKQKRILDKNYKDKEQKNFKDRNLNDTRYI ARLVLNYTKDYLDFLPLSDDENTKLNDTQKGSKVHVEAKSGMLTSALRHTW GFSAKDRNNHLHHAIDAVIIAYANNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISELD YKNKRKFFEPFSGFRQKVLDKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEEFYQSY GGKEGVLKALELGKIRKVNGKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNKFYAVPIYTMDF ALKVLPNKAVARSKKGEIKDWILMDENYEFCFSLYKDSLILIQTKDMQEPEFV YYNAFTSSTVSLIVSKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGIQNLKVFEK YIVSALGEVTKAEFRQREDFKK			
GeoCas9	ゲオバチルス・ステアロサーモフィラス (Geobacillus stearothermophilus)	MRYKIGLDIGITSVGWAVMNLDIPRIEDLGVRIFDRAENPQTGESLALPRRLA RSARRRLRRRKHRLERIRRLVIREGILTKEELDKLFEEKHEIDVWQLRVEALDR KLNNDELARVLLHLAKRRGFKSNRKSERSNKENSTMLKHIEENRAILSSYRTV GEMIVKDPKFALHKRNKGENYTNTIARDDLEREIRLIFSKQREFGNMSCTEEF ENEYITIWASQRPVASKDDIEKKVGFCTFEPKEKRAPKATYTFQSFIAWEHIN KLRLISPSGARGLTDEERRLLYEQAFQKNKITYHDIRTLLHLPDDTYFKGIVYDR GESRKQNENIRFLELDAYHQIRKAVDKVYGKGKSSSFLPIDFDTFGYALTLFKD DADIHSYLRNEYEQNGKRMPNLANKVYDNELIEELLNLSFTKFGHLSLKALRS ILPYMEQGEVYSSACERAGYTFTGPKKKQKTMLLPNIPPIANPVVMRALTQA RKVVNAIIKKYGSPVSIHIELARDLSQTFDERRKTKKEQDENRKKNETAIRQL MEYGLTLNPTGHDIVKFKLWSEQNGRCAYSLQPIEIERLLEPGYVEVDHVIPY SRSLDDSYTNKVLVLTRENREKGNRIPAEYLGVGTERWQQFETFVLTNKQFS KKKRDRLLRLHYDENEETEFKNRNLNDTRYISRFFANFIREHLKFAESDDKQK VYTVNGRVTAHLRSRWEFNKNREESDLHHAVDAVIVACTTPSDIAKVTAFY QRREQNKELAKKTEPHFPQPWPHFADELRARLSKHPKESIKALNLGNYDDQ KLESLQPVFVSRMPKRSVTGAAHQETLRRYVGIDERSGKIQTVVKTKLSEIKL DASGHFPMYGKESDPRTYEAIRQRLLEHNNDPKKAFQEPLYKPKKNGEPGP VIRTVKIIDTKNQVIPLNDGKTVAYNSNIVRVDVFEKDGKYYCVPVYTMDIM KGILPNKAIEPNKPYSEWKEMTEDYTFRFSLYPNDLIRIELPREKTVKTAAGEE INVKDVFVYYKTIDSANGGLELISHDHRFSLRGVGSRTLKRFEKYQVDVLGNI YKVRGEKRVGLASSAHSKPGKTIRPLQSTRD	N605A	H582A	D8A
iSpyMacCas9	連鎖球菌 (Streptococcus spp.)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEIQTVGQNGG LFDDNPKSPLEVTPSKLVPLKKELNPKKYGGYQKPTTAYPVLLITDTKQLIPISV MNKKQFEQNPVKFLRDRGYQQVGKNDFIKLPKYTLVDIGDGIKRLWASSKEI HKGNQLVVSKKSQILLYHAHHLDSDLSNDYLQNHNQQFDVLFNEIISFSKKC KLGKEHIQKIENVYSNKKNSASIEELAESFIKLLGFTQLGATSPFNFLGVKLNQ	N863A	H840A	D10A

【０１９１】

【表４－９】

		KQYKGKKDYILPCTEGTLIRQSITGLYETRVDLSKIGEDSGGSGGSKRTADGSEFES			
NmeCas9	髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis)	MAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRTRRLLKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVAGNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRSDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLGRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKGKKRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSAKRLDEGVSVLRVPLTQLKLKDLEKMVNREREPKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAEPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQKTGVWVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYYLVPIYSWQVAKGILPDRAVVQGKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMFGYFASCHRGTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFQKYQIDELGKEIRPCRLKKRPPVR	N611A	H588A	D16A
ScaCas9	ストレプトコッカス・カニス (Streptococcus canis)	MEKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKFKVLGNTNRKSIKKNLMGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRIRYLQEIFANEMAKLDDSFFQRLEESFLVEEDKKNERHPIFGNLADEVAYHRNYPTIYHLRKKLADSPEKADLRLIYLALAHIIKFRGHFLIEGKLNAENSDVAKLFYQLIQTYNQLFEESPLDEIEVDAKGILSARLSKSKRLEKLIAVFPNEKKNGLFGNIIALALGLTPNFKSNFDLTEDAKLQLSKDTYDDDLDELLGQIGDQYADLFSAAKNLSDAILLSDILRSNSEVTKAPLSASMVKRYDEHHQDLALLKTLVRQQFPEKYAEIFKDDTKNGYAGYVDGIGIKHRKRTTKLATQEEFYKFIKPILEKMDGAEELLAKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLKELHAILRRQEEFYPFLKENREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWLTRKSEEAITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDEQLPNKKVLPKHSLLYEYFTVYNELKVKYVTERMRKPEFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEIIGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRHYTGWGRLSRKMINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFSNRNFMQLIHDDSLTFKEEIEKAQVSGQGDSLHEQIADLAGSPAIKKGILQTVKIVDELVKVMGHKPENIVIEMARENQTTTKGLQQSRERKKRIEEGIKELESQILKENPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFIKDDSIDNKVLTRSVENRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEADKAGFIKRQLVETRQITKHVARILDSRMNTKRDKNDKPIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQLYKVRDINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKRFFYSNIMNFFKTEVKLANGEIRKRPLIETNGETGEVVWNKEKDFATVRKVLAMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILSKRESAKLIPRKKGWDTRKYGGFGSPTVAYSILVVAKVEKGKAKKLKSVKVLVGITIMEKGSYEKDPIGFLEAKGYKDIKKELIFKLPKYSLFELENGRRRMLASATELQKANELVLPQHLVRLLYYTQNISATTGSNNLGYIEQHREEFKEIFEKIIDFSEKYILKNKVNSNLKSSFDEQFAVSDSILLSNSFVSLLKYTSFGASGGFTFLDLDVKQGRLRYQTVTEVLDATLIYQSITGLYETRTDLSQLGGD	N872A	H849A	D10A
ScaCas9-HiFi-Sc++	ストレプトコッカス・カニス (Streptococcus canis)	MEKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKFKVLGNTNRKSIKKNLMGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRIRYLQEIFANEMAKLDDSFFQRLEESFLVEEDKKNERHPIFGNLADEVAYHRNYPTIYHLRKKLADSPEKADLRLIYLALAHIIKFRGHFLIEGKLNAENSDVAKLFYQLIQTYNQLFEESPLDEIEVDAKGILSARLSKSKRLEKLIAVFPNEKKNGLFGNIIALALGLTPNFKSNFDLTEDAKLQLSKDTYDDDLDELLGQIGDQYADLFSAAKNLSDAILLSDILRSNSEVTKAPLSASMVKRYDEHHQDLALLKTLVRQQFPEKYAEIFKDDTKNGYAGYVDGADKKLRKRSGKLATEEEFYKFIKPILEKMDGAEELLAKLNRDDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLKELHAILRRQEEFYPFLKENREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWLTRKSEEAITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDEQLPNKKVLPKHSLLYEYFTVYNEL	N872A	H849A	D10A

【０１９２】

【表４－１０】

		TKVKYVTERMRKPEFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS VEIIGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRHYTGWGRLSRKMINGIRDKQSGKTILDFLKS DGFSNANFMQLIHDDSLTFKEEIEKAQVSGQGDSLHEQIADLAGSPAIKKGIL QTVKIVDELVKVMGHKPENIVIEMARENQTTTKGLQQSRERKKRIEEGIKELE SQILKENPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVP QSFIKDDSIDNKVLTRSVENRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ RKFDNLTKAERGGLSEADKAGFIKRQLVETRQITKHVARILDSRMNTKRDKN DKPIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQLYKVRDINNYHHAHDAYLNAVVGTALIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKRFFYSNIMNFFKTEVKL ANGEIRKRPLIETNGETGEVVWNKEKDFATVRKVLAMPQVNIVKKTEVQTG GFSKESILSKRESAKLIPRKKGWDTRKYGGFGSPTVAYSILVVAKVEKGKAKKL KSVKVLVGITIMEKGSYEKDPIGFLEAKGYKDIKKELIFKLPKYSLFELENGRRR MLASAKELQKANELVLPQHLVRLLYYTQNISATTGSNNLGYIEQHREEFKEIF EKIIDFSEKYILKNKVNSNLKSSFDEQFAVSDSILLSNSFVSLLKYTSFGASGGFT FLDLDVKQGRLRYQTVTEVLDATLIYQSITGLYETRTDLSQLGGD			
SpyCas9-3var-NRRH	化膿性レンサ球菌(Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MVKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEE FYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGIIPHQIHLGELHAILRRQ GDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRLRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGGHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQI LKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKGNSDKLIARKKDWDPKKYGGFNSPTAAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVK ELLGITIMERSSFEKNPIGFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGVLHKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDE IIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGVPAA FKYFDTTIDKKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A
SpyCas9-3var-NRTH	化膿性レンサ球菌(Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MVKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEE FYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGIIPHQIHLGELHAILRRQ GDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRLRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGGHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQI LKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF	N863A	H840A	D10A

【０１９３】

【表４－１１】

		DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKGNSDKLIARKKDWDPKKYGGFNSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVK ELLGITIMERSSFEKNPIGFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS ASVLHKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSSEDNKQKQLFVEQHKHYLDEI IEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGASAAF KYFDTTIGRKLYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD			
SpyCas9-3var-NRCH	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MVKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEE FYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGIIPHQIHLGELHAILRRQ GDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRLRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGGHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQI LKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKGNSDKLIARKKDWDPKKYGGFNSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVK ELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGVLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDE IIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTINRKQYNTTKEVLDATLIRQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A
SpyCas9-HF1	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA GELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII	N863A	H840A	D10A

【０１９４】

【表４－１２】

		EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD			
SpyCas9-QQR1	化膿性レンサ球菌(Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA RELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADAQLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTFKQKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A
SpyCas9-SpG	化膿性レンサ球菌(Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFLWPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVK ELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AKQLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDE IIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A
SpyCas9-VQR	化膿性レンサ球菌(Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS	N863A	H840A	D10A

【０１９５】

【表４－１３】

		KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA GELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD			
SpyCas9-VRER	化膿性レンサ球菌(Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA RELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKEYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A
SpyCas9-xCas	化膿性レンサ球菌(Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDTKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKLYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGIIPHQIHLGELHAILRRQE DFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEK VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGDQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA	N863A	H840A	D10A

【０１９６】

【表４－１４】

		HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFIQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQI LKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA GVLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD			
SpyCas9-xCas-NG	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDTKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKLYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGIIPHQIHLGELHAILRRQE DFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEK VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGDQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFIQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQI LKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES IRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA RFLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPRAF KYFDTTIDRKVYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A
St1Cas9-CNRZ1066	ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)	MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTNRQG RRLARRKKHRRVRLNRLFEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFI ALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSKQLETKTPGQIQLER YQTYGQLRGDFTVEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEF INRYLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEF RAAKASYTAQEFNLLNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAK LFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETL DKLAYVLTLNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGW HNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIY NPVVAKSVRQAIKIVNAAIKEYGDFDNIVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKAN KDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYT GKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQEKGQRTPYQ ALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLV DTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDTYH HHAVDALIIAASSQLNLWKKQKNTLVSYSEEQLLDIETGELISDDEYKESVFKA PYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATIYATRQAKVGKDKKDET YVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPILENYPNK QMNEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYDSKLLGNPIDI TPENSKNKVVLQSLKPWRTDVYFNKATGKYEILGLKYADLQFEKGTGTYKIS	N622A	H599A	D9A

【０１９７】

【表４－１５】

		QEKYNDIKKKEGVDSDSEFKFTLYKNDLLLVKDTETKEQQLFRFLSRTLPKQK HYVELKPYDKQKFEGGEALIKVLGNVANGGQCIKGLAKSNISIYKVRTDVLG NQHIIKNEGDKPKLDF			
St1Cas9-LMG1831	ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)	MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTNRQG RRLARRKKHRRVRLNRLFEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFI ALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSKQLETKTPGQIQLER YQTYGQLRGDFTVEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEF INRYLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEF RAAKASYTAQEFNLLNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAK LFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETL DKLAYVLTLNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGW HNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIY NPVVAKSVRQAIKIVNAAIKEYGDFDNIVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKAN KDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYT GKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQEKGQRTPYQ ALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLV DTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDTYH HHAVDALIIAASSQLNLWKKQKNTLVSYSEEQLLDIETGELISDDEYKESVFKA PYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATIYATRQAKVGKDKKDET YVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPILENYPNK QMNEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYDSKLLGNPIDI TPENSKNKVVLQSLKPWRTDVYFNKNTGKYEILGLKYADLQFEKKTGTYKISQ EKYNGIMKEEGVDSDSEFKFTLYKNDLLLVKDTETKEQQLFRFLSRTMPNVK YYVELKPYSKDKFEKNESLIEILGSADKSGRCIKGLGKSNISIYKVRTDVLGNQH IIKNEGDKPKLDF	N622A	H599A	D9A
St1Cas9-MTH17CL396	ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)	MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTNRQG RRLARRKKHRRVRLNRLFEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFI ALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSKQLETKTPGQIQLER YQTYGQLRGDFTVEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEF INRYLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEF RAAKASYTAQEFNLLNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAK LFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETL DKLAYVLTLNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGW HNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIY NPVVAKSVRQAIKIVNAAIKEYGDFDNIVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKAN KDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYT GKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQEKGQRTPYQ ALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLV DTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDTYH HHAVDALIIAASSQLNLWKKQKNTLVSYSEDQLLDIETGELISDDEYKESVFK APYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATIYATRQAKVGKDKADE TYVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPILENYPN KQINEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYDSKLGNHIDIT PKDSNNKVVLQSLKPWRTDVYFNKNTGKYEILGLKYSDMQFEKGTGKYSISK EQYENIKVREGVDENSEFKFTLYKNDLLLLKDSENGEQILLRFTSRNDTSKHYV ELKPYNRQKFEGSEYLIKSLGTVAKGGQCIKGLGKSNISIYKVRTDVLGNQHII KNEGDKPKLDF	N622A	H599A	D9A
St1Cas9-TH1477	ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)	MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTNRQG RRLARRKKHRRVRLNRLFEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFI ALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSKQLETKTPGQIQLER YQTYGQLRGDFTVEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEF INRYLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEF RAAKASYTAQEFNLLNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAK LFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETL DKLAYVLTLNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGW HNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIY NPVVAKSVRQAIKIVNAAIKEYGDFDNIVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKAN KDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYT GKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQEKGQRTPYQ	N622A	H599A	D9A

【０１９８】

【表４－１６】

		ALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLV DTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDTYH HHAVDALIIAASSQLNLWKKQKNTLVSYSEDQLLDIETGELISDDEYKESVFK APYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATIYATRQAKVGKDKADE TYVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPILENYPN KQINEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYDSKLGNHIDIT PKDSNNKVVLQSLKPWRTDVYFNKNTGKYEILGLKYSDMQFEKGTGKYSISK EQYENIKVREGVDENSEFKFTLYKNDLLLLKDSENGEQILLRFTSRNDTSKHYV ELKPYNRQKFEGSEYLIKSLGTVVKGGRCIKGLGKSNISIYKVRTDVLGNQHIIK NEGDKPKLDF			
sRGN3.1	スタフィロコッカス属 (Staphylococcus spp.)	MNQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGS RRLKRRRIHRLERVKLLLTEYDLINKEQIPTSNNPYQIRVKGLSEILSKDELAIAL LHLAKRRGIHNVDVAADKEETASDSLSTKDQINKNAKFLESRYVCELQKERLE NEGHVRGVENRFLTKDIVREAKKIIDTQMQYYPEIDETFKEKYISLVETRREYF EGPGQGSPFGWNGDLKKWYEMLMGHCTYFPQELRSVKYAYSADLFNALN DLNNLIIQRDNSEKLEYHEKYHIIENVFKQKKKPTLKQIAKEIGVNPEDIKGYRI TKSGTPEFTSFKLFHDLKKVVKDHAILDDIDLLNQIAEILTIYQDKDSIVAELGQ LEYLMSEADKQSISELTGYTGTHSLSLKCMNMIIDELWHSSMNQMEVFTYL NMRPKKYELKGYQRIPTDMIDDAILSPVVKRTFIQSINVINKVIEKYGIPEDIIIE LARENNSDDRKKFINNLQKKNEATRKRINEIIGQTGNQNAKRIVEKIRLHDQ QEGKCLYSLESIPLEDLLNNPNHYEVDHIIPRSVSFDNSYHNKVLVKQSENSK KSNLTPYQYFNSGKSKLSYNQFKQHILNLSKSQDRISKKKKEYLLEERDINKFE VQKEFINRNLVDTRYATRELTNYLKAYFSANNMNVKVKTINGSFTDYLRKV WKFKKERNHGYKHHAEDALIIANADFLFKENKKLKAVNSVLEKPEIETKQLDI QVDSEDNYSEMFIIPKQVQDIKDFRNFKYSHRVDKKPNRQLINDTLYSTRKK DNSTYIVQTIKDIYAKDNTTLKKQFDKSPEKFLMYQHDPRTFEKLEVIMKQYA NEKNPLAKYHEETGEYLTKYSKKNNGPIVKSLKYIGNKLGSHLDVTHQFKSST KKLVKLSIKNYRFDVYLTEKGYKFVTIAYLNVFKKDNYYYIPKDKYQELKEKKKI KDTDQFIASFYKNDLIKLNGDLYKIIGVNSDDRNIIELDYYDIKYKDYCEINNIK GEPRIKKTIGKKTESIEKFTTDVLGNLYLHSTEKAPQLIFKRGL	N585A	H562A	D10A
sRGN3.3	スタフィロコッカス属 (Staphylococcus spp.)	MNQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGS RRLKRRRIHRLERVKLLLTEYDLINKEQIPTSNNPYQIRVKGLSEILSKDELAIAL LHLAKRRGIHNVDVAADKEETASDSLSTKDQINKNAKFLESRYVCELQKERLE NEGHVRGVENRFLTKDIVREAKKIIDTQMQYYPEIDETFKEKYISLVETRREYF EGPGQGSPFGWNGDLKKWYEMLMGHCTYFPQELRSVKYAYSADLFNALN DLNNLIIQRDNSEKLEYHEKYHIIENVFKQKKKPTLKQIAKEIGVNPEDIKGYRI TKSGTPEFTSFKLFHDLKKVVKDHAILDDIDLLNQIAEILTIYQDKDSIVAELGQ LEYLMSEADKQSISELTGYTGTHSLSLKCMNMIIDELWHSSMNQMEVFTYL NMRPKKYELKGYQRIPTDMIDDAILSPVVKRTFIQSINVINKVIEKYGIPEDIIIE LARENNSDDRKKFINNLQKKNEATRKRINEIIGQTGNQNAKRIVEKIRLHDQ QEGKCLYSLESIPLEDLLNNPNHYEVDHIIPRSVSFDNSYHNKVLVKQSENSK KSNLTPYQYFNSGKSKLSYNQFKQHILNLSKSQDRISKKKKEYLLEERDINKFE VQKEFINRNLVDTRYATRELTSYLKAYFSANNMDVKVKTINGSFTNHLRKV WRFDKYRNHGYKHHAEDALIIANADFLFKENKKLQNTNKILEKPTIENNTKK VTVEKEEDYNNVFETPKLVEDIKQYRDYKFSHRVDKKPNRQLINDTLYSTRM KDEHDYIVQTITDIYGKDNTNLKKQFNKNPEKFLMYQNDPKTFEKLSIIMKQ YSDEKNPLAKYYEETGEYLTKYSKKNNGPIVKKIKLLGNKVGNHLDVTNKYEN STKKLVKLSIKNYRFDVYLTEKGYKFVTIAYLNVFKKDNYYYIPKDKYQELKEKK KIKDTDQFIASFYKNDLIKLNGDLYKIIGVNSDDRNIIELDYYDIKYKDYCEINNI KGEPRIKKTIGKKTESIEKFTTDVLGNLYLHSTEKAPQLIFKRGL	N585A	H562A	D10A

【０１９９】

一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）が、Ｃａｓタンパク質が結合及び／又は機能する対象の標的ＤＮＡ配列内に存在するか又はそれに隣接することが求められる。一部の実施形態では、ＰＡＭは、５’から３’にかけて、ＮＧＧ、ＹＧ、ＮＮＧＲＲＴ、ＮＮＮＲＲＴ、ＮＧＡ、ＴＹＣＶ、ＴＡＴＶ、ＮＴＴＮ、又はＮＮＮＧＡＴＴであるか又はそれらを含み、ここでＮは任意のヌクレオチドを表し、ＹはＣ又はＴを表し、ＲはＡ又はＧを表し、ＶはＡ又はＣ又はＧを表す。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、表３又は４に列記されるタンパク質である。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、そのＰＡＭを改変する、１つ又は複数の突然変異を含む。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｅ１３６９Ｒ、Ｅ１４４９Ｈ、及びＲ１５

５６Ａの突然変異又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｅ７８２Ｋ、Ｎ９６８Ｋ、及びＲ１０１５Ｈの突然変異又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｄ１１３５Ｖ、Ｒ１３３５Ｑ、及びＴ１３３７Ｒの突然変異又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｓ５４２Ｒ及びＫ６０７Ｒの突然変異又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｓ５４２Ｒ、Ｋ５４８Ｖ、及びＮ５５２Ｒの突然変異又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。改変されたＰＡＭ配列を認識するためのＣａｓ酵素の改変の例示的な進歩が、全体が参照により本明細書に組み込まれるＣｏｌｌｉａｓ ｅｔ ａｌ Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ １２：５５５（２０２１）において概説される。

【０２００】

一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、触媒的に活性であり、標的ＤＮＡ部位の一方又は両方の鎖を切断する。一部の実施形態では、標的ＤＮＡ部位の切断に続いて、改変、例えば、挿入又は欠失が、例えば、細胞修復機構によって形成される。

【０２０１】

一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、例えば、ヌクレアーゼ欠損Ｃａｓ９のように、ヌクレアーゼを非活性化又は部分的に非活性化するように修飾される。野生型Ｃａｓ９が、ｇＲＮＡによって標的にされる特定のＤＮＡ配列で二本鎖切断（ＤＳＢ）を生成する一方、修飾された機能性を有するいくつかのＣＲＩＳＰＲエンドヌクレアーゼが利用可能であり、例えば部分的に非活性化されているＣａｓ９の「ニッカーゼ」バージョンは、一本鎖切断のみを生成し；触媒的に不活性であるＣａｓ９（「ｄＣａｓ９」）は、標的ＤＮＡを切断しない。一部の実施形態では、ｄＣａｓ９のＤＮＡ配列への結合は、立体障害によってその部位で転写に干渉し得る。一部の実施形態では、ｄＣａｓ９のアンカー配列への結合は、ゲノム複合体（例えば、ＡＳＭＣ）の形成及び／又は維持に干渉（例えば、それを低減又は阻止）し得る。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、触媒的に不活性なＣａｓ９、例えば、ｄＣａｓ９を含む。多数の触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質は、当技術分野で公知である。一部の実施形態では、ｄＣａｓ９は、Ｃａｓタンパク質の各エンドヌクレアーゼドメイン内に、突然変異、例えば、Ｄ１０Ａ及びＨ８４０Ａ又はＮ８６３Ａ突然変異を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性な又は部分的に不活性なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインは、１つ又は複数の突然変異、例えば、表３に列記される突然変異の１つ又は複数を含むＣａｓタンパク質を含む。一部の実施形態では、表３の所与の行に記載されるＣａｓタンパク質は、表３の同じ行に列記される突然変異の１つ、２つ、３つ、又は全部を含む。一部の実施形態では、例えば、表３に記載されていないＣａｓタンパク質は、表３のある行に列記される突然変異の１つ、２つ、３つ若しくは全部又はそのＣａｓタンパク質中の対応する部位での対応する突然変異を含む。

【０２０２】

一部の実施形態では、触媒的に不活性な、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｄ１１突然変異（例えば、Ｄ１１Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｈ９６９突然変異（例えば、Ｈ９６９Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｎ９９５突然変異（例えば、Ｎ９９５Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９は、Ｄ１１、Ｈ９６９、及びＮ９９５の位置の１つ、２つ若しくは３つでの突然変異（例えば、Ｄ１１Ａ、Ｈ９６９Ａ、及びＮ９９５Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。

【０２０３】

一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｄ１０突然変異（例えば、Ｄ１０Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｈ５５７突然変異（例えば、Ｈ５５７Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９は、Ｄ１０突然変異（例えば、Ｄ１０Ａ突然変異）及びＨ５５７突然変異（例えば、Ｈ５５７Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。

【０２０４】

一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｄ８３９突然変異（例えば、Ｄ８３９Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｈ８４０突然変異（例えば、Ｈ８４０Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｎ８６３突然変異（例えば、Ｎ８６３Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９は、Ｄ１０突然変異（例えば、Ｄ１０Ａ）、Ｄ８３９突然変異（例えば、Ｄ８３９Ａ）、Ｈ８４０突然変異（例えば、Ｈ８４０Ａ）、及びＮ８６３突然変異（例えば、Ｎ８６３Ａ）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。

【０２０５】

一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｅ９９３突然変異（例えば、Ｅ９９３Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。

【０２０６】

一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｄ９１７突然変異（例えば、Ｄ９１７Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｅ１００６突然変異（例えば、Ｅ１００６Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｄ１２５５突然変異（例えば、Ｄ１２５５Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９は、Ｄ９１７突然変異（例えば、Ｄ９１７Ａ）、Ｅ１００６突然変異（例えば、Ｅ１００６Ａ）、及びＤ１２５５突然変異（例えば、Ｄ１２５５Ａ）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。

【０２０７】

一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｄ１６突然変異（例えば、Ｄ１６Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｄ５８７突然変異（例えば、Ｄ５８７Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、部分的に非活性化されたＣａｓドメインは、ニッカーゼ活性を有する。一部の実施形態では、部分的に非活性化されたＣａｓ９ドメインは、Ｃａｓ９ニッカーゼドメインである。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓドメイン又は不活性Ｃａｓドメインは、検出可能な二本鎖切断を形成しない。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣ

ａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｈ５８８突然変異（例えば、Ｈ５８８Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｎ６１１突然変異（例えば、Ｎ６１１Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９は、Ｄ１６突然変異（例えば、Ｄ１６Ａ）、Ｄ５８７突然変異（例えば、Ｄ５８７Ａ）、Ｈ５８８突然変異（例えば、Ｈ５８８Ａ）、及びＮ６１１突然変異（例えば、Ｎ６１１Ａ）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。

【０２０８】

一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメイン又はエンドヌクレアーゼドメインは、ｇＲＮＡ（例えば、ｇＲＮＡを含む鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡ）を含むか又はそれに（例えば共有結合的に）連結されたＣａｓ分子を含み得る。

【０２０９】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、化膿性レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９（ＳｐＣａｓ９）又はその機能性断片若しくは変異体を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、修飾ＳｐＣａｓ９を含む。複数の実施形態では、修飾ＳｐＣａｓ９は、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）特異性を改変する修飾を含む。複数の実施形態では、ＰＡＭは、核酸配列５’－ＮＧＴ－３’に対する特異性を有する。複数の実施形態では、修飾ＳｐＣａｓ９は、例えば、Ｌ１１１１、Ｄ１１３５、Ｇ１２１８、Ｅ１２１９、Ａ１３２２、又はＲ１３３５の１つ若しくは複数の位置に、１つ若しくは複数のアミノ酸置換を含み、それは、例えば、Ｌ１１１１Ｒ、Ｄ１１３５Ｖ、Ｇ１２１８Ｒ、Ｅ１２１９Ｆ、Ａ１３２２Ｒ、Ｒ１３３５Ｖから選択される。複数の実施形態では、修飾ＳｐＣａｓ９は、アミノ酸置換Ｔ１３３７Ｒと、Ｌ１１１１、Ｄ１１３５Ｌ、Ｓ１１３６Ｒ、Ｇ１２１８Ｓ、Ｅ１２１９Ｖ、Ｄ１３３２Ａ、Ｄ１３３２Ｓ、Ｄ１３３２Ｔ、Ｄ１３３２Ｖ、Ｄ１３３２Ｌ、Ｄ１３３２Ｋ、Ｄ１３３２Ｒ、Ｒ１３３５Ｑ、Ｔ１３３７、Ｔ１３３７Ｌ、Ｔ１３３７Ｑ、Ｔ１３３７Ｉ、Ｔ１３３７Ｖ、Ｔ１３３７Ｆ、Ｔ１３３７Ｓ、Ｔ１３３７Ｎ、Ｔ１３３７Ｋ、Ｔ１３３７Ｈ、Ｔ１３３７Ｑ、及びＴ１３３７Ｍ、又はそれらに対応するアミノ酸置換から選択される１つ若しくは複数の別のアミノ酸置換を含む。複数の実施形態では、修飾ＳｐＣａｓ９は、（ｉ）Ｄ１１３５Ｌ、Ｓ１１３６Ｒ、Ｇ１２１８Ｓ、Ｅ１２１９Ｖ、Ａ１３２２Ｒ、Ｒ１３３５Ｑ、及びＴ１３３７から選択される１つ若しくは複数のアミノ酸置換；並びに（ｉｉ）Ｌ１１１１Ｒ、Ｇ１２１８Ｒ、Ｅ１２１９Ｆ、Ｄ１３３２Ａ、Ｄ１３３２Ｓ、Ｄ１３３２Ｔ、Ｄ１３３２Ｖ、Ｄ１３３２Ｌ、Ｄ１３３２Ｋ、Ｄ１３３２Ｒ、Ｔ１３３７Ｌ、Ｔ１３３７Ｉ、Ｔ１３３７Ｖ、Ｔ１３３７Ｆ、Ｔ１３３７Ｓ、Ｔ１３３７Ｎ、Ｔ１３３７Ｋ、Ｔ１３３７Ｒ、Ｔ１３３７Ｈ、Ｔ１３３７Ｑ、及びＴ１３３７Ｍ、又はそれらに対応するアミノ酸置換から選択される１つ若しくは複数の別のアミノ酸置換を含む。

【０２１０】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、Ｃａｓドメイン、例えばＣａｓ９ドメインを含む。複数の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、ヌクレアーゼ活性Ｃａｓドメイン、Ｃａｓニッカーゼ（ｎＣａｓ）ドメイン、又はヌクレアーゼ不活性Ｃａｓ（ｄＣａｓ）を含む。複数の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、ヌクレアーゼ活性Ｃａｓ９ドメイン、Ｃａｓ９ニッカーゼ（ｎＣａｓ９）ドメイン、又はヌクレアーゼ不活性Ｃａｓ９（ｄＣａｓ）を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、Ｃａｓ９のＣａｓ９ドメイン（例えば、ｄＣａｓ９及びｎＣａｓ９）、Ｃａｓ１２ａ／Ｃｐｆ１、Ｃａｓ１２ｂ／Ｃ２ｃ１、Ｃａｓ１２ｃ／Ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１２ｄ／ＣａｓＹ、Ｃａｓ１２ｅ／ＣａｓＸ、Ｃａｓ１２ｇ、Ｃａｓ１２ｈ、又はＣａｓ１２ｉを含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメ

インは、Ｃａｓ９（例えば、ｄＣａｓ９及びｎＣａｓ９）、Ｃａｓ１２ａ／Ｃｐｆｌ、Ｃａｓ１２ｂ／Ｃ２ｃｌ、Ｃａｓ１２ｃ／Ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１２ｄ／ＣａｓＹ、Ｃａｓ１２ｅ／ＣａｓＸ、Ｃａｓ１２ｇ、Ｃａｓ１２ｈ、又はＣａｓ１２ｉを含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、化膿性レンサ球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）若しくはＳ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）Ｃａｓ９、又はその機能性断片を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、例えば、Ｃｈｙｌｉｎｓｋｉ，Ｒｈｕｎ，ａｎｄ Ｃｈａｒｐｅｎｔｉｅｒ（２０１３）ＲＮＡ Ｂｉｏｌｏｇｙ １０：５，７２６－７３７（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、Ｃａｓ９配列を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、Ｃａｓ、例えば、本明細書に記載されるように、Ｃａｓ９、又はその変異体のＨＮＨヌクレアーゼサブドメイン及び／又はＲｕｖＣ１サブドメインを含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、Ｃａｓ１２ａ／Ｃｐｆｌ、Ｃａｓ１２ｂ／Ｃ２ｃｌ、Ｃａｓ１２ｃ／Ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１２ｄ／ＣａｓＹ、Ｃａｓ１２ｅ／ＣａｓＸ、Ｃａｓ１２ｇ、Ｃａｓ１２ｈ、又はＣａｓ１２ｉを含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、Ｃａｓポリペプチド（例えば、酵素）、又はその機能性断片を含む。複数の実施形態では、Ｃａｓポリペプチド（例えば酵素）は、Ｃａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ５ｄ、Ｃａｓ５ｔ、Ｃａｓ５ｈ、Ｃａｓ５ａ、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ８ａ、Ｃａｓ８ｂ、Ｃａｓ８ｃ、Ｃａｓ９（例えば、Ｃｓｎ１若しくはＣｓｘ１２）、Ｃａｓ１０、Ｃａｓ１０ｄ、Ｃａｓ１２ａ／Ｃｐｆｌ、Ｃａｓ１２ｂ／Ｃ２ｃｌ、Ｃａｓ１２ｃ／Ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１２ｄ／ＣａｓＹ、Ｃａｓ１２ｅ／ＣａｓＸ、Ｃａｓ１２ｇ、Ｃａｓ１２ｈ、Ｃａｓ１２ｉ、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｙ４、Ｃｓｅ１、Ｃｓｅ２、Ｃｓｅ３、Ｃｓｅ４、Ｃｓｅ５ｅ、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ１、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ１、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘ１、Ｃｓｘ１Ｓ、Ｃｓｘ１１、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、ＣｓＯ、Ｃｓｆ４、Ｃｓｄ１、Ｃｓｄ２、Ｃｓｔ１、Ｃｓｔ２、Ｃｓｈ１、Ｃｓｈ２、Ｃｓａ１、Ｃｓａ２、Ｃｓａ３、Ｃｓａ４、Ｃｓａ５、ＩＩ型Ｃａｓエフェクタータンパク質、Ｖ型Ｃａｓエフェクタータンパク質、ＶＩ型Ｃａｓエフェクタータンパク質、ＣＡＲＦ、ＤｉｎＧ、Ｃｐｆ１、Ｃａｓ１２ｂ／Ｃ２ｃ１、Ｃａｓ１２ｃ／Ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１２ｂ／Ｃ２ｃ１、Ｃａｓ１２ｃ／Ｃ２ｃ３、ＳｐＣａｓ９（Ｋ８５５Ａ）、ｅＳｐＣａｓ９（１．１）、ＳｐＣａｓ９－ＨＦ１、超精密（ｈｙｐｅｒ ａｃｃｕｒａｔｅ）Ｃａｓ９変異体（ＨｙｐａＣａｓ９）、それらの相同体、それらの修飾若しくは操作バージョン、及び／又はそれらの機能性断片から選択される。複数の実施形態では、Ｃａｓ９は、例えば、Ｈ８４０Ａ、Ｄ１０Ａ、Ｐ４７５Ａ、Ｗ４７６Ａ、Ｎ４７７Ａ、Ｄ１１２５Ａ、Ｗ１１２６Ａ、及びＤ１１２７Ａから選択される１つ又は複数の置換を含む。複数の実施形態では、Ｃａｓ９は、Ｄ１０、Ｇ１２、Ｇ１７、Ｅ７６２、Ｈ８４０、Ｎ８５４、Ｎ８６３、Ｈ９８２、Ｈ９８３、Ａ９８４、Ｄ９８６、及び／又はＡ９８７から選択される位置に１つ若しくは複数の突然変異、例えばＤ１０Ａ、Ｇ１２Ａ、Ｇ１７Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３Ａ、Ｈ９８２Ａ、Ｈ９８３Ａ、Ａ９８４Ａ、及び／又はＤ９８６Ａから選択される１つ若しくは複数の置換を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、コリネバクテリウム・ウルセランス（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｕｌｃｅｒａｎｓ）、ジフテリア菌（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ）、スピロプラズマ・シルフィディコーラ（Ｓｐｉｒｏｐｌａｓｍａ ｓｙｒｐｈｉｄｉｃｏｌａ）、プレボテーラ・インターメディア（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａ）、スピロプラズマ・タイワネンス（Ｓｐｉｒｏｐｌａｓｍａ ｔａｉｗａｎｅｎｓｅ）、ストレプトコッカス・イニエ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｉｎｉａｅ）、ベルリエラ・バルティカ（Ｂｅｌｌｉｅｌｌａ ｂａｌｔｉｃａ）、サイクロフレクサス・トークイス（Ｐｓｙｃｈｒｏｆ

ｌｅｘｕｓ　ｔｏｒｑｕｉｓ）、スタフィロコッカス・サーモフィラス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）、リステリア・イノキュア（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｉｎｎｏｃｕａ）、カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ）、髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ　ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、化膿性レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）若しくは黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）、又はその機能性断片若しくは変異体に由来するＣａｓ（例えば、Ｃａｓ９）配列を含む。

【０２１１】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、例えば、位置：Ｄ９１７、Ｅ１００６Ａ、Ｄ１２５５又はそれらの任意の組合せに、例えばＤ９１７Ａ、Ｅ１００６Ａ、Ｄ１２５５Ａ、Ｄ９１７Ａ／Ｅ１００６Ａ、Ｄ９１７Ａ／Ｄ１２５５Ａ、Ｅ１００６Ａ／Ｄ１２５５Ａ、及びＤ９１７Ａ／Ｅ１００６Ａ／Ｄ１２５５Ａから選択される、１つ若しくは複数の置換を含む、Ｃｐｆ１ドメインを含む。

【０２１２】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、ｓｐＣａｓ９、ｓｐＣａｓ９－ＶＲＱＲ（配列番号４０１９）、ｓｐＣａｓ９－ＶＲＥＲ（配列番号４０２０）、ｘＣａｓ９（ｓｐ）、ｓａＣａｓ９、ｓａＣａｓ９－ＫＫＨ、ｓｐＣａｓ９－ＭＱＫＳＥＲ（配列番号４０２１）、ｓｐＣａｓ９－ＬＲＫＩＱＫ（配列番号４０２２）、又はｓｐＣａｓ９－ＬＲＶＳＱＬ（配列番号４０２３）を含む。

【０２１３】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、Ｃａｓ９ニッカーゼ、例えば、Ｃａｓ９　Ｈ８４０Ａを含むエンドヌクレアーゼドメインを有する。複数の実施形態では、Ｃａｓ９　Ｈ８４０Ａは、以下のアミノ酸配列を有する。

Ｃａｓ９ニッカーゼ（Ｈ８４０Ａ）：

【化６】

DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEA
TRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGN
IVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV
DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI
ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAIL
LSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAG
YIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI
LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVV
DKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLS
GEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKII
KDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG
RLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSL
HEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRE
RMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDV
DAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK
FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYK
VYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGG
FDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKK
DLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPED
NEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHL
FTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD

【０２１４】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、Ｄ１０Ａ及び／又はＨ８４０Ａ突然変異を含むｄＣａｓ９配列、例えば、以下の配列を含む。

【化７】

SMDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGET
AEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPI
FGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDN
SDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLF
GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLS
DAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG
YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGE
LHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE
EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKP
AFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL
LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYT
GWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQK
NSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLS
DYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLI
TQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR
EVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVY
GDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETG
EIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK
KYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYK
EVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKG
SPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAE
NIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD
(配列番号：4007)

【０２１５】

ＴＡＬエフェクター及びジンクフィンガーヌクレアーゼ

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、ＴＡＬエフェクター分子を含む。ＴＡＬエフェクター分子、例えば、ＤＮＡ配列に特異的に結合するＴＡＬエフェクター分子は、典型的に、複数のＴＡＬエフェクタードメイン又はそれらの断片及び任意選択で天然に存在するＴＡＬエフェクターの１つ又は複数の更なる部分（例えば、複数のＴＡＬエフェクタードメインのＮ末端及び／又はＣ末端）を含む。多くのＴＡＬエフェクターは、当業者に公知であり、例えば、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから市販されている。

【０２１６】

天然に存在するＴＡＬＥは、宿主植物における遺伝子発現を調節し、細菌の定着及び生存を促進する、植物病原体ザントモナス（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ）を含む、極めて多数の細菌性病原体の種によって分泌される天然エフェクタータンパク質である。ＴＡＬエフェクターの特異的結合は、典型的に、３３又は３４アミノ酸のタンデムに配列されたほぼ同一のリピートの中央のリピートドメイン（反復可変二残基、ＲＶＤドメイン）に基づく。

【０２１７】

ＴＡＬエフェクターファミリーのメンバーは、主に、それらのリピートの数及び順序が異なる。リピートの数は、典型的に、１．５～３３．５リピートの範囲であり、Ｃ末端リピートは通常、長さがより短く（例えば、約２０アミノ酸）、一般に「ハーフリピート」と称される。ＴＡＬエフェクターの各リピートは、一般に、異なる塩基対特異性を示す異なるリピート型との１リピート対１塩基対相関を特徴とする（１リピートが標的遺伝子配列上の１塩基対を認識する）。一般に、リピートの数が減少すると、タンパク質－ＤＮＡ相互作用が減弱する。いくつかの６．５リピートが、リポータ遺伝子の転写を活性化するのに十分であることが明らかにされている（Ｓｃｈｏｌｚｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）。

【０２１８】
リピート間の変動は、主にアミノ酸位置１２及び１３で起こり、それ故、例示的な反復可変二残基（ＲＶＤ）及び核酸塩基標的に対するそれらの対応を列記する表５に示すように、「超可変」と称されており、標的ＤＮＡプロモータ配列との相互作用の特異性に関与する。
【０２１９】
【表５】

表 5-RVD 及び核酸塩基特異性

標的	可能な RVD アミノ酸組合せ												
A	NI	NN	CI	HI	KI								
G	NN	GN	SN	VN	LN	DN	QN	EN	HN	RH	NK	AN	FN
C	HD	RD	KD	ND	AD								
T	NG	HG	VG	IG	EG	MG	YG	AA	EP	VA	QG	KG	RG

【０２２０】
従って、ＴＡＬエフェクターのリピートを修飾し、特定のＤＮＡ配列を標的にすることは可能である。更に、試験では、ＲＶＤ　ＮＫがＧを標的にし得ることが明らかにされている。更に、ＴＡＬエフェクターの標的部位は、第１のリピートによって標的にされる５’塩基に隣接するＴを含む傾向があるが、この認識の正確な機構は未知である。１１３を超えるＴＡＬエフェクター配列が、現在まで公知である。ザントモナス（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ）からのＴＡＬエフェクターの非限定的な例として、Ｈａｘ２、Ｈａｘ３、Ｈａｘ４、ＡｖｒＸａ７、ＡｖｒＸａ１０及びＡｖｒＢｓ３が挙げられる。
【０２２１】
従って、本明細書に記載のＴＡＬエフェクター分子のＴＡＬエフェクタードメインは、任意の細菌種（例えば、ザントモナス・オリゼ・パソバー・オリゼ（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ　ｏｒｙｚａｅ　ｐｖ．Ｏｒｙｚａｅ）のアフリカ株（Ｙｕ　ｅｔ　ａｌ．２０１１）、ザントモナス・キャンペストリス・パソバー・ラファニ（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ　ｃａｍｐｅｓｔｒｉｓ　ｐｖ．ｒａｐｈａｎｉ）株７５６Ｃ及びイネ白葉枯病菌（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ　ｏｒｙｚａｅ　ｐｖ．ｏｒｙｚｉｃｏｌａ）ＢＬＳ２５６（Ｂｏｇｄａｎｏｖｅ　ｅｔ　ａｌ．２０１１）などのザントモナス（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ）種）からのＴＡＬエフェクターに由来し得る。一部の実施形態では、ＴＡＬエフェクタードメインは、やはり天然に存在するＴＡＬエフェクターからのＲＶＤドメイン及び隣接配列（ＲＶＤドメインのＮ末端側及び／又はＣ末端側の配列）を含む。それは、天然に存在するＴＡＬエフェクターのＲＶＤよりも多い又は少ないリピートを含み得る。ＴＡＬエフェクター分子は、当技術分野で公知の上記コードやその他に基づく所与のＤＮＡ配列を標的にするように設計され得る。ＴＡＬエフェクタードメイン（例えば、リピート（単量体又はモジュール））の数及びそれらの特定の配列は、所望のＤＮＡ標的配列に基づいて選択され得る。例えば、ＴＡＬエフェクタードメイン、例えば、リピートは、特定の標的配列に適するように除去又は付加され得る。ある実施形態では、本発明のＴＡＬエフェクター分子は、６．５～３３．５のＴＡＬエフェクタードメイン、例えば、リピートを含む。ある実施形態では、本発明のＴＡＬエフェクター分子は、８～３３．５のＴＡＬエフェクタードメイン、例えば、リピート、例えば、１０～２５のＴＡＬエフェクタードメイン、例えば、リピート、例えば、１０～１４のＴＡＬエフェクタードメイン、例えば、リピートを含む。
【０２２２】
一部の実施形態では、ＴＡＬエフェクター分子は、ＤＮＡ標的配列との完全一致に対応するＴＡＬエフェクタードメインを含む。一部の実施形態では、ＤＮＡ標的配列上のリピートと標的塩基対との間のミスマッチは、ＴＡＬエフェクター分子を含むポリペプチドの

機能を可能にする限り、許容される。一般に、ＴＡＬＥ結合は、ミスマッチの数と逆相関する。一部の実施形態では、本発明のポリペプチドのＴＡＬエフェクター分子は、標的ＤＮＡ配列との、多くて７つのミスマッチ、６つのミスマッチ、５つのミスマッチ、４つのミスマッチ、３つのミスマッチ、２つのミスマッチ、又は１つのミスマッチを含み、及び任意選択でミスマッチを含まない。特定の理論に束縛されることを意図しないが、一般に、ＴＡＬエフェクター分子のＴＡＬエフェクタードメインの数の減少に応じて、ミスマッチの数が減少することは、許容されるばかりか、ＴＡＬエフェクター分子を含むポリペプチドの機能を可能にすることになる。結合親和性は、一致するリピート－ＤＮＡの組合せの和に依存すると考えられる。例えば、２５又はそれ以上のＴＡＬエフェクタードメインを有するＴＡＬエフェクター分子は、最大で７つのミスマッチを許容可能であり得る。

【０２２３】

ＴＡＬエフェクタードメインに加えて、本発明のＴＡＬエフェクター分子は、天然に存在するＴＡＬエフェクターに由来する更なる配列を含み得る。ＴＡＬエフェクター分子のＴＡＬエフェクタードメイン部分の両側に含まれるＣ末端及び／又はＮ末端配列の長さは、変動し、例えば、Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）の試験に基づき、当業者によって選択され得る。Ｚｈａｎｇらは、Ｈａｘ３由来のＴＡＬエフェクターに基づくタンパク質中のいくつかのＣ末端及びＮ末端の切断変異体を特徴づけており、標的配列との最適な結合、ひいては転写の活性化に寄与する主要な要素を同定している。一般に、転写活性がＮ末端の長さと逆相関することが見出された。Ｃ末端に関しては、Ｈａｘ３配列の最初の６８アミノ酸中のＤＮＡ結合残基における重要な要素が同定された。従って、一部の実施形態では、天然に存在するＴＡＬエフェクターのＴＡＬエフェクタードメインのＣ末端側の最初の６８アミノ酸は、ＴＡＬエフェクター分子中に含まれる。従って、ある実施形態では、ＴＡＬエフェクター分子は、１）天然に存在するＴＡＬエフェクターに由来する１つ又は複数のＴＡＬエフェクタードメイン；２）ＴＡＬエフェクタードメインのＮ末端側の天然に存在するＴＡＬエフェクターからの少なくとも７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１７０、１８０、１９０、２００、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０若しくはそれ以上のアミノ酸；及び／又は３）ＴＡＬエフェクタードメインのＣ末端側の天然に存在するＴＡＬエフェクターからの少なくとも６８、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１７０、１８０、１９０、２００、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０若しくはそれ以上のアミノ酸を含む。

【０２２４】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、Ｚｎフィンガー分子であるか又はそれを含む。Ｚｎフィンガー分子は、Ｚｎフィンガータンパク質、例えば、天然に存在するＺｎフィンガータンパク質若しくは改変されたＺｎフィンガータンパク質、又はその断片を含む。多くのＺｎフィンガータンパク質は、当業者に公知であり、例えば、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから市販されている。

【０２２５】

一部の実施形態では、Ｚｎフィンガー分子は、選択される標的ＤＮＡ配列に結合するように改変される、非天然に存在するＺｎフィンガータンパク質を含む。例えば、Ｂｅｅｒｌｉ，ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０：１３５－１４１；Ｐａｂｏ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７０：３１３－３４０；Ｉｓａｌａｎ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９：６５６－６６０；Ｓｅｇａｌ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１２：６３２－６３７；Ｃｈｏｏ，ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１０：４１１－４１６；米国特許第６，４５３，２４２号明細書；米国特許第６，５３４，２６１号明細書；米国特許第６，５９９，６９２号明細書；米国特許第６，５０３，７１７号明細書；米国特許第６，６８９，５５８号明細書；米国特許第７，０３０，２１５号明細書；米国特許第６，７９４，１３６号明細書；米国特許第７，０６７，３１７号明細書；米国特許第７，２６２，０

５４号明細書；米国特許第７，０７０，９３４号明細書；米国特許第７，３６１，６３５号明細書；米国特許第７，２５３，２７３号明細書；及び米国特許出願公開第２００５／００６４４７４号明細書；米国特許出願公開第２００７／０２１８５２８号明細書；米国特許出願公開第２００５／０２６７０６１号明細書（全てはそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０２２６】

改変されたＺｎフィンガータンパク質は、天然に存在するＺｎフィンガータンパク質と比較して、新規な結合特異性を有し得る。改変方法として、限定はしないが、合理的な設計及び様々なタイプの選択が挙げられる。合理的な設計は、例えば、三つ組（又は四つ組）ヌクレオチド配列及び個別のＺｎフィンガーアミノ酸配列を含むデータベースの使用を含み、それぞれの三つ組又は四つ組ヌクレオチド配列は、特定の三つ組又は四つ組配列に結合するＺｎフィンガーの１つ又は複数のアミノ酸配列と会合する。例えば、米国特許第６，４５３，２４２号明細書及び米国特許第６，５３４，２６１号明細書（それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０２２７】

ファージディスプレイ及びツーハイブリッドシステムを含む例示的な選択方法は、米国特許第５，７８９，５３８号明細書；米国特許第５，９２５，５２３号明細書；米国特許第６，００７，９８８号明細書；米国特許第６，０１３，４５３号明細書；米国特許第６，４１０，２４８号明細書；米国特許第６，１４０，４６６号明細書；米国特許第６，２００，７５９号明細書；及び米国特許第６，２４２，５６８号明細書；並びに国際特許公開の国際公開第９８／３７１８６号パンフレット；国際公開第９８／５３０５７号パンフレット；国際公開第００／２７８７８号パンフレット；並びに国際公開第０１／８８１９７号パンフレット及び英国特許第２，３３８，２３７号明細書に開示されている。更に、Ｚｎフィンガータンパク質における結合特異性の増加については、例えば、国際特許公開の国際公開第０２／０７７２２７号パンフレットに記載されている。

【０２２８】

更に、これらや他の参考文献に開示のとおり、Ｚｎフィンガードメイン及び／又は多指型（ｍｕｌｔｉ－ｆｉｎｇｅｒｅｄ）Ｚｎフィンガータンパク質は、例えば、５又はそれ以上のアミノ酸長のリンカーを含む、任意の好適なリンカー配列を用いて、一緒に連結され得る。６又はそれ以上のアミノ酸長の例示的なリンカー配列については、米国特許第６，４７９，６２６号明細書；米国特許第６，９０３，１８５号明細書；及び米国特許第７，１５３，９４９号明細書も参照されたい。本明細書に記載のタンパク質は、タンパク質の個別のＺｎフィンガー間の好適なリンカーの任意の組合せを含み得る。更に、Ｚｎフィンガー結合ドメインにおける結合特異性の増加については、例えば、共同所有された国際特許公開の国際公開第０２／０７７２２７号パンフレットに記載されている。

【０２２９】

融合タンパク質（及びそれをコードするポリヌクレオチド）の設計及び構築のためのＺｎフィンガーのタンパク質及び方法は、当業者に公知であり、米国特許第６，１４０，０８１５号明細書；米国特許第７８９，５３８号明細書；米国特許第６，４５３，２４２号明細書；米国特許第６，５３４，２６１号明細書；米国特許第５，９２５，５２３号明細書；米国特許第６，００７，９８８号明細書；米国特許第６，０１３，４５３号明細書；及び米国特許第６，２００，７５９号明細書；国際特許公開の国際公開第９５／１９４３１号パンフレット；国際公開第９６／０６１６６号パンフレット；国際公開第９８／５３０５７号パンフレット；国際公開第９８／５４３１１号パンフレット；国際公開第００／２７８７８号パンフレット；国際公開第０１／６０９７０号パンフレット；国際公開第０１／８８１９７号パンフレット；国際公開第０２／０９９０８４号パンフレット；国際公開第９８／５３０５８号パンフレット；国際公開第９８／５３０５９号パンフレット；国際公開第９８／５３０６０号パンフレット；国際公開第０２／０１６５３６号パンフレット；及び国際公開第０３／０１６４９６号パンフレットに詳述されている。

【０２３０】

更に、これらや他の参考文献に開示のとおり、Ｚｎフィンガータンパク質及び／又は多指型Ｚｎフィンガータンパク質は、例えば、５又はそれ以上のアミノ酸長のリンカーを含む、任意の好適なリンカー配列を用いて、例えば、融合タンパク質として、一緒に連結され得る。６又はそれ以上のアミノ酸長の例示的なリンカー配列については、米国特許第６，４７９，６２６号明細書；米国特許第６，９０３，１８５号明細書；及び米国特許第７，１５３，９４９号明細書も参照されたい。本明細書に記載のＺｎフィンガー分子は、Ｚｎフィンガー分子の個別のＺｎフィンガータンパク質及び／又は多指型Ｚｎフィンガータンパク質間の好適なリンカーの任意の組合せを含み得る。

【０２３１】

特定の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメイン又はエンドヌクレアーゼドメインは、標的ＤＮＡ配列に（配列特異的様式で）結合する改変されたＺｎフィンガータンパク質を含むＺｎフィンガー分子を含む。一部の実施形態では、Ｚｎフィンガー分子は、１つのＺｎフィンガータンパク質又はその断片を含む。他の実施形態では、Ｚｎフィンガー分子は、複数のＺｎフィンガータンパク質（又はその断片）、例えば、２、３、４、５、６又はそれ以上のＺｎフィンガータンパク質（及び任意選択で多くて１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、又は２つのＺｎフィンガータンパク質）を含む。一部の実施形態では、Ｚｎフィンガー分子は、少なくとも３つのＺｎフィンガータンパク質を含む。一部の実施形態では、Ｚｎフィンガー分子は、４、５又は６つのフィンガーを含む。一部の実施形態では、Ｚｎフィンガー分子は、８、９、１０、１１又は１２のフィンガーを含む。一部の実施形態では、３つのＺｎフィンガータンパク質を含むＺｎフィンガー分子は、９又は１０ヌクレオチドを含む標的ＤＮＡ配列を認識する。一部の実施形態では、４つのＺｎフィンガータンパク質を含むＺｎフィンガー分子は、１２～１４ヌクレオチドを含む標的ＤＮＡ配列を認識する。一部の実施形態では、６つのＺｎフィンガータンパク質を含むＺｎフィンガー分子は、１８～２１ヌクレオチドを含む標的ＤＮＡ配列を認識する。

【０２３２】

一部の実施形態では、Ｚｎフィンガー分子は、両手式のＺｎフィンガータンパク質を含む。両手式のＺｎフィンガータンパク質は、２つのＺｎフィンガードメインが２つの不連続な標的ＤＮＡ配列に結合するように、Ｚｎフィンガータンパク質の２つのクラスターが介在性アミノ酸によって分離されたタンパク質である。両手型のＺｎフィンガー結合タンパク質の例として、４つのＺｎフィンガータンパク質のクラスターがそのタンパク質のアミノ末端に位置し、３つのＺｎフィンガータンパク質のクラスターがカルボキシル末端に位置する場合のＳＩＰ１が挙げられる（Ｒｅｍａｄｅ，ｅｔ　ａｌ．（１９９９）ＥＭＢＯ　Ｊｏｕｒｎａｌ　１８（１８）：５０７３－５０８４を参照されたい）。これらのタンパク質におけるＺｎフィンガーの各クラスターは、固有の標的配列に結合可能であり、２つの標的配列間の間隔は、多数のヌクレオチドを含み得る。

【０２３３】

リンカー

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、リンカー、例えば、ペプチドリンカー、例えば、表６に記載されるリンカーを含み得る。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端の方向に、Ｃａｓドメイン（例えば、表３のＣａｓドメイン）、表６のリンカー（又はそれと少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％若しくは９９％の同一性を有する配列）、及びＲＴドメイン（例えば、表２のＲＴドメイン）を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、エンドヌクレアーゼとＲＴドメインとの間のフレキシブルリンカー、例えばアミノ酸配列ＳＧＧＳＳＧＧＳＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳＳＧＧＳＳＧＧＳＳを含むリンカーを含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドのＲＴドメインは、エンドヌクレアーゼドメインに対してＣ末端に位置し得る。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドのＲＴドメインは、エンドヌクレアーゼドメインに対してＮ末端に位置し得る。

【０２３４】

【表６－１】

表6 例示的なリンカー配列

アミノ酸配列	配列番号
GGS	4101
GGSGGS	4102
GGSGGSGGS	4103
GGSGGSGGSGGS	4104
GGSGGSGGSGGSGGS	4105
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106
GGGGS	4107
GGGGSGGGGS	4108
GGGGSGGGGSGGGGS	4109
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110

【０２３５】

【表６－２】

アミノ酸配列	配列番号
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112
GGG	4113
GGGG	4114
GGGGG	4115
GGGGGG	4116
GGGGGGG	4117
GGGGGGGG	4118
GSS	4119
GSSGSS	4120
GSSGSSGSS	4121
GSSGSSGSSGSS	4122
GSSGSSGSSGSSGSS	4123
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124
EAAAK	4125
EAAAKEAAAK	4126
EAAAKEAAAKEAAAK	4127
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130
PAP	4131
PAPAP	4132
PAPAPAP	4133
PAPAPAPAP	4134
PAPAPAPAPAP	4135
PAPAPAPAPAPAP	4136
GGSGGG	4137
GGGGGS	4138
GGSGSS	4139
GSSGGS	4140
GGSEAAAK	4141
EAAAKGGS	4142
GGSPAP	4143
PAPGGS	4144
GGGGSS	4145
GSSGGG	4146
GGGEAAAK	4147
EAAAKGGG	4148

【０２３６】

【表６－３】

アミノ酸配列	配列番号
GCGPAP	4149
PAPGGG	4150
GSSEAAAK	4151
EAAAKGSS	4152
GSSPAP	4153
PAPGSS	4154
EAAAKPAP	4155
PAPEAAAK	4156
GGSGGGGSS	4157
GGSGSSGGG	4158
GGGGGSGSS	4159
GGGGSSGGS	4160
GSSGGSGGG	4161
GSSGGGGGS	4162
GGSGGGEAAAK	4163
GGSEAAAKGGG	4164
GGGGGSEAAAK	4165
GGGEAAAKGGS	4166
EAAAKGGSGGG	4167
EAAAKGGGGGS	4168
GGSGGGPAP	4169
GGSPAPGGG	4170
GGGGGSPAP	4171
GGGPAPGGS	4172
PAPGGSGGG	4173
PAPGGGGGS	4174
GGSGSSEAAAK	4175
GGSEAAAKGSS	4176
GSSGGSEAAAK	4177
GSSEAAAKGGS	4178
EAAAKGGSGSS	4179
EAAAKGSSGGS	4180
GGSGSSPAP	4181
GGSPAPGSS	4182
GSSGGSPAP	4183
GSSPAPGGS	4184
PAPGGSGSS	4185
PAPGSSGGS	4186

【０２３７】

【表６－４】

アミノ酸配列	配列番号
GGSEAAAKPAP	4187
GGSPAPEAAAK	4188
EAAAKGGSPAP	4189
EAAAKPAPGGS	4190
PAPGGSEAAAK	4191
PAPEAAAKGGS	4192
GGGGSSEAAAK	4193
GGGEAAAKGSS	4194
GSSGGGEAAAK	4195
GSSEAAAKGGG	4196
EAAAKGGGGSS	4197
EAAAKGSSGGG	4198
GGGGSSPAP	4199
GGGPAPGSS	4200
GSSGGGPAP	4201
GSSPAPGGG	4202
PAPGGGGSS	4203
PAPGSSGGG	4204
GGGEAAAKPAP	4205
GGGPAPEAAAK	4206
EAAAKGGGPAP	4207
EAAAKPAPGGG	4208
PAPGGGEAAAK	4209
PAPEAAAKGGG	4210
GSSEAAAKPAP	4211
GSSPAPEAAAK	4212
EAAAKGSSPAP	4213
EAAAKPAPGSS	4214
PAPGSSEAAAK	4215
PAPEAAAKGSS	4216
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217
GGGGSEAAAKGGGGS	4218
EAAAKGGGGSEAAAK	4219
SGSETPGTSESATPES	4220
GSAGSAAGSGEF	4221
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4222

【０２３８】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドのリンカーは、（ＳＧＧＳ）$_n$（配列番号４０２５）、（ＧＧＧＳ）$_n$（配列番号４０２６）、（ＧＧＧＧＳ）$_n$（配列番号４０２７）、（Ｇ）$_n$、（ＥＡＡＡＫ）$_n$（配列番号４０２８）、（ＧＧＳ）$_n$、又は（ＸＰ）$_n$から選択されるモチーフを含む。

【０２３９】

プールスクリーニングによる遺伝子組換えポリペプチド選択

候補遺伝子組換えポリペプチドは、候補の遺伝子編集能力を評価するためにスクリーニングされ得る。例えば、ヒトゲノムにおけるコード配列の標的化された編集のために設計

されたＲＮＡ遺伝子組換えシステムが使用され得る。特定の実施形態では、このような遺伝子組換えシステムが、プールスクリーニング手法と共に使用され得る。

【０２４０】

例えば、遺伝子組換えポリペプチド候補及び鋳型ガイドＲＮＡ（ｔｇＲＮＡ）のライブラリーが、プールスクリーニング手法によって候補の遺伝子編集能力を試験するために、哺乳動物細胞内に導入され得る。特定の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチド候補のライブラリーが、哺乳動物細胞内に導入された後、ｔｇＲＮＡが細胞内に導入される。

【０２４１】

スクリーニングにおいて使用され得る哺乳動物細胞代表的な非限定的な例としては、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、Ｕ２ＯＳ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＨｅｐＧ２細胞、Ｈｕｈ７細胞、Ｋ５６２細胞、又はｉＰＳ細胞が挙げられる。

【０２４２】

遺伝子組換えポリペプチド候補は、１）Ｃａｓ－ヌクレアーゼ、例えば野生型Ｃａｓヌクレアーゼ、例えば、野生型Ｃａｓ９ヌクレアーゼ、突然変異体Ｃａｓヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓニッカーゼ、例えば、Ｃａｓ９　Ｎ８６３Ａニッカーゼなどの Ｃａｓ９ニッカーゼ、又は表３若しくは表４から選択されるＣａｓヌクレアーゼ、２）ペプチドリンカー、例えば、様々な程度の長さ、柔軟性、疎水性、及び／又は二次構造を示し得る表Ｄ若しくは表６からの配列；及び３）逆転写酵素（ＲＴ）、例えば、表Ｄ若しくは表２からのＲＴドメインを含み得る。遺伝子組換えポリペプチド候補ライブラリーは、Ｃａｓヌクレアーゼ、ペプチドリンカー若しくはＲＴドメイン成分の１つ、２つ若しくは３つ全てに関して互いに異なる複数の異なる遺伝子組換えポリペプチド候補、又はこのような遺伝子組換えポリペプチド候補をコードする複数の核酸発現ベクターを含む。

【０２４３】

遺伝子組換えポリペプチド候補のスクリーニングについて、遺伝子組換えポリペプチド成分及びｔｇＲＮＡ成分を含む２成分システムが使用され得る。遺伝子組換え成分は、例えば、発現ベクター、例えば遺伝子組換えポリペプチド候補をコードする発現プラスミド又はレンチウイルスベクターを含み得、例えば遺伝子組換えポリペプチド候補をコードするヒトコドン最適化核酸、例えば上記のＣａｓ－リンカー－ＲＴ融合を含む。特定の実施形態では、（ｉ）哺乳動物細胞内の発現のためのプロモータ、例えばＣＭＶプロモータ；（ｉｉ）遺伝子組換えライブラリー候補、例えば表３又は表４のＣａｓヌクレアーゼ、表６のペプチドリンカー及び表２のＲＴを含むＣａｓ－リンカー－ＲＴ融合、例えば表Ｄにあるようなリンカー－ＲＴ融合；（ｉｉｉ）自己切断ポリペプチド、例えばＴ２Ａペプチド；（ｉｖ）哺乳動物細胞内の選択を可能にするマーカ、例えばピューロマイシン耐性遺伝子；及び（ｖ）終結シグナル、例えばポリＡテールを含むレンチウイルスカセットが用いられる。

【０２４４】

ｔｇＲＮＡ成分は、ｔｇＲＮＡ又は発現ベクター、例えば、ｔｇＲＮＡを生成し、例えば、Ｕ６プロモータを用いて、ｔｇＲＮＡの発現を駆動する発現プラスミドを含み得、ここで、ｔｇＲＮＡは、Ｃａｓによって認識され、それを目的のゲノム遺伝子座に局在化し、またＲＴドメインによって所望の編集の逆転写をゲノムに鋳型化するノンコーディングＲＮＡ配列である。

【０２４５】

遺伝子組換えポリペプチドライブラリー候補を発現する細胞のプールを調製するために、哺乳動物細胞、例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞に、プールされた遺伝子組換えポリペプチド候補発現ベクター調製物、例えば、遺伝子組換え候補ポリペプチドライブラリーのレンチウイルス調製物が形質導入され得る。特定の実施形態では、レンチウイルスプラスミドが用いられ、ＨＥＫ２９３　Ｌｅｎｔｉ－Ｘ細胞が、レンチウイルスプラスミドトランスフェクションの前に、１５ｃｍプレートに播種される（約12×10^{6}個の細胞）。こうした実施形態では、レンチウイルスプラスミドトランスフェクションが、Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ　Ｐａｃｋａｇｉｎｇ　Ｍｉｘ（Ｂｉｏｓｅｔｔｉａ）を用いて行わ

れ得、遺伝子組換え候補ライブラリーのためのプラスミドＤＮＡのトランスフェクションが、製造業者のプロトコルに従って、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００及びＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地を用いて行われる。こうした実施形態では、細胞外ＤＮＡが、翌日、完全な培地交換によって除去され得、ウイルス含有培地が、４８時間後に収集され得る。レンチウイルス培地は、Ｌｅｎｔｉ－Ｘ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ（ＴａＫａＲａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて濃縮され得、５ｍＬのレンチウイルスアリコートが作製され、－８０℃で貯蔵され得る。レンチウイルス力価測定が、選択後、例えば、ピューロマイシン選択後にコロニー形成単位を計数することによって行われる。

【０２４６】

標的ＤＮＡの遺伝子編集をモニターするために、哺乳動物細胞、例えば、標的ＤＮＡを担持するＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞が用いられ得る。標的ＤＮＡの遺伝子編集のモニターについての他の実施形態では、哺乳動物細胞、例えば、標的ＤＮＡゲノムランディングパッドを担持するＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞が用いられ得る。特定の実施形態では、標的ＤＮＡゲノムランディングパッドは、対象とする疾患又は障害の処置のために編集される遺伝子を含み得る。他の特定の実施形態では、標的ＤＮＡは、遺伝子編集が起こったかどうかを決定するためにモニターされ得る検出可能な特性を示すタンパク質を発現する遺伝子配列である。例えば、特定の実施形態では、青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）発現又は緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）発現ゲノムランディングパッドが用いられる。特定の実施形態では、哺乳動物細胞、例えば、標的ＤＮＡ、例えば、標的ＤＮＡゲノムランディングパッドを含むＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞が、遺伝子組換えライブラリー候補当たり５００×～３０００×細胞で培養プレートに播種され、細胞当たりの多重感染を最小限に抑えるために０．２～０．３感染多重度（ＭＯＩ）で形質導入される。ピューロマイシン（２．５ｕｇ／ｍＬ）が、感染細胞の選択を可能にするために、感染の４８時間後に加えられ得る。こうした実施形態では、細胞は、少なくとも７日間にわたってピューロマイシン選択下に置かれ、次に、ｔｇＲＮＡ導入、例えば、ｔｇＲＮＡエレクトロポレーションのためにスケールアップされ得る。

【０２４７】

遺伝子編集が起こるかどうかを確認するために、編集される標的ＤＮＡを含有する哺乳動物細胞に、遺伝子組換えポリペプチドライブラリー候補を感染させ、次に、標的ＤＮＡの編集への使用のために設計されたｔｇＲＮＡでトランスフェクトさせ得る。その後、細胞は、例えば、細胞ソーティング及び配列分析を使用することにより、標的遺伝子座の編集が、設計された結果に準じて起こったかどうか、又は編集が起こらなかった若しくは不完全な編集が起こったかどうかを決定するために分析され得る。

【０２４８】

特定の実施形態では、ゲノム編集が起こるかどうかを確認するために、ＢＦＰ－又はＧＦＰ発現哺乳動物細胞、例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞に、遺伝子組換えライブラリー候補を感染させ、次に、ｔｇＲＮＡプラスミド又はＲＮＡ、例えば、ライブラリー候補につき＞２５０×～１０００×のカバレージを確実にする細胞数で、ＢＦＰからＧＦＰ又はＧＦＰからＢＦＰに変換するように設計された２００ｎｇのｔｇＲＮＡプラスミドによる２５０，０００個の細胞／ウェルのエレクトロポレーションによってトランスフェクト又はエレクトロポレートさせ得る。こうした実施形態では、このアッセイにおける様々な構築物のゲノム編集能力が、エレクトロポレーションの４～１０日後に、色変換型蛍光タンパク質（ＦＰ）の発現のために蛍光活性化細胞ソーティング（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ－Ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｏｒｔｉｎｇ）（ＦＡＣＳ）によって細胞をソートすることによって評価され得る。細胞がソートされ、非編集細胞（元の蛍光タンパク質シグナルを示す）、編集細胞（変換された蛍光タンパク質シグナルを示す）、及び不完全な編集（蛍光タンパク質シグナルを示さない）細胞の異なる集団として収集される。非ソート細胞のサンプルも、分析中の候補富化を決定するために入力集団として収集され得る。

【０２４９】

遺伝子組換えライブラリー候補が、アッセイにおいてゲノム編集能力を示すかどうかを決定するために、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）が、ソートされた細胞集団から収集され、各集団における遺伝子組換えライブラリー候補をシーケンシングすることによって分析される。簡潔に述べると、遺伝子組換え候補が、遺伝子組換えポリペプチド発現ベクター、例えば、レンチウイルスカセットに特異的なプライマーを用いてゲノムから増幅され、ゲノムＤＮＡを希釈するために第２回のＰＣＲにおいて増幅され、次に、シーケンシングされ、例えば、次世代シーケンシングプラットフォームによってシーケンシングされ得る。シーケンシングリードの品質管理の後、少なくとも約１５００ヌクレオチド及び一般に約３２００ヌクレオチド以下のリードが、遺伝子組換えポリペプチドライブラリー配列にマップされ、ライブラリー配列との最小で約８０％の一致を含むものが、このプールされたスクリーンのための所与の候補と問題なく整列されたと見なされる。アッセイにおいて遺伝子編集、例えば、ＢＦＰからＧＦＰ又はＧＦＰからＢＦＰの編集を行うことが可能な候補を同定するために、編集された集団における各ライブラリー候補のリードカウントが、最初の非ソート集団におけるそのリードカウントと比較される。

【０２５０】

プールスクリーニングのために、ゲノム編集能力を有する遺伝子組換え候補が、非ソート（入力）細胞と比べた編集された（変換されたＦＰ）集団の富化に基づいて同定される。一部の実施形態では、入力の少なくとも１．０、１．５、２．０、２．５、３．０、４．０、５．０、６．０、７．０、８．０、９．０、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、又は少なくとも１００倍の富化は、潜在的に有用な遺伝子編集活性、例えば、少なくとも２倍の富化を示す。一部の実施形態では、富化は、富化比のｌｏｇ底２を取ることによってｌｏｇ値に換算される。一部の実施形態では、少なくとも０、１、２、３、４、５、５．５、６．０、６．２、６．３、６．４、６．５、又は少なくとも６．６のｌｏｇ２富化スコアは、潜在的に有用な遺伝子編集活性、例えば、少なくとも１．０のｌｏｇ２富化スコアを示す。特定の実施形態では、遺伝子組換え候補について観察される富化値は、参照、例えば、エレメントＩＤ番号：１７３８０を用いて同様の条件下で観察される富化値と比較され得る。

【０２５１】

一部の実施形態では、複数のｔｇＲＮＡが、遺伝子組換え候補ライブラリーをスクリーニングするのに使用され得る。特定の実施形態では、複数のｔｇＲＮＡが、例えば、特定の標的遺伝子、例えば、疾患の処置のための遺伝子標的の遺伝子編集のために、鋳型／Ｃａｓ－リンカー－ＲＴ融合対を最適化するのに用いられ得る。特定の実施形態では、遺伝子組換え候補をスクリーニングするためのプール手法が、配列された形式で多くの異なるｔｇＲＮＡを用いて行われ得る。

【０２５２】

一部の実施形態では、複数のタイプの編集、例えば、異なる長さの挿入、置換、及び／又は欠失が、遺伝子組換え候補ライブラリーをスクリーニングするのに使用され得る。

【０２５３】

一部の実施形態では、複数の標的配列、例えば、異なる蛍光タンパク質が、遺伝子組換え候補ライブラリーをスクリーニングするのに使用され得る。一部の実施形態では、複数の標的配列、例えば、異なる蛍光タンパク質が、遺伝子組換え候補ライブラリーをスクリーニングするのに使用され得る。一部の実施形態では、複数の細胞型、例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳが、遺伝子組換え候補ライブラリーをスクリーニングするのに使用され得る。当業者は、所与の候補が、ｔｇＲＮＡ配列（例えば、ヌクレオチド修飾、ＰＢＳ長さ、ＲＴ鋳型長さ）、標的配列、標的位置、編集のタイプ、遺伝子組換えポリペプチドの第１の鎖ニックに対する突然変異の位置又は細胞型を含む異なる条件にわたり、改変された編集能力又は観察可能な若しくは有用な活性の増加又は低下を示し得ることを理解するであろう。従って、一部の実施形態では、遺伝子組換えライブラリー候補が、例えば、少なくとも２つの細胞型における少なくとも２つの異なるｔｇＲＮＡを用いて、複数のパラメータにわたってスクリーニングされ、遺伝子編集活性が、いずれかの単一の条件にお

ける富化によって同定される。他の実施形態では、異なるｔｇＲＮＡ及び細胞型にわたってよりロバストな活性を有する候補が、少なくとも２つの条件、例えば、スクリーニングされる全ての条件における富化によって同定される。明確にするために、任意の所与の条件下でほとんどないし全く富化を示さないことが分かった候補は、全ての条件にわたって不活性であると推定されず、異なるパラメータを用いてスクリーニングされるか、又は例えばドメイン（例えば、ＲＴドメイン）、リンカー若しくは他のシグナル（例えば、ＮＬＳ）を交換するか、入れ替えるか又は変化させることにより、ポリペプチドレベルで再構成され得る。

【０２５４】

例示的なＣａｓ９－リンカー－ＲＴ融合の配列

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、リンカー配列及びＲＴ配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、表Ｄに列挙されるリンカー配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、表Ｄに列挙されるＲＴドメインのアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、表Ｄに列挙されるリンカー配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列；及び表Ｄに列挙されるＲＴドメインのアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、（ｉ）表Ｄの行に列挙されるリンカー配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列；及び（ｉｉ）表Ｄの同じ行に列挙されるＲＴドメインのアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０２５５】

遺伝子組換えシステムのための局在化配列

特定の実施形態では、遺伝子エディターシステムＲＮＡは、細胞内局在化配列、例えば、核局在化配列（ＮＬＳ）を更に含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、配列番号４０００及び／若しくは配列番号４００１に含まれるＮＬＳ、又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を有するＮＬＳを含む。

【０２５６】

核局在化配列は、ＲＮＡの核への入力を促進するＲＮＡ配列であり得る。特定の実施形態では、核局在化シグナルは、鋳型ＲＮＡ上に位置する。特定の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、第１のＲＮＡ上にコードされ、鋳型ＲＮＡは、第２の別のＲＮＡであり、核局在化シグナルは、鋳型ＲＮＡ上に位置し、遺伝子組換えポリペプチドをコードするＲＮＡ上に位置しない。特定の理論に束縛されることを意図しないが、一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするＲＮＡは、その翻訳を促進するため、主に細胞質に標的化される一方、鋳型ＲＮＡは、ゲノム中に挿入を促進するため、主に核に標的化される。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、鋳型ＲＮＡの３’末端、５’末端、又は内部領域内に存在する。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、異種配列の３’である（例えば、直接的に異種配列の３’である）、又は異種配列の５’である（例えば、直接的に異種配列の５’である）。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、鋳型ＲＮＡの５’ＵＴＲの外側又は３’ＵＴＲの外側に配置される。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、５’ＵＴＲと３’ＵＴＲとの間に配置され、任意選択で、核局在化シグナルは、導入遺伝子によって転写されない（例えば、核局在化シグナルは、アンチセンス方向性であるか、又は転写終結シグナル若しくはポリアデニル化シグナルの下流である）。

一部の実施形態では、核局在化配列は、イントロンの内部に位置する。一部の実施形態では、複数の同じ又は異なる核局在化シグナルは、ＲＮＡ中、例えば、鋳型ＲＮＡ中に存在する。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、５ｂｐ、１０ｂｐ、２５ｂｐ、５０ｂｐ、７５ｂｐ、１００ｂｐ、１５０ｂｐ、２００ｂｐ、２５０ｂｐ、３００ｂｐ、３５０ｂｐ、４００ｂｐ、４５０ｂｐ、５００ｂｐ、６００ｂｐ、７００ｂｐ、８００ｂｐ、９００ｂｐ又は１０００ｂｐ未満の長さである。様々なＲＮＡ核局在化配列が使用可能である。例えば、Ｌｕｂｅｌｓｋｙ ａｎｄ Ｕｌｉｔｓｋｙ，Ｎａｔｕｒｅ ５５５（１０７－１１１），２０１８は、ＲＮＡの核内への局在化を駆動するＲＮＡ配列について記載している。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、ＳＩＮＥ由来の核ＲＮＡ局在化（ＳＩＲＬＯＩＮ）シグナルである。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、核濃縮タンパク質に結合する。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、ＨＮＲＮＰＫタンパク質に結合する。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、ピリミジン中に豊富に存在し、例えば、Ｃ／Ｔリッチ、Ｃ／Ｕリッチ、Ｃリッチ、Ｔリッチ、又はＵリッチ領域である。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、長鎖非翻訳ＲＮＡに由来する。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、ＭＡＬＡＴ１長鎖非翻訳ＲＮＡに由来する、又はＭＡＬＡＴ１の６００ヌクレオチドのＭ領域である（Ｍｉｙａｇａｗａ ｅｔ ａｌ．，ＲＮＡ １８，（７３８－７５１），２０１２に記載されている）。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、ＢＯＲＧ長鎖非翻訳ＲＮＡに由来する、又はＡＧＣＣＣモチーフである（Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ３４，２３１８－２３２９（２０１４）に記載されている。一部の実施形態では、核局在化配列は、Ｓｈｕｋｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ ＥＭＢＯ Ｊｏｕｒｎａｌ ｅ９８４５２（２０１８）に記載されている。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、レトロウイルスに由来する。

【０２５７】

一部の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、１つ又は複数の（例えば、２、３、４、５）の核ターゲティング配列、例えば、核局在化配列（ＮＬＳ）を含む。一部の実施形態では、ＮＬＳは、双節型（ｂｉｐａｒｔｉｔｅ）ＮＬＳである。一部の実施形態では、ＮＬＳは、ＮＬＳを含むタンパク質の細胞核への入力を促進する。一部の実施形態では、ＮＬＳは、本明細書に記載の遺伝子組換えポリペプチドのＮ末端と融合される。一部の実施形態では、ＮＬＳは、遺伝子組換えポリペプチドのＣ末端と融合される。一部の実施形態では、ＮＬＳは、ＣａｓドメインのＮ末端又はＣ末端と融合される。一部の実施形態では、リンカー配列は、ＮＬＳと、遺伝子組換えポリペプチドの隣接ドメインとの間に配置される。

【０２５８】

一部の実施形態では、ＮＬＳは、アミノ酸配列ＭＤＳＬＬＭＮＲＲＫＦＬＹＱＦＫＮＶＲＷＡＫＧＲＲＥＴＹＬＣ（配列番号４００９）、ＰＫＫＲＫＶＥＧＡＤＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号４０１０）、ＲＫＳＧＫＩＡＡＩＷＫＲＰＲＫＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号４０１１）、ＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号４０１２）、ＫＫＴＥＬＱＴＴＮＡＥＮＫＴＫＫＬ（配列番号４０１３）、又はＫＲＧＩＮＤＲＮＦＷＲＧＥＮＧＲＫＴＲ（配列番号４０１４）、ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号４０１５）、又はその機能性断片若しくは変異体を含む。例示的なＮＬＳ配列は、ＰＣＴ／欧州特許第２０００／０１１６９０号明細書にも記載されており、その内容は、その例示的な核局在化配列の開示について、参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、ＮＬＳは、表７に開示のようなアミノ酸配列を含む。この表のＮＬＳは、核への細胞内局在化を改善するため、ポリペプチド中の１つ又は複数の位置におけるポリペプチド中の１つ又は複数のコピー、例えば、Ｎ末端ドメイン内、ペプチドドメイン間、Ｃ末端ドメイン内、又は位置の組合せにおける、ＮＬＳの１、２、３若しくはそれ以上コピーで利用され得る。複数の固有配列は、単一のポリペプチド中で使用され得る。配列は、例えば、塩基性アミノ酸の１つ若しくは２つのストレッチを有する、天然に単節型（ｍｏｎｏｐａｒｔｉｔｅ）又は双節型であり得るか、又はキメラ双節型配列として使用

され得る。配列の参照は、細胞内局在化予測アルゴリズムを用いて取り出された配列について、ＳｅｑＮＬＳとして示される場合を除いて、ＵｎｉＰｒｏｔ受入番号に対応する（Ｌｉｎ ｅｔ ａｌ ＢＭＣ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔ １３：１５７（２０１２）、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０２５９】

【表７－１】

表7 遺伝子組換えシステムにおける使用のための例示的な核局在化シグナル

配列	配列参照	配列番号
AHFKISGEKRPSTDPGKKAKNPKKKKKKDP	Q76IQ7	4223
AHRAKKMSKTHA	P21827	4224
ASPEYVNLPINGNG	SeqNLS	4225
CTKRPRW	O88622, Q86W56, Q9QYM2, O02776	4226
DKAKRVSRNKSEKKRR	O15516, Q5RAK8, Q91YB2, Q91YB0, Q8QGQ6, O08785, Q9WVS9, Q6YGZ4	4227
EELRLKEELLKGIYA	Q9QY16, Q9UHL0, Q2TBP1, Q9QY15	4228
EEQLRRRKNSRLNNTG	G5EFF5	4229
EVLKVIRTGKRKKKAWKRMVTKVC	SeqNLS	4230
HHHHHHHHHHHHQPH	Q63934, G3V7L5, Q12837	4231
HKKKHPDASVNFSEFSK	P10103, Q4R844, P12682, B0CM99, A9RA84, Q6YKA4, P09429, P63159, Q08IE6, P63158, Q9YH06, B1MTB0	4232
HKRTKK	Q2R2D5	4233
IINGRKLKLKKSRRRSSQTSNNSFTSRRS	SeqNLS	4234
KAEQERRK	Q8LH59	4235
KEKRKRREELFIEQKKRK	SeqNLS	4236
KKGKDEWFSRGKKP	P30999	4237
KKGPSVQKRKKT	Q6ZN17	4238
KKKTVINDLLHYKKEK	SeqNLS, P32354	4239
KKNGGKGKNKPSAKIKK	SeqNLS	4240
KKPKWDDFKKKKK	Q15397, Q8BKS9, Q562C7	4241
KKRKKD	SeqNLS, Q91Z52, Q1A730, Q969P5, Q2KHT6, Q9CPU7	4242
KKRRKRRRK	SeqNLS	4243
KKRRRRARK	Q9UMS6, D4A702, Q91YE8	4244
KKSKRGR	Q9UBS0	4245
KKSRKRGS	B4FG96	4246
KKSTALSRELGKIMRRR	SeqNLS, P32354	4247
KKSYQDPEIIAHSRPRK	Q9U7C9	4248

【０２６０】

【表７－２】

配列	配列参照	配列番号
KKTGKNRKLKSKRVKTR	Q9Z301, O54943, Q8K3T2	4249
KKVSIAGQSGKLWRWKR	Q6YUL8	4250
KKYENVVIKRSPRKRGRPRK	SeqNLS	4251
KNKKRK	SeqNLS	4252
KPKKKR	SeqNLS	4253
KRAMKDDSHGNSTSPKRRK	Q0E671	4254
KRANSNLVAAYEKAKKK	P23508	4255
KRASEDTTSGSPPKKSSAGPKR	Q9BZZ5, Q5R644	4256
KRFKRRWMVRKMKTKK	SeqNLS	4257
KRGLNSSFETSPKKVK	Q8IV63	4258
KRGNSSIGPNDLSKRKQRKK	SeqNLS	4259
KRIHSVSLSQSQIDPSKKVKRAK	SeqNLS	4260
KRKGKLKNKGSKRKK	O15381	4261
KRRRRRRREKRKR	Q96GM8	4262
KRSNDRTYSPEEEKQRRA	Q91ZF2	4263
KRTVATNGDASGAHRAKKMSK	SeqNLS	4264
KRVYNKGEDEQEHLPKGKKR	SeqNLS	4265
KSGKAPRRRAVSMDNSNK	Q9WVH4, O43524	4266
KVNFLDMSLDDIIIYKELE	Q9P127	4267
KVQHRIAKKTTRRRR	Q9DXE6	4268
LSPSLSPL	Q9Y261, P32182, P35583	4269
MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLC	Q9GZX7	4270
MPQNEYIELHRKRYGYRLDYHEKKRKKESRE AHERSKKAKKMIGLKAKLYHK	SeqNLS	4271
MVQLRPRASR	SeqNLS	4272
NNKLLAKRRKGGASPKDDPMDDIK	Q965G5	4273
NYKRPMDGTYGPPAKRHEGE	O14497, A2BH40	4274
PDTKRAKLDSSETTMVKKK	SeqNLS	4275
PEKRTKI	SeqNLS	4276
PGGRGKKK	Q719N1, Q9UBP0, A2VDN5	4277
PGKMDKGEHRQERRDRPY	Q01844, Q61545	4278
PKKGDKYDKTD	Q45FA5	4279
PKKKSRK	O35914, Q01954	4280
PKKNKPE	Q22663	4281
PKKRAKV	P04295, P89438	4282
PKPKKLKVE	P55263, P55262, P55264, Q64640	4283
PKRGRGR	Q9FYS5, Q43386	4284
PKRRLVDDA	P0C797	4285
PKRRRTY	SeqNLS	4286

【０２６１】

【表７－３】

配列	配列参照	配列番号
PLFKRR	A8X6H4, Q9TXJ0	4287
PLRKAKR	Q86WB0, Q5R8V9	4288
PPAKRKCIF	Q6AZ28, O75928, Q8C5D8	4289
PPARRRRL	Q8NAG6	4290
PPKKKRKV	Q3L6L5, P03070, P14999, P03071	4291
PPNKRMKVKH	Q8BN78	4292
PPRIYPQLPSAPT	P0C799	4293
PQRSPFPKSSVKR	SeqNLS	4294
PRPRKVPR	P0C799	4295
PRRRVQRKR	SeqNLS, Q5R448, Q5TAQ9	4296
PRRVRLK	Q58DJ0, P56477, Q13568	4297
PSRKRPR	Q62315, Q5F363, Q92833	4298
PSSKKRKV	SeqNLS	4299
PTKKRVK	P07664	4300
QRPGPYDRP	SeqNLS	4301
RGKGGKGLGKGGAKRHRK	SeqNLS	4302
RKAGKGGGGHKTTKKRSAKDEKVP	B4FG96	4303
RKIKLKRAK	A1L3G9	4304
RKIKRKRAK	B9X187	4305
RKKEAPGPREELRSRGR	O35126, P54258, Q5IS70, P54259	4306
RKKRKGK	SeqNLS, Q29243, Q62165, Q28685, O18738, Q9TSZ6, Q14118	4307
RKKRRQRRR	P04326, P69697, P69698, P05907, P20879, P04613, P19553, P0C1J9, P20893, P12506, P04612, Q73370, P0C1K0, P05906, P35965, P04609, P04610, P04614, P04608, P05905	4308
RKKSIPLSIKNLKRKHKRKKNKITR	Q9C0C9	4309
RKLVKPKNTKMKTKLRTNPY	Q14190	4310
RKRLILSDKGQLDWKK	SeqNLS, Q91Z62, Q1A730, Q2KHT6, Q9CPU7	4311
RKRLKSK	Q13309	4312
RKRRVRDNM	Q8QPH4, Q809M7, A8C8X1, Q2VNC5, Q38SQ0, O89749, Q6DNQ9, Q809L9, Q0A429, Q20NV3, P16509, P16505, Q6DNQ5, P16506, Q6XT06, P26118, Q2ICQ2, Q2RCG8, Q0A2D0, Q0A2H9, Q9IQ46, Q809M3, Q6J847, Q6J856, B4URE4, A4GCM7, Q0A440, P26120, P16511,	4313
RKRSPKDKKEKDLDGAGKRRKT	Q7RTP6	4314
RKRTPRVDGQTGENDMNKRRRK	O94851	4315
RLPVRRRRRR	P04499, P12541, P03269, P48313, P03270	4316
RLRFRKPKSK	P69469	4317
RQQRKR	Q14980	4318
RRDLNSSFETSPKKVK	Q8K3G5	4319
RRDRAKLR	Q9SLB8	4320
RRGDGRRR	Q80WE1, Q5R9B4, Q06787, P35922	4321

【０２６２】

【表７－４】

配列	配列参照	配列番号
RRGRKRKAEKQ	Q812D1, Q5XXA9, Q99JF8, Q8MJG1, Q66T72, O75475	4322
RRKKRR	Q0VD86, Q58DS6, Q5R6G2, Q9ERI5, Q6AYK2, Q6NYC1	4323
RRKRSKSEDMDSVESKRRR	Q7TT18	4324
RRKRSR	Q99PU7, D3ZHS6, Q92560, A2VDM8	4325
RRPKGKTLQKRKPK	Q6ZN17	4326
RRRGFERFGPDNMGRKRK	Q63014, Q9DBR0	4327
RRRGKNKVAAQNCRK	SeqNLS	4328
RRRKRR	Q5FVH8, Q6MZT1, Q08DH5, Q8BQP9	4329
RRRQKQKGGASRRR	SeqNLS	4330
RRRREGPRARRRR	P08313, P10231	4331
RRTIRLKLVYDKCDRSCKIQKKNRNKCQYCR FHKCLSVGMSHNAIRFGRMPRSEKAKLKAE	SeqNLS	4332
RRVPQRKEVSRCRKCRK	Q5RJN4, Q32L09, Q8CAK3, Q9NUL5	4333
RVGGRRQAVECIEDLLNEPGQPLDLSCKRPR P	P03255	4334
RVVKLRIAP	P52639, Q8JMN0	4335
RVVRRR	P70278	4336
SKRKTKISRKTR	Q5RAY1, O00443	4337
SYVKTVPNRTRTYIKL	P21935	4338
TGKNEAKKRKIA	P52739, Q8K3J5, Q5RAU9	4339
TLSPASSPSSVSCPVIPASTDESPGSALNI	SeqNLS	4340
VSKKQRTGKKIH	P52739, Q8K3J5, Q5RAU9	4341
SPKKKRKVE		4342
KRTAD GSEFE SPKKKRKVE		4343
PAAKRVKLD		4344
PKKKRKV		4345
MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLC		4346
SPKKKRKVEAS		4347
MAPKKKRKVGIHRGVP		4348

【０２６３】

一部の実施形態では、ＮＬＳは、双節型ＮＬＳである。双節型ＮＬＳは、典型的に、スペーサー配列によって隔てられる２つの塩基性アミノ酸クラスター（例えば、約１０アミノ酸長であり得る）を含む。単節型ＮＬＳは、典型的に、スペーサーを欠いている。双節型ＮＬＳの例は、配列ＫＲ［ＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡ］ＫＫＫＫ（配列番号４０１５）（括弧内はスペーサー）を有するヌクレオプラスミンＮＬＳである。別の例示的な双節型ＮＬＳは、配列ＰＫＫＫＲＫＶＥＧＡＤＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号４０１６）を有する。例示的なＮＬＳは、国際公開第２０２００５１５６１号パンフレット（核局在化配列に関する開示を含め、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０２６４】

特定の実施形態では、遺伝子エディターシステムポリペプチド（例えば、本明細書に記載の遺伝子組換えポリペプチド）は、細胞内局在化配列、例えば、核局在化配列及び／又は核小体局在化配列を更に含む。核局在化配列及び／又は核小体局在化配列は、そのタンパク質の核及び／又は核小体への入力を促進するアミノ酸配列であり得、ここで、それは、異種配列のゲノムへの組み込みを促進し得る。特定の実施形態では、遺伝子エディター

システムポリペプチド（例えば、例として本明細書に記載の遺伝子組換えポリペプチド）は、核小体局在化配列を更に含む。特定の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、第１のＲＮＡ上にコードされ、鋳型ＲＮＡは、第２の分かれたＲＮＡであり、核小体局在化シグナルは、遺伝子組換えポリペプチドをコードするＲＮＡ上にコードされ、鋳型ＲＮＡ上にコードされない。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、ポリペプチドのＮ末端、Ｃ末端、又は内部領域内に位置する。一部の実施形態では、複数の同じ又は異なる核小体局在化シグナルが使用される。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、５、１０、２５、５０、７５又は１００アミノ酸長未満である。様々なポリペプチドの核小体局在化シグナルが使用可能である。例えば、Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２，３３（２０１５）は、核小体局在化シグナルとしても機能する核局在化シグナルについての記載がある。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、核局在化シグナルでもあり得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、核局在化シグナルと重複し得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、塩基性残基のストレッチを含み得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、アルギニン及びリジン残基中に豊富であり得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、核小体中に豊富に存在するタンパク質に由来し得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、リボソームＲＮＡ遺伝子座に豊富に存在するタンパク質に由来し得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、ｒＲＮＡに結合するタンパク質に由来し得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、ＭＳＰ５８に由来し得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、単節型モチーフであり得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、双節型モチーフであり得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、複数の単節型又は双節型モチーフからなり得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、単節型及び双節型モチーフの混合物からなり得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、二重の双節型モチーフであり得る。一部の実施形態では、核小体局在化モチーフは、ＫＲＡＳＳＱＡＬＧＴＩＰＫＲＲＳＳＲＦＩＫＲＫＫ（配列番号４０１７）であり得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、核内因子κＢ誘導キナーゼに由来し得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、ＲＫＫＲＫＫＫモチーフ（配列番号４０１８）であり得る（Ｂｉｒｂａｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，１１７（３６１５－３６２４），２００４に記載されている）。

【０２６５】

遺伝子組換えポリペプチド及びシステムの進化型変異体

一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドの進化型変異体を提供する。進化型変異体は、一部の実施形態では、参照遺伝子組換えポリペプチド、又はそこに含まれる断片若しくはドメインの１つを突然変異誘発させることにより生産することができる。一部の実施形態では、ドメイン（例えば、逆転写酵素ドメイン）の１つ又は複数が進化する。こうした進化型変異体ドメインの１つ又は複数は、一部の実施形態では、単独で、又は他のドメインと一緒に進化し得る。１つ又は複数の進化型変異体ドメインは、一部の実施形態では、非進化型コグネイト成分又はコグネイト成分の進化型変異体（例えば、平行若しくは連続様式で進化した可能性のあるもの）と組み合わされ得る。

【０２６６】

一部の実施形態では、参照遺伝子組換えポリペプチド、又はその断片若しくはドメインを突然変異誘発させるプロセスは、参照遺伝子組換えポリペプチド又はその断片若しくはドメインを突然変異誘発させることを含む。複数の実施形態では、突然変異誘発は、例えば、本明細書に記載されるように、漸進的進化方法（例えば、ＰＡＣＥ）又は非漸進的進化方法（例えば、ＰＡＮＣＥ）を含む。一部の実施形態では、進化型遺伝子組換えポリペプチド、又はその断片若しくはドメインは、参照遺伝子組換えポリペプチドのアミノ酸配列又はその断片若しくはドメインと比較して、そのアミノ酸配列に導入された１つ若しくは複数のアミノ酸変異を含む。複数の実施形態では、アミノ酸配列変異は、例として、例

えば、コード配列内のいずれか特定の位置のコドンの変化を招く遺伝子組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の変化、１つ若しくは複数のアミノ酸の欠失（例えば、短縮タンパク質）、１つ若しくは複数のアミノ酸の挿入、又はそれらの任意の組合せの結果として、参照遺伝子組換えポリペプチドのアミノ酸配列内に１つ若しくは複数の変異残基（例えば、保存的置換、非保存的置換、又はそれらの組合せ）を含み得る。進化型変異体遺伝子組換えポリペプチドは、遺伝子組換えポリペプチドの１つ又は複数の成分又はドメインにおける変異体（例えば、逆転写酵素ドメインに導入された変異体）を含み得る。

【０２６７】

いくつかの態様では、本開示は、遺伝子組換えポリペプチドの進化型変異体を用いる、又はそれを含む遺伝子組換えポリペプチド、システム、キット、及び方法を提供し、例えば、遺伝子組換えポリペプチドの進化型変異体、又はＰＡＣＥ若しくはＰＡＮＣＥにより生産若しくは生産可能な遺伝子組換えポリペプチドを使用する。複数の実施形態では、非進化型参照遺伝子組換えポリペプチドは、本明細書に開示される遺伝子組換えポリペプチドである。

【０２６８】

「ファージ支援連続進化（ＰＡＣＥ）」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、ウイルスベクターとしてファージを使用する漸進的進化を指す。ＰＡＣＥ技術の例は、例えば、２００９年９月８日に出願され、２０１０年３月１１日に国際公開第２０１０／０２８３４７号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＵＳ２００９／０５６１９４号明細書；２０１１年１２月２２日に出願され、２０１２年６月２８日に国際公開第２０１２／０８８３８１号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０６６７４７号明細書；２０１５年５月５日に発行された米国特許第９，０２３，５９４号明細書；２０１７年９月２６日に発行された米国特許第９，７７１，５７４号明細書；２０１６年７月１９日に発行された米国特許第９，３９４，５３７号明細書；２０１５年１月２０日に出願され、２０１５年９月１１日に国際公開第２０１５／１３４１２１号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０１２０２２号明細書；２０１９年１月１５日に発行された米国特許第１０，１７９，９１１号明細書；及び２０１６年４月１５日に出願され、２０１６年１０月２０日に国際公開第２０１６／１６８６３１号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０２７７９５号明細書に記載されており、これらは各々、その全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【０２６９】

「ファージ支援型非漸進的進化（ＰＡＮＣＥ）」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、ウイルスベクターとしてファージを使用する非漸進的進化を指す。ＰＡＮＣＥ技術の例は、例えば、Ｓｕｚｕｋｉ Ｔ．ｅｔ ａｌ，Ｃｒｙｓｔａｌ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ｒｅｖｅａｌ ａｎ ｅｌｕｓｉｖｅ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｄｏｍａｉｎ ｏｆ ｐｙｒｒｏｌｙｓｙｌ－ｔＲＮＡ ｓｙｎｔｈｅｔａｓｅ，Ｎａｔ Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ．１３（１２）：１２６１－１２６６（２０１７）に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。簡潔に述べると、ＰＡＮＣＥは、新鮮な宿主細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞）全体に、進化させようとする目的の遺伝子を含有する、進化選択ファージ（ＳＰ）の連続フラスコ移入を用いる迅速なインビボ指向性進化のための技術である。ＳＰに含まれる遺伝子が漸進的に進化する間、宿主細胞内部の遺伝子を一定に保持することができる。ファージ増殖の後、感染した細胞のアリコートを用いて、宿主大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）を含有する次のフラスコをトランスフェクトすることができる。このプロセスは、所望の表現型が、例えば、所望されるだけの数の移入について進化するまで、反復及び／又は継続することができる。

【０２７０】

ＰＡＣＥ及びＰＡＮＣＥを遺伝子組換えポリペプチドに適用する方法は、とりわけ、前述の参照文献を参照することにより、当業者により容易に理解されるであろう。例えば、ファージ粒子を用いて、例えば、宿主細胞の集団中に、ゲノム修飾タンパク質若しくはシ

ステムの漸進的進化を指令するための更なる例示的な方法を適用して、遺伝子組換えポリペプチド、又はその断片又は若しくはサブドメインの進化型変異体を作製することができる。こうした方法の非限定的な例は、２００９年９月８日に出願され、２０１０年３月１１日に国際公開第２０１０／０２８３４７号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ２００９／０５６１９４号明細書；２０１１年１２月２２日に出願され、２０１２年６月２８日に国際公開第２０１２／０８８３８１号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０６６７４７号明細書；２０１５年５月５日に発行された米国特許第９，０２３，５９４号明細書；２０１７年９月２６日に発行された米国特許第９，７７１，５７４号明細書；２０１６年７月１９日に発行された米国特許第９，３９４，５３７号明細書；２０１５年１月２０日に出願され、２０１５年９月１１日に国際公開第２０１５／１３４１２１号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０１２０２２号明細書；２０１９年１月１５日に発行された米国特許第１０，１７９，９１１号明細書；２０１９年６月１４日に出願され、２０１９年１月３１日に国際公開第２０１９／０２３６８０号パンフレットとして公開された、国際特許出願番号ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／３７２１６号明細書、２０１６年４月１５日に出願され、２０１６年１０月２０日に国際公開第２０１６／１６８６３１号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０２７７９５号明細書並びに２０１９年８月２３日に出願された国際出願、ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／４７９９６号明細書に記載されており、これらは各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２７１】

いくつかの非限定的な例示的実施形態では、進化型変異体遺伝子組換えポリペプチド、その断片若しくはドメインの進化方法は、（ａ）宿主細胞の集団を、目的の遺伝子を含むウイルスベクターの集団（出発遺伝子組換えポリペプチド又はその断片若しくはドメイン）と接触させるステップを含み、ここで、（１）宿主細胞は、ウイルスベクターによる感染に適しており；（２）宿主細胞は、ウイルス粒子の産生に必要なウイルス遺伝子を発現し；（３）感染性ウイルス粒子の産生に必要な少なくとも１つのウイルス遺伝子の発現が、目的の遺伝子の機能に依存しており；及び／又は（４）ウイルスベクターは、宿主細胞でのタンパク質の発現を可能にし、且つ宿主細胞により複製されて、ウイルス粒子中にパッケージングされ得る。一部の実施形態では、本方法は、（ｂ）変異速度を高める（例えば、変異プラスミド又は何らかのゲノム修飾－例えば、損傷ＤＮＡプルーフリーディングポリメラーゼ、ＳＯＳ遺伝子、例えば、ＵｍｕＣ、ＵｍｕＤ’及び／若しくはＲｅｃＡ（それらの突然変異は、プラスミドと結合すると、誘導性プロモータの制御下となり得る）を輸送することにより又はそれらの組合せで）突然変異を含む宿主細胞を用いて、変異原と宿主細胞を接触させることを含む。一部の実施形態では、本方法は、（ｃ）ウイルス複製及びウイルス粒子の産生を可能にする条件下で、宿主細胞の集団をインキュベートすることを含み、ここで、宿主細胞を、宿主細胞集団から除去し、新鮮で、非感染の宿主細胞を、宿主細胞の集団に導入し、このようにして、宿主細胞の集団を補給すると共に、宿主細胞の流れを形成する。一部の実施形態では、目的の遺伝子が突然変異を取得するのを可能にする条件下で細胞をインキュベートする。一部の実施形態では、本方法は、（ｄ）宿主細胞の集団から、進化した遺伝子産物（例えば、進化型変異体遺伝子組換えポリペプチド、又はその断片若しくはドメイン）をコードするウイルスベクターの変異バージョンを単離することを更に含む。

【０２７２】

当業者は、前述した枠組み内で使用可能な種々の特徴を理解するであろう。例えば、一部の実施形態では、ウイルスベクター又はファージは、繊維状ファージ、例えば、Ｍ１３ファージ、例えば、Ｍ１３選択ファージである。特定の実施形態では、感染性ウイルス粒子の産生に必要な遺伝子は、Ｍ１３遺伝子ＩＩＩ（ｇＩＩＩ）である。複数の実施形態では、ファージは、機能性ｇＩＩＩを欠失している場合があるが、代わりにｇＩ、ｇＩＩ、ｇＩＶ、ｇＶ、ｇＶＩ、ｇＶＩＩ、ｇＶＩＩＩ、ｇＩＸ、及びｇＸを含む。一部の実施形

態では、感染性ＶＳＶ粒子の世代は、エンベロープタンパク質ＶＳＶ－Ｇを含む。様々な実施形態で、異なるレトロウイルスベクター、例えば、マウス白血病ウイルス（Ｍｕｒｉｎｅ　Ｌｅｕｋｅｍｉａ　Ｖｉｒｕｓ）ベクター、又はレンチウイルス（Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ）ベクターが使用され得る。複数の実施形態では、レトロウイルスベクターは、例えば、ウイルスのネイティブエンベロープタンパク質の代替物としてＶＳＶ－Ｇエンベロープタンパク質を用いて、効率的にパッケージングすることができる。

【０２７３】

一部の実施形態では、宿主細胞は、好適な数のウイルス生活環、例えば、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも１００、少なくとも２００、少なくとも３００、少なくとも４００、少なくとも、５００、少なくとも６００、少なくとも７００、少なくとも８００、少なくとも９００、少なくとも１０００、少なくとも１２５０、少なくとも１５００、少なくとも１７５０、少なくとも２０００、少なくとも２５００、少なくとも３０００、少なくとも４０００、少なくとも５０００、少なくとも７５００、少なくとも１００００、又はそれ以上の連続したウイルス生活環に応じてインキュベートされ、ここで、Ｍ１３ファージの例示的且つ非限定的な例は、ウイルス生活環毎に１０～２０分である。同様に、宿主細胞が、宿主細胞の集団中に滞留する時間（例えば、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０、約２１、約２２、約２３、約２４、約２５、約３０、約３５、約４０、約４５、約５０、約５５、約６０、約７０、約８０、約９０、約１００、約１２０、約１５０、又は約１８０分）を調整するために、条件を調節することができる。宿主細胞集団は、宿主細胞の密度、又は一部の実施形態では、流入中の宿主細胞密度、例えば、10^3個の細胞／ｍｌ、約10^4個の細胞／ｍｌ、約10^5個の細胞／ｍｌ、約５～10^5個の細胞／ｍｌ、約10^6個の細胞／ｍｌ、約５～10^6個の細胞／ｍｌ、約10^7個の細胞／ｍｌ、約５～10^7個の細胞／ｍｌ、約10^8個の細胞／ｍｌ、約５～10^8個の細胞／ｍｌ、約10^9個の細胞／ｍｌ、約５～10^9個の細胞／ｍｌ、約10^{10}個の細胞／ｍｌ、又は約５～10^{10}個の細胞／ｍｌにより、一部を制御することができる。

【０２７４】

インテイン

一部の実施形態では、以下により詳細に記載されるように、インテイン－Ｎ（ｉｎｔＮ）ドメインは、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドの第１ドメインのＮ末端部分に融合され得、インテイン－Ｃ（ｉｎｔＣ）ドメインは、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドの第２のドメインのＣ末端部分に融合されて、Ｎ末端部分をＣ末端部分に連結し、それにより、第１ドメインと第２のドメインを連結し得る。一部の実施形態では、第１及び第２のドメインは、各々独立して、ＤＮＡ結合ドメイン、ＲＮＡ結合ドメイン、ＲＴドメイン、及びエンドヌクレアーゼドメインから選択される。

【０２７５】

インテインは、例えば、フランキングするＮ末端及びＣ末端エクステイン（例えば、連結しようとする断片）を連結する、自己スプライシングタンパク質イントロン（例えば、ペプチド）として存在し得る。インテインは、いくつかの事例では、自動的に切除されて、タンパク質スプライシングとして知られるプロセスで、残りの断片（エクステイン）をペプチド結合と連結させることができるタンパク質の断片を含み得る。インテインは、「タンパク質イントロン」とも呼ばれる。自動的に切除されて、タンパク質の残り部分を連結させるインテインのプロセスは、本明細書において、「タンパク質スプライシング」又は「インテイン媒介性タンパク質スプライシング」と呼ばれる。

【０２７６】

一部の実施形態では、前駆体タンパク質（インテイン媒介性タンパク質スプライシング前のインテイン含有タンパク質）のインテインは、２つの遺伝子に由来する。こうしたインテインは、本明細書において、スプリットインテイン（例えば、スプリットインテイン－Ｎ及びスプリットインテイン－Ｃ）と呼ばれる。従って、インテインベースの手法が、

第１のポリペプチド配列及び第２のポリペプチド配列を一緒に連結するのに使用され得る。例えば、シアノバクテリア（ｃｙａｎｏｂａｃｔｅｒｉａ）では、ＤＮＡポリメラーゼＩＩＩの触媒サブユニットであるＤｎａＥは、２つの個別の遺伝子、ｄｎａＥ－ｎ及びｄｎａＥ－ｃによってコードされる。ｄｎａＥ－ｎ遺伝子によってコードされるものなどのインテイン－Ｎドメインは、第１のポリペプチド配列の一部として位置する場合、第１のポリペプチド配列を第２のポリペプチド配列と連結し得、ここで、第２のポリペプチド配列は、ｄｎａＥ－ｃ遺伝子によってコードされるものなどのインテイン－Ｃドメインを含む。従って、一部の実施形態では、タンパク質は、第１及び第２のポリペプチド配列をコードする核酸（例えば、第１の核酸分子は、第１のポリペプチド配列をコードし、第２の核酸分子は、第２のポリペプチド配列をコードする）を提供することによって作製され得、核酸は、第１及び第２のポリペプチド配列の生成、及びインテインベースの機構を介した、第１のポリペプチド配列の、第２のポリペプチド配列への連結を可能にする条件下で細胞内に導入される。

【０２７７】

異種タンパク質断片を連結するためのインテインの使用は、例えば、Ｗｏｏｄ ｅｔａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８９（２１）；１４５１２－９（２０１４）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。例えば、個別のタンパク質断片に融合されると、インテインＩｎｔＮ及びＩｎｔＣは、互いを認識し、それ自体からスプライシングして、且つ／又は同時に、それらが融合されているタンパク質断片のフランキングするＮ－及びＣ末端エクステインを連結し、それにより、２つのタンパク質断片から完全長タンパク質を再構成することができる。

【０２７８】

一部の実施形態では、ｄｎａＥインテイン、Ｃｆａ－Ｎ（例えば、スプリットインテイン－Ｎ）及びＣｆａ－Ｃ（例えば、スプリットインテイン－Ｃ）インテイン対に基づく合成インテインを使用する。こうしたインテインの例は、例えば、Ｓｔｅｖｅｎｓ ｅｔａｌ．，Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ．２０１６ Ｆｅｂ．２４；１３８（７）：２１６２－５（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。本開示に従って使用することができるインテイン対の非限定的な例として、Ｃｆａ ＤｎａＥインテイン、Ｓｓｐ ＧｙｒＢインテイン、Ｓｓｐ ＤｎａＸインテイン、Ｔｅｒ ＤｎａＥ３インテイン、Ｔｅｒ ＴｈｙＸインテイン、Ｒｍａ ＤｎａＢインテイン及びＣｎｅ Ｐｒｐ８インテイン（例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，３９４，６０４号明細書に記載されるような）が挙げられる。

【０２７９】

スプリットＣａｓ９に関わる一部の実施形態では、インテイン－Ｎドメイン及びインテイン－Ｃドメインは、スプリットＣａｓ９のＮ末端部分とスプリットＣａｓ９のＣ末端部分との連結のために、スプリットＣａｓ９のＮ末端部分及びスプリットＣａｓ９のＣ末端部分にそれぞれ融合し得る。例えば、一部の実施形態では、インテイン－Ｎを、スプリットＣａｓ９のＮ末端部分のＣ末端に融合させ、すなわち、Ｎ－［スプリットＣａｓ９のＮ末端部分］－［インテイン－Ｎ］－Ｃの構造を形成する。一部の実施形態では、インテイン－Ｃをスプリットｃａｓ９のＣ末端部分のＮ末端に融合させ、すなわち、Ｎ－［インテイン－Ｃ］－［スプリットＣａｓ９のＣ末端部分］－Ｃの構造を形成する。インテインが連結したタンパク質（例えば、スプリットＣａｓ９）を連結させるためのインテイン媒介性タンパク質スプライシングの機構は、Ｓｈａｈ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍ Ｓｃｉ．２０１４；５（ｌ）：４４６－４６ｌ（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。インテインを設計及び使用する方法は、当技術分野において公知であり、例えば、国際公開第２０２００５１５６１号パンフレット、国際公開第２０１４００４３３６号パンフレット、国際公開第２０１７１３２５８０号パンフレット、米国特許出願公開第２０１５０３４４５４９号明細書、及び米国特許出願公開第２０１８０１２７７８０号明細書（それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０２８０】

一部の実施形態では、スプリットは、２つ以上の断片への分割を指す。一部の実施形態では、スプリットＣａｓ９タンパク質又はスプリットＣａｓ９は、２つの個別のヌクレオチド配列によりコードされるＮ末端断片及びＣ末端断片として提供されるＣａｓ９タンパク質を含む。Ｃａｓ９タンパク質のＮ末端部分及びＣ末端部分に対応するポリペプチドはスプライシングされて、再構成Ｃａｓ９タンパク質を形成し得る。実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、例えば、Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，Ｖｏｌｕｍｅ １５６，Ｉｓｓｕｅ ５，ｐｐ．９３５－９４９，２０１４に記載されているか、又はＪｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１６）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３５１：８６７－８７１及びＰＤＢ ｆｉｌｅ：５Ｆ９Ｒに記載されている（それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）ように、タンパク質の変性領域内で２つの断片に分割される。変性領域は、当技術分野で公知の１つ又は複数のタンパク質構造決定技術により決定することができ、そうしたものとして、限定はしないが、Ｘ線結晶構造解析、ＮＭＲ分光法、電子顕微鏡法（例えば、ｃｒｙｏＥＭ）、及び／又はインシリコタンパク質モデル化が挙げられる。一部の実施形態では、タンパク質は、例えば、アミノ酸Ａ２９２－Ｇ３６４、Ｆ４４５－Ｋ４８３若しくはＥ５６５－Ｔ６３７間のＳｐＣａｓ９の領域内の任意のＣ、Ｔ、Ａ若しくはＳ又はいずれか他のＣａｓ９、Ｃａｓ９変異体（例えば、ｎＣａｓ９、ｄＣａｓ９）或いは他のｎａｐＤＮＡｂｐ内の対応する位置で２つの断片に分割される。一部の実施形態では、タンパク質は、ＳｐＣａｓ９ Ｔ３１０、Ｔ３１３、Ａ４５６、Ｓ４６９、又はＣ５７４で２つの断片に分割される。一部の実施形態では、タンパク質を２つの断片に分割するプロセスは、タンパク質の分断と呼ばれる。

【０２８１】

一部の実施形態では、タンパク質断片は、長さが約２～１０００アミノ酸（例えば、２～１０、１０～５０、５０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００又は９００～１０００アミノ酸）の範囲である。一部の実施形態では、タンパク質断片は、長さが約５～５００アミノ酸（例えば、５～１０、１０～５０、５０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００又は４００～５００アミノ酸）の範囲である。一部の実施形態では、タンパク質断片は、長さが約２０～２００アミノ酸（例えば、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～１００又は１００～２００アミノ酸）の範囲である。

【０２８２】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドの部分又は断片をインテインと融合させる。ヌクレアーゼをインテインのＮ末端又はＣ末端と融合させることができる。一部の実施形態では、融合タンパク質の部分又は断片をインテインと融合させると共に、ＡＡＶカプシドタンパク質と融合させる。インテイン、ヌクレアーゼ及びカプシドタンパク質を、任意の配置（例えば、ヌクレアーゼ－インテイン－カプシド、インテイン－ヌクレアーゼ－カプシド、カプシド－インテイン－ヌクレアーゼなど）で一緒に融合させることができる。一部の実施形態では、インテインのＮ末端を融合タンパク質のＣ末端と融合させ、インテインのＣ末端をＡＡＶカプシドタンパク質のＮ末端と融合させる。

【０２８３】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン（例えば、ニッカーゼＣａｓ９ドメイン）がインテイン－Ｎに融合され、ＲＴドメインを含むポリペプチドがインテイン－Ｃに融合される。

【０２８４】

インテイン－Ｎドメイン及び同等のインテイン－Ｃドメインの例示的なヌクレオチド及びアミノ酸配列を以下に記載する。

ＤｎａＥインテイン－Ｎ ＤＮＡ：

【化８】
TGCCTGTCATACGAAACCGAGATACTGACAGTAGAATATGGCCTTCTGCCAATCGGG
AAGATTGTGGAGAAACGGATAGAATGCACAGTTTACTCTGTCGATAACAATGGTAA
CATTTATACTCAGCCAGTTGCCCAGTGGCACGACCGGGGAGAGCAGGAAGTATTCG
AATACTGTCTGGAGGATGGAAGTCTCATTAGGGCCACTAAGGACCACAAATTTATG
ACAGTCGATGGCCAGATGCTGCCTATAGACGAAATCTTTGAGCGAGAGTTGGACCTC
ATGCGAGTTGACAACCTTCCTAAT (配列番号：4029)

ＤｎａＥインテイン－Ｎタンパク質：
ＣＬＳＹＥＴＥＩＬＴＶＥＹＧＬＬＰＩＧＫＩＶＥＫＲＩＥＣＴＶＹＳＶＤＮＮＧＮＩＹ
ＴＱＰＶＡＱＷＨＤＲＧＥＱＥＶＦＥＹＣＬＥＤＧＳＬＩＲＡＴＫＤＨＫＦＭＴＶＤＧＱ
ＭＬＰＩＤＥＩＦＥＲＥＬＤＬＭＲＶＤＮＬＰＮ（配列番号４０３０）
ＤｎａＥインテイン－Ｃ　ＤＮＡ：
ＡＴＧＡＴＣＡＡＧＡＴＡＧＣＴＡＣＡＡＧＧＡＡＧＴＡＴＣＴＴＧＧＣＡＡＡＣＡＡＡ
ＡＣＧＴＴＴＡＴＧＡＴＡＴＴＧＧＡＧＴＣＧＡＡＡＧＡＧＡＴＣＡＣＡＡＣＴＴＴＧＣ
ＴＣＴＧＡＡＧＡＡＣＧＧＡＴＴＣＡＴＡＧＣＴＴＣＴＡＡＴ（配列番号４０３１）
ＤｎａＥインテイン－Ｃタンパク質：
ＭＩＫＩＡＴＲＫＹＬＧＫＱＮＶＹＤＩＧＶＥＲＤＨＮＦＡＬＫＮＧＦＩＡＳＮ（配列番
号４０３２）
Ｃｆａ－Ｎ　ＤＮＡ：
【化９】
TGCCTGTCTTATGATACCGAGATACTTACCGTTGAATATGGCTTCTTGCCTATTGGAA
AGATTGTCGAAGAGAGAATTGAATGCACAGTATATACTGTAGACAAGAATGGTTTC
GTTTACACACAGCCCATTGCTCAATGGCACAATCGCGGCGAACAAGAAGTATTTGA
GTACTGTCTCGAGGATGGAAGCATCATACGAGCAACTAAAGATCATAAATTCATGA
CCACTGACGGGCAGATGTTGCCAATAGATGAGATATTCGAGCGGGGCTTGGATCTC
AAACAAGTGGATGGATTG CCA (配列番号：4033)

Ｃｆａ－Ｎタンパク質：
ＣＬＳＹＤＴＥＩＬＴＶＥＹＧＦＬＰＩＧＫＩＶＥＥＲＩＥＣＴＶＹＴＶＤＫＮＧＦＶＹ
ＴＱＰＩＡＱＷＨＮＲＧＥＱＥＶＦＥＹＣＬＥＤＧＳＩＩＲＡＴＫＤＨＫＦＭＴＴＤＧＱ
ＭＬＰＩＤＥＩＦＥＲＧＬＤＬＫＱＶＤＧＬＰ（配列番号４０３４）
Ｃｆａ－Ｃ　ＤＮＡ：
【化１０】
ATGAAGAGGACTGCCGATGGATCAGAGTTTGAATCTCCCAAGAAGAAGAGGAAAGT
AAAGATAATATCTCGAAAAAGTCTTGGTACCCAAAATGTCTATGATATTGGAGTGGA
GAAAGATCACAACTTCCTTCTCAAGAACGGTCTCGTAGCCAGCAAC (配列番号：
4035)

Ｃｆａ－Ｃタンパク質：
ＭＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＲＫＶＫＩＩＳＲＫＳＬＧＴＱＮＶＹＤＩＧＶＥＫＤ
ＨＮＦＬＬＫＮＧＬＶＡＳＮ（配列番号４０３６）
【０２８５】
更なるドメイン：
遺伝子組換えポリペプチドは、標的ＤＮＡ配列及び鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）に結合し、標的部位に切れ目を入れ、鋳型をＤＮＡに書き込み（例えば、逆転写し）、標的部位の修飾をもたらし得る。一部の実施形態では、プロセスの効率を増強するため、更なるドメインがポリペプチドに付加され得る。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、逆転写されたＤＮＡを標的部位のＤＮＡに連結するため、更なるＤＮＡライゲーションドメインを含み得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、異種ＲＮＡ結合ドメ

インを含み得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、５’から３’にかけてのエキソヌクレアーゼ活性を有するドメインを含み得る（例えば、ここで５’から３’にかけてのエキソヌクレアーゼ活性は、例えば、元のゲノム配列にわたる改変を意図して、標的部位の改変の修復を増強する）。一部の実施形態では、ポリペプチドは、３’から５’にかけてのエキソヌクレアーゼ活性、例えば、プルーフリーディング活性を有するドメインを含み得る。一部の実施形態では、ライティングドメイン、例えばＲＴドメインは、３’から５’にかけてのエキソヌクレアーゼ活性、例えば、プルーフリーディング活性を有する。

【０２８６】

鋳型核酸

本明細書に記載の遺伝子組換えシステムは、鋳型核酸配列を使用し、宿主標的ＤＮＡ部位を修飾することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の遺伝子組換えシステムは、ターゲットプライム逆転写（ＴＰＲＴ）により、ＲＮＡ配列鋳型を宿主標的ＤＮＡ部位に転写する。遺伝子組換えシステムは、ＲＮＡ配列鋳型の逆転写を介してＤＮＡ配列を宿主ゲノムに直接的に組み換えることにより、（例えば、ＣＲＩＳＰＲシステムと異なり）外因性ＤＮＡ配列を宿主細胞に導入する必要なく、目的配列を標的ゲノムに挿入できるとともに、外因性ＤＮＡ挿入ステップを除くことができる。遺伝子組換えシステムは、標的ゲノムから配列を欠失させるか、又は目的配列を用いて置換を導入することもできる。従って、遺伝子組換えシステムは、目的配列、例えば、異種遺伝子コーディング及び／又は機能情報を含む配列を含む、カスタマイズされたＲＮＡ配列鋳型の使用のためのプラットフォームを提供する。

【０２８７】

一部の実施形態では、鋳型核酸は、遺伝子組換えポリペプチドに結合する１つ又は複数の配列（例えば、２つの配列）を含む。

【０２８８】

一部の実施形態では、鋳型核酸は、同じ鎖中のリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチド残基の両方を有するハイブリッドを含む。

【０２８９】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステム又は方法は、単一の鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステム又は方法は、複数の鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）を含む。例えば、本明細書に記載されるシステムは、（例えば、５’から３’にかけて）遺伝子組換えポリペプチド（例えば、ＤＮＡ結合ドメイン及び／又はエンドヌクレアーゼドメイン、例えば、ｇＲＮＡ）に結合する配列及び標的部位（例えば、標的ゲノム中のある部位の第２の鎖）に結合する配列を含む第１のＲＮＡ並びに（例えば、５’から３’にかけて）任意選択で、遺伝子組換えポリペプチドに結合する（例えば、ＲＴドメインに特異的に結合する）配列、異種目的配列及びＰＢＳ配列を含む第２のＲＮＡ（例えば、鋳型ＲＮＡ）を含む。一部の実施形態では、システムが複数の核酸を含む場合、各核酸は、コンジュゲートドメインを含む。一部の実施形態では、コンジュゲートドメインは、例えば、相補的配列のハイブリダイゼーションにより、核酸分子の会合を可能にする。例えば、一部の実施形態では、第１のＲＮＡは、第１のコンジュゲートドメインを含み、第２のＲＮＡは、第２のコンジュゲートドメインを含み、且つ第１及び第２のコンジュゲートドメインは、例えば、ストリンジェントな条件下で、互いにハイブリダイズすることが可能である。一部の実施形態では、ハイブリダイゼーションにおけるストリンジェントな条件は、約６５℃、４倍塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中でのハイブリダイゼーションと、それに続く、約６５℃、１×ＳＳＣでの洗浄とを含む。

【０２９０】

一部の実施形態では、鋳型核酸は、ＲＮＡを含む。一部の実施形態では、鋳型核酸は、ＤＮＡ（例えば、一本鎖又は二本鎖ＤＮＡ）を含む。一部の実施形態では、鋳型核酸は、同じ鎖中のリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチド残基の両方を有するハイブリッドを含む。

【０２９１】
一部の実施形態では、鋳型核酸は、標的配列に対して相同性を有する１つ又は複数（例えば、２つ）の相同性ドメインを含む。一部の実施形態では、相同性ドメインは、約１０～２０、２０～５０、又は５０～１００ヌクレオチド長である。
【０２９２】
一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、例えば、遺伝子組換えポリペプチドを目的の標的部位に導くためのｇＲＮＡ配列を含み得る。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、（例えば、５’から３’にかけて）（ｉ）任意選択で、標的部位（例えば、標的ゲノム中のある部位の第２の鎖）に結合するｇＲＮＡスペーサー、（ｉｉ）任意選択で、本明細書に記載されるポリペプチド（例えば、遺伝子組換えポリペプチド又はＣａｓポリペプチド）に結合するｇＲＮＡスカフォールド、（ｉｉｉ）突然変異領域を含む異種目的配列（任意選択で、異種目的配列は、５’から３’にかけて、第１の相同性領域、突然変異領域、及び第２の相同性領域を含む）、並びに（ｉｖ）３’標的相同性ドメインを含むプライマー結合部位（ＰＢＳ）配列を含む。
【０２９３】
本明細書に記載されるゲノム編集システムの鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）成分は、典型的に、システムの遺伝子組換えポリペプチドに結合可能である。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、遺伝子組換えポリペプチドに結合可能である３’領域を有する。結合領域、例えば、３’領域は、システムの遺伝子組換えポリペプチドに結合可能である、例えば、少なくとも１、２又は３つのヘアピンループを有する構造化ＲＮＡ領域であり得る。結合領域は、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）をポリペプチドモジュールのいずれかと会合させ得る。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の結合領域は、ポリペプチド中のＲＮＡ結合ドメインと会合し得る。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の結合領域は、遺伝子組換えポリペプチドの逆転写ドメインと会合し（例えば、ＲＴドメインに特異的に結合し）得る。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、ポリペプチドのＤＮＡ結合ドメインと会合し得、例えば、ｇＲＮＡは、Ｃａｓ９由来のＤＮＡ結合ドメインと会合する。一部の実施形態では、結合領域は、ＤＮＡ標的認識も提供し得、例えば、ｇＲＮＡは、標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズし、且つポリペプチド、例えばＣａｓ９ドメインに結合する。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、ポリペプチドの複数の成分、例えばＤＮＡ結合ドメイン及び逆転写ドメインと会合し得る。
【０２９４】
一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、３’末端にポリＡテールを有する。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、３’末端にポリＡテールを有しない。
【０２９５】
一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、（例えば、エクスビボ又はインビボで、例えば、対象内の、例えば標的組織又は臓器内の）標的細胞のゲノムＤＮＡ中の所与の突然変異を修正するためにカスタマイズされ得る。例えば、突然変異は、野生型配列に対する疾患関連突然変異であり得る。特定の理論に束縛されることを意図しないが、任意の所与の標的部位及び編集は、ある範囲の編集効率及び忠実度をもたらす遺伝子組換えシステムにおける使用のために多数の可能な鋳型ＲＮＡ分子を有するであろう。このスクリーニング負荷を部分的に減少させるために、経験的パラメータセットは、鋳型ＲＮＡ又はその一部の最適な初期インシリコ設計を確保するのに役立つ。非限定的な実例として、選択された突然変異について、以下の設計パラメータが利用され得る。一部の実施形態では、設計は、標的領域として機能するように、突然変異のいずれかの側に、約５００ｂｐ（例えば、最大で５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０若しくは７００ｂｐ、及び任意選択で少なくとも２０、３０、４０、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００若しくは６５０ｂｐ）の隣接配列を得ることによって開始される。一部の実施形態では、鋳型核酸は、ｇＲＮＡを含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、標的

部位に結合する配列（例えば、ＣＲＩＳＰＲスペーサー）を含む。一部の実施形態では、鋳型核酸の標的領域に対する標的化における使用のための標的部位に結合する配列（例えば、ＣＲＩＳＰＲスペーサー）は、特定の遺伝子組換えポリペプチド（例えば、エンドヌクレアーゼドメイン又はライティングドメイン、例えばＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含む）の使用（例えば、Ｃａｓ９の場合、２０ヌクレオチドｇＲＮＡ結合領域のすぐ３’側のＮＧＧのプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ））を検討することによって選択される。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲスペーサーは、最初に、ＰＡＭが遺伝子組換えシステム誘導編集によって破壊されることになるか否かによる順序付けによって選択される。一部の実施形態では、ＰＡＭの破壊は、編集効率を増加させ得る。一部の実施形態では、ＰＡＭは、遺伝子組換え中、（例えば、ゲノムＤＮＡ中の標的部位に対する別の修飾の一部として又はそれに加えて）サイレント突然変異（例えば、いくらかであっても、標的核酸配列によってコードされるアミノ酸残基を改変しない突然変異）を標的部位に導入することによっても破壊され得る。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲスペーサーは、配列の、それらの所望の編集位置に対応するゲノム部位の近接による順序付けによって選択される。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ｇＲＮＡスカフォールドを含む。一部の実施形態では、使用されるｇＲＮＡスカフォールドは、標準のスカフォールド（例えば、Ｃａｓ９の場合、５’－ＧＴＴＴＴＡＧＡＧＣＴＡＧＡＡＡＴＡＧＣＡＡＧＴＴＡＡＡＡＴＡＡＧＧＣＴＡＧＴＣＣＧＴＴＡＴＣＡＡＣＴＴＧＡＡＡＡＡＧＴＧＧＣＡＣＣＧＡＧＴＣＧＧＴＧＣ－３’）であり得るか、又は１つ又は複数のヌクレオチド置換を含み得る。一部の実施形態では、異種目的配列は、少なくとも９０％の同一性、例えば、少なくとも９０％、９５％、９８％、９９％若しくは１００％の同一性を有し、又は遺伝子組換えによって標的部位に書き込まれ得る任意の挿入、置換若しくは欠失を除いて、第１の鎖ニックの３’側の標的部位に対して非同一性の、１、２、３、４若しくは５つ以下の位置（例えば、第１の鎖ニックのすぐ３’側、又は第１の鎖ニックの３’側の最大で１、２、３、４若しくは５ヌクレオチド）を含む。一部の実施形態では、３’標的相同性ドメインは、少なくとも９０％の同一性、例えば、少なくとも９０％、９５％、９８％、９９％若しくは１００％の同一性を有し、又は第１の鎖ニックの５’側の標的部位に対して非同一性の、１、２、３、４若しくは５つ以下の位置（例えば、第１の鎖ニックのすぐ５’側、又は第１の鎖ニックの３’側の最大で１、２、３、４若しくは５ヌクレオチド）を含む。

【０２９６】

一部の実施形態では、鋳型核酸は、鋳型ＲＮＡである。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、１つ又は複数の修飾ヌクレオチドを含む。例えば、一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、１つ又は複数のデオキシリボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡの領域は、例えば、分子の安定性を増強するため、ＤＮＡヌクレオチドで置換される。例えば、鋳型の３’末端は、ＤＮＡヌクレオチドを含み得る一方、鋳型の残り部分は、逆転写され得るＲＮＡヌクレオチドを含む。例えば、一部の実施形態では、異種目的配列は、主に又は全体的に、ＲＮＡヌクレオチド（例えば、少なくとも９０％、９５％、９８％若しくは９９％のＲＮＡヌクレオチド）から構成される。一部の実施形態では、ＰＢＳ配列は、主に又は全体的に、ＤＮＡヌクレオチド（例えば、少なくとも９０％、９５％、９８％若しくは９９％のＤＮＡヌクレオチド）から構成される。他の実施形態では、ゲノムへのライティングのための異種目的配列は、ＤＮＡヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、鋳型中のＤＮＡヌクレオチドは、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性の能力があるドメインによってゲノム中に複製される。一部の実施形態では、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性は、ポリペプチド中のＤＮＡポリメラーゼドメインによって提供される。一部の実施形態では、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性は、ＤＮＡ依存性ＤＮＡ重合、例えば、第２の鎖合成の能力もある逆転写酵素ドメインによって提供される。一部の実施形態では、鋳型分子は、ＤＮＡヌクレオチドのみで構成される。一部の実施形態では、鋳型核酸は、同じ鎖中のリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチド残基の両方を有するハイブリッドを含む。

【０２９７】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステムは、本明細書に記載される鋳型ＲＮＡの配列を共に含む２つの核酸を含む。一部の実施形態では、２つの核酸は、非共有結合的に互いに会合し、例えば、直接互いに会合し（例えば、塩基対合によって）、又は１つ又は複数の更なる分子を含む複合体の一部として間接的に会合する。

【０２９８】

本明細書に記載される鋳型ＲＮＡは、５’から３’にかけて：（１）ｇＲＮＡスペーサー；（２）ｇＲＮＡスカフォールド；（３）異種目的配列（４）プライマー結合部位（ＰＢＳ）配列を含み得る。これらの成分のそれぞれが、ここでより詳細に記載される。

【０２９９】

ｇＲＮＡスペーサー及びｇＲＮＡスカフォールド

本明細書に記載される鋳型ＲＮＡは、遺伝子組換えシステムを標的核酸に導くｇＲＮＡスペーサー、及び鋳型ＲＮＡと遺伝子組換えポリペプチドのＣａｓドメインとの会合を促進するｇＲＮＡスカフォールドを含み得る。本明細書に記載されるシステムは、鋳型核酸の一部でないｇＲＮＡも含み得る。例えば、ｇＲＮＡスペーサー及びｇＲＮＡスカフォールドを含むが、異種目的配列又はＰＢＳ配列を含まないｇＲＮＡが使用されて、例えば、例えば本明細書において「第２の鎖ニッキング（Ｓｅｃｏｎｄ　Ｓｔｒａｎｄ　Ｎｉｃｋｉｎｇ）」という表題の節に記載されるように、第２の鎖ニッキングを誘導し得る。

【０３００】

一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質の結合に関与するスカフォールド配列と、ゲノム標的に対するユーザ定義の約２０ヌクレオチドの標的配列から構成される短い合成ＲＮＡである。完全ｇＲＮＡの構造は、Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１５６，Ｐ９３５－９４９（２０１４）に記載された。ｇＲＮＡ（単一ガイドＲＮＡに対するｓｇＲＮＡとも称される）は、人工的テトラループで接続されたｃｒＲＮＡ由来及びｔｒａｃｒＲＮＡ由来の配列からなる。ｃｒＲＮＡ配列は、ガイド（２０ｎｔ）及びリピート（１２ｎｔ）領域に分割され得る一方、ｔｒａｃｒＲＮＡ配列は、アンチリピート（１４ｎｔ）及び３つのｔｒａｃｒＲＮＡステムループに分割され得る（Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１５６，Ｐ９３５－９４９（２０１４））。実際、ガイドＲＮＡ配列は、一般に、１７～２４のヌクレオチド（例えば、１９、２０若しくは２１ヌクレオチド）の長さを有し、且つ標的核酸配列に対して相補的であるように設計される。カスタムｇＲＮＡのジェネレーター及びアルゴリズムは、有効なガイドＲＮＡの設計における使用のため、商業的に利用可能である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、天然ＣＲＩＳＰＲシステムからの２つのＲＮＡ成分、例えばｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡを含む。当技術分野で周知のように、ｇＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡ（ヌクレアーゼに結合するため）及び少なくとも１つのｃｒＲＮＡ（ヌクレアーゼを編集／結合について標的化された配列に導くため）の両方からの配列を含むキメラの単一ＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）も含み得る。化学修飾ｓｇＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質での使用に有効であることも証明されており；例えば、Ｈｅｎｄｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，９８５－９９１を参照されたい。一部の実施形態では、ｇＲＮＡスペーサーは、標的遺伝子と会合されるＤＮＡ配列に対して相補的である核酸配列を含む。

【０３０１】

一部の実施形態では、ｇＲＮＡを含む鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡの領域は、（例えば、Ｍｕｌｅｐａｔｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　１９　Ｓｅｐ　２０１４：Ｖｏｌ．３４５，Ｉｓｓｕｅ　６２０３，ｐｐ．１４７９－１４８４に記載のように）標的ＤＮＡに結合したｇＲＮＡのアンダーワウンドリボン様構造をとる。特定の理論に束縛されることを意図しないが、この非標準構造は、ＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッドからの６ヌクレオチドごとの回転によって促進されると考えられる。従って、一部の実施形態では、ｇＲＮＡを含む鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡの領域は、いくらかの間隔で、例えば、６塩基ごとの、標的部位とのミスマッチの増加を許容し得る。一部の実施形態では、標的部位に対する相同性を含むｇＲＮＡを含む鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡの領域は、規則的間隔で

、例えば、６塩基ごとに、標的部位と塩基対合する必要がないようなゆらぎ位置を有し得る。

【０３０２】

一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、例えば、遺伝子組換えポリペプチド（表３）のＣａｓ９ドメインに適切な長さのｇＲＮＡスペーサー配列を含む、例えば、５’末端において、標的部位に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９９％若しくは１００％の相同性の少なくとも１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３若しくは２４の塩基を有する。

【０３０３】

一部の実施形態では、強化された活性を有するＣａｓ９誘導体が、遺伝子組換えポリペプチドにおいて使用され得る。一部の実施形態では、Ｃａｓ９誘導体は、ＨＮＨエンドヌクレアーゼドメイン、例えば、ＳｐｙＣａｓ９　Ｒ２２１Ｋ、Ｎ３９４Ｋの活性を改善する突然変異若しくはＲ－ループ形成、例えば、ＳｐｙＣａｓ９　Ｌ１２４５Ｖを改善する突然変異を含み得るか、又はこのような突然変異の組合せ、例えば、ＳｐｙＣａｓ９　Ｒ２２１Ｋ／Ｎ３９４Ｋ、ＳｐｙＣａｓ９　Ｎ３９４Ｋ／Ｌ１２４５Ｖ、ＳｐｙＣａｓ９　Ｒ２２１Ｋ／Ｌ１２４５Ｖ若しくはＳｐｙＣａｓ９　Ｒ２２１Ｋ／Ｎ３９４Ｋ／Ｌ１２４５Ｖを含み得る（例えば、Ｓｐｅｎｃｅｒ　ａｎｄ　Ｚｈａｎｇ　Ｓｃｉ　Ｒｅｐ　７：１６８３６（２０１７）を参照、Ｃａｓ９誘導体及びそれに含まれる突然変異が、参照により本明細書に組み込まれる）。一部の実施形態では、Ｃａｓ９誘導体は、１つ又は複数のタイプの本明細書に記載される突然変異、例えば、ＰＡＭ修飾突然変異、タンパク質安定化突然変異、活性強化突然変異、及び／又は親酵素（例えば、標的ＤＮＡの一方又は両方の鎖に対するエンドヌクレアーゼ活性をなくす１つ又は複数の突然変異、例えば、ニッカーゼ又は触媒的に不活性な酵素）と比べて１つ若しくは２つのエンドヌクレアーゼドメインを部分的に若しくは完全に不活性化する突然変異を含み得る。一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステムにおいて使用されるＣａｓ９酵素は、触媒効率を改善する突然変異（例えば、ＳｐｙＣａｓ９　Ｒ２２１Ｋ、Ｎ３９４Ｋ、及び／又はＬ１２４５Ｖ）に加えて、酵素に対するニッカーゼ活性を付与する突然変異（例えば、ＳｐｙＣａｓ９　Ｎ８６３Ａ又はＨ８４０Ａ）を含み得る。一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステムにおいて使用されるＣａｓ９酵素は、触媒効率を改善するＲ２２１Ｋ及びＮ３９４Ｋ突然変異に加えて、ニッカーゼ活性を付与するＮ８６３Ａ突然変異を更に含むＳｐｙＣａｓ９酵素又は誘導体である。

【０３０４】

表８は、ｇＲＮＡ及び／又は鋳型ＲＮＡを設計するための成分を定義し、遺伝子組換えについての表３に列記されるＣａｓ変異体を適用するためのパラメータを提供する。切断部位は、検証又は予測されたプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の要件、（ＰＡＭ部位の最も上流の塩基に対する）検証又は予測された切断部位の位置を示す。所与の酵素に対するｇＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ、テトラループ、及びｔｒａｃｒＲＮＡ配列を連結し、標的部位でプロトスペーサーに一致するスペーサー（最小）及びスペーサー（最大）以内の長さの５’スペーサーを更に付加することによって構築され得る。更に、標的でのｓｓＤＮＡニックの予測された位置は、標的プライミング逆転写を開始させるため、ニックのすぐ５’側の配列にアニールし得る鋳型ＲＮＡのＰＢＳ配列を設計するために重要である。一部の実施形態では、本明細書に記載されるｇＲＮＡスカフォールドは、５’から３’方向に、表８のｃｒＲＮＡ、表８の同じ行からのテトラループ、及び表８の同じ行からのｔｒａｃｒＲＮＡ、又はそれと少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％若しくは９９％の同一性を有する配列を含む核酸配列を含む。一部の実施形態では、スカフォールドを含むｇＲＮＡ又は鋳型ＲＮＡは、表８の同じ行に示されるスペーサー（最小）及びスペーサー（最大）以内の長さを有するｇＲＮＡスペーサーを更に含む。一部の実施形態では、表８に従う配列を有するｇＲＮＡ又は鋳型ＲＮＡは、遺伝子組換えポリペプチドを更に含むシステムに含まれ、ここで、遺伝子組換えポリペプチドは、表８の同じ行に記載されるＣａｓドメインを含む。

【０３０５】
【表８－１】
表8 遺伝子組換えシステムにおいて表3に列記されるCas変異体を適用するため、
gRNA及び/又は鋳型RNAを設計するためのパラメータ

変異体	PAM(s)	切断	ティア	スペーサー(最小)	スペーサー(最大)	crRNA	テトラループ	tracrRNA
Nme2Cas9	NNNNCC	-3	1	22	24	GTTGTAGCTCCCTTTCTCATTTCG	GAAA	CGAAATGAGAACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCCCTTAAAGCTTCTGCTTTAAGGGGCATCGTTTA
PpnCas9	NNNNRTT		1	21	24	GTTGTAGCTCCCTTTTTCATTTCGC	GAAA	GCGAAATGAAAAACGTTGTTACAATAAGAGATGAATTTCTCGCAAAGCTCTGCCTCTTGAAATTTCGGTTTCAAGAGGCATC
SauCas9	NNGRR;NNGRRT	-3	1	21	23	GTTTTAGTACTCTG	GAAA	CAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA
SauCas9-KKH	NNNRR;NNNRRT	-3	1	21	21	GTTTTAGTACTCTG	GAAA	CAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA

【０３０６】

【表８－２】

SauriCas9	NNGG	-3	1	21	21	GTTTTAGTACTCTG	GAAA	CAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA
SauriCas9-KKH	NNRG	-3	1	21	21	GTTTTAGTACTCTG	GAAA	CAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA
ScaCas9-Sc++	NNG	-3	1	20	20	GTTTTAGAGCTA	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
SpyCas9	NGG	-3	1	20	20	GTTTTAGAGCTA	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
SpyCas9-NG	NG (NGG=NGA=NGT>NGC)	-3	1	20	20	GTTTTAGAGCTA	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
SpyCas9-SpRY	NRN>NYN	-3	1	20	20	GTTTTAGAGCTA	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
St1Cas9	NNAGAAW>NNAGGAW=NNGGAAW	-3	1	20	20	GTCTTTGTACTCTG	GTAC	CAGAAGCTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTATGGCAGGGTGTTTT
BlatCas9	NNNNCNAA>NNNNCNDD>NNNNC	-3	1	19	23	GCTATAGTTCCTTACT	GAAA	GGTAAGTTGCTATAGTAAGGGCAACAGACCCGAGGCGTTGGGGATCGCCTAGCCCGTGTTTACGGGCTCTCCCCATATTCAAAATAATGACAGACGAGCACCTTGGAGCATTTATCTCCGAGGTGCT
cCas9-v16	NNVACT;NNVATGM;NNVATT;NNVGCT;N	-3	2	21	21	GTCTTAGTACTCTG	GAAA	CAGAATCTACTAAGACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA

【０３０７】

【表８－３】

	NVGTG;NNVGTT							
cCas9-v17	NNVRRN	-3	2	21	21	GTCTTAGTACTCTG	GAAA	CAGAATCTACTAAGACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA
cCas9-v21	NNVACT;NNVATGM;NNVATT;NNVGCT;NNVGTG;NNVGTT	-3	2	21	21	GTCTTAGTACTCTG	GAAA	CAGAATCTACTAAGACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA
cCas9-v42	NNVRRN	-3	2	21	21	GTCTTAGTACTCTG	GAAA	CAGAATCTACTAAGACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA
CdiCas9	NNRHHHY;NNRAAAY		2	22	22	ACTGGGGTTCAG	GAAA	CTGAACCTCAGTAAGCATTGGCTCGTTTCCAATGTTGATTGCTCCGCCGGTGCTCCTTATTTTTAAGGGCGCCGGC
CjeCas9	NNNNRYAC	-3	2	21	23	GTTTTAGTCCCT	GAAA	AGGGACTAAAATAAAGAGTTTGCGGGACTCTGCGGGGTTACAATCCCCTAAAACCGC
GeoCas9	NNNNCRAA		2	21	23	GTCATAGTTCCCCTGA	GAAA	TCAGGGTTACTATGATAAGGGCTTTCTGCCTAAGGCAGACTGACCCGCGGCGTTGGGGATCGCCTGTCGCCCGCTTTTGGCGGGCATTCCCCATCCTT
iSpyMacCas9	NAAN	-3	2	19	21	GTTTTAGAGCTA	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
NmeCas9	NNNNGAYT;NNNNGYTT;NNNNGAY	-3	2	20	24	GTTGTAGCTCCCTTTCTCATTTCG	GAAA	CGAAATGAGAACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCCCTTAAAGCTTCTGCTTTAAGGGGCATCGTTTA

【０３０８】

【表８－４】

	A;NNNNGTCT							
ScaCas9	NNG	-3	2	20	20	GTTTTAGAGCTA	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
ScaCas9-HiFi-Sc++	NNG	-3	2	20	20	GTTTTAGAGCTA	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
SpyCas9-3var-NRRH	NRRH	-3	2	20	20	GTTTAAGAGCTATGCTG	GAAA	CAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
SpyCas9-3var-NRTH	NRTH	-3	2	20	20	GTTTAAGAGCTATGCTG	GAAA	CAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
SpyCas9-3var-NRCH	NRCH	-3	2	20	20	GTTTAAGAGCTATGCTG	GAAA	CAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
SpyCas9-HF1	NGG	-3	2	20	20	GTTTTAGAGCTA	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
SpyCas9-QQR1	NAAG	-3	2	20	20	GTTTTAGAGCTA	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
SpyCas9-SpG	NGN	-3	2	20	20	GTTTTAGAGCTA	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
SpyCas9-VQR	NGAN	-3	2	20	20	GTTTTAGAGCTA	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
SpyCas9-VRER	NGCG	-3	2	20	20	GTTTTAGAGCTA	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC

【０３０９】

【表８－５】

SpyCas9-xCas	NG;GAA;GAT	-3	2	20	20	GTTTAAGAGCTATGCTG	GAAA	CAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
SpyCas9-xCas-NG	NG	-3	2	20	20	GTTTAAGAGCTATGCTG	GAAA	CAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
St1Cas9-CNRZ1066	NNACAA	-3	2	20	20	GTCTTTGTACTCTG	GTAC	CAGAAGCTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTATGGCAGGGTGTTTT
St1Cas9-LMG1831	NNGCAA	-3	2	20	20	GTCTTTGTACTCTG	GTAC	CAGAAGCTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTATGGCAGGGTGTTTT
St1Cas9-MTH17CL396	NNAAAA	-3	2	20	20	GTCTTTGTACTCTG	GTAC	CAGAAGCTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTATGGCAGGGTGTTTT
St1Cas9-TH1477	NNGAAA	-3	2	20	20	GTCTTTGTACTCTG	GTAC	CAGAAGCTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTATGGCAGGGTGTTTT
sRGN3.1	NNGG		1	21	23	GTTTTAGTACTCTG	GAAA	CAGAATCTACTGAAACAAGACAATATGTCGTGTTTATCCCATCAATTTATTGGTGGGATTTT
sRGN3.3	NNGG		1	21	23	GTTTTAGTACTCTG	GAAA	CAGAATCTACTGAAACAAGACAATATGTCGTGTTTATCCCATCAATTTATTGGTGGGATTTT

【０３１０】

更に、末端Ｕｓ及びＴｓが、任意選択で付加されるか又はｔｒａｃｒＲＮＡ配列から除去され得、ＲＮＡとして提供される場合、修飾されるか又は非修飾であり得ることが理解される。特定の例に束縛されることを意図しないが、表８において例示されるものの代替となるｇＲＮＡスカフォールド配列の形態、例えば、ヌクレオチド付加、置換若しくは欠失を有する代替的なｇＲＮＡスカフォールド配列、例えば、ステム－ループ構造が付加若しくは除去された配列は、表４において例示される異なるＣａｓ９酵素又はその誘導体と一緒にも機能し得る。ｇＲＮＡスカフォールド配列が、所与のシステム、Ｃａｓ－ＲＴ融合ポリペプチド、指示、標的突然変異、鋳型ＲＮＡ、又は送達ビヒクルについて同様に最適化され得る遺伝子組換えシステムの成分を表すことが、本明細書において考えられる。

【０３１１】

本明細書において、ＲＮＡ配列（例えば、鋳型ＲＮＡ配列）が、チミン（Ｔ）を含む特定の配列（例えば、表８の配列又はその部分）を含むと記載される場合、当然ながら、Ｒ

ＮＡ配列は、Ｔの代わりにウラシル（Ｕ）を含み得る（含むことが多い）ことが理解される。例えば、ＲＮＡ配列は、表８中の配列においてＴとして示される全ての位置においてＵを含み得る。より具体的には、本開示は、表８の全てのｇＲＮＡスカフォールド配列に従うＲＮＡ配列を提供し、ここで、ＲＮＡ配列は、表８中の配列における各Ｔの代わりにＵを有する。

【０３１２】

異種目的配列

本明細書に記載される鋳型ＲＮＡは、所望の配列を標的核酸に書き込むために、遺伝子組換えポリペプチドが逆転写のための鋳型として使用し得る異種目的配列を含み得る。一部の実施形態では、異種目的配列は、５’から３’に、後編集相同性領域、突然変異領域及び前編集相同性領域を含む。特定の理論に束縛されることを意図しないが、鋳型ＲＮＡにおける逆転写を行うＲＴは、最初に、前編集相同性領域、次に突然変異領域及び次に後編集相同性領域を逆転写し、それによりいずれの側にも相同性領域を有する所望の突然変異を含むＤＮＡ鎖を生成する。

【０３１３】

一部の実施形態では、異種目的配列は、長さが、少なくとも３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、５００若しくは１、０００ヌクレオチド（ｎｔ）、又は長さが、少なくとも１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５若しくは１０キロベースである。一部の実施形態では、異種目的配列は、長さが、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、５００、１、０００若しくは２０００ヌクレオチド（ｎｔ）以下、又は長さが、２０、１５、１０、９、８、７、６、５、４若しくは３キロベース以下である。一部の実施形態では、異種目的配列は、長さが、３０～１０００、４０～１０００、５０～１０００、６０～１０００、７０～１０００、７４～１０００、７５～１０００、７６～１０００、７７～１０００、７８～１０００、７９～１０００、８０～１０００、８５～１０００、９０～１０００、１００～１０００、１２０～１０００、１４０～１０００、１６０～１０００、１８０～１０００、２００～１０００、５００～１０００、３０～５００、４０～５００、５０～５００、６０～５００、７０～５００、７４～５００、７５～５００、７６～５００、７７～５００、７８～５００、７９～５００、８０～５００、８５～５００、９０～５００、１００～５００、１２０～５００、１４０～５００、１６０～５００、１８０～５００、２００～５００、３０～２００、４０～２００、５０～２００、６０～２００、７０～２００、７４～２００、７５～２００、７６～２００、７７～２００、７８～２００、７９～２００、８０～２００、８５～２００、９０～２００、１００～２００、１２０～２００、１４０～２００、１６０～２００、１８０～２００、３０～１００、４０～１００、５０～１００、６０～１００、７０～１００、７４～１００、７５～１００、７６～１００、７７～１００、７８～１００、７９～１００、８０～１００、８５～１００若しくは９０～１００ヌクレオチド（ｎｔ）、又は長さが、１～２０、１～１５、１～１０、１～９、１～８、１～７、１～６、１～５、１～４、１～３、１～２、２～２０、２～１５、２～１０、２～９、２～８、２～７、２～６、２～５、２～４、２～３、３～２０、３～１５、３～１０、３～９、３～８、３～７、３～６、３～５、

３～４、４～２０、４～１５、４～１０、４～９、４～８、４～７、４～６、４～５、５～２０、５～１５、５～１０、５～９、５～８、５～７、５～６、６～２０、６～１５、６～１０、６～９、６～８、６～７、７～２０、７～１５、７～１０、７～９、７～８、８～２０、８～１５、８～１０、８～９、９～２０、９～１５、９～１０、１０～１５、１０～２０若しくは１５～２０キロベースである。一部の実施形態では、異種目的配列は、長さが、１０～１００、１０～９０、１０～８０、１０～７０、１０～６０、１０～５０、１０～４０、１０～３０、又は１０～２０ｎｔ、例えば、長さが１０～８０、１０～５０、又は１０～２０ｎｔ、例えば、長さが約１０～２０ｎｔである。一部の実施形態では、異種目的配列は、長さが８～３０、９～２５、１０～２０、１１～１６又は１２～１５ヌクレオチド、例えば長さが１１～１６ｎｔである。特定の理論に束縛されることを意図しないが、一部の実施形態では、編集のより大きい挿入サイズ、より大きい領域（例えば、標的領域中の第１の編集／置換及び第２の編集／置換間の距離）及び／又はより多い数の所望の編集（例えば、標的ゲノムに対する異種目的配列のミスマッチ）、より長い最適な異種目的配列をもたらし得る。

【０３１４】

特定の実施形態では、鋳型核酸は、例えば、異種コード領域をゲノムに導入し；エクソンの構造／選択的スプライシングに影響するか若しくはそれを引き起こし、例えば、１つ又は複数のエクソンのエクソンスキッピングをもたらし；内因性遺伝子の破壊を引き起こし、例えば、遺伝子ノックアウトを生成し；内因性遺伝子の転写活性化を引き起こし；内因性ＤＮＡのエピジェネティック調節を引き起こし；１つ又は複数の作動可能に連結された遺伝子の上方制御を引き起こし、例えば、遺伝子活性化若しくは過剰発現をもたらし；１つ又は複数の作動可能に連結された遺伝子の下方制御を引き起こし、例えば、遺伝子ノックダウンを生成することなどにより、宿主ゲノム機能を改変又は特定化する配列を含むように同定、設計、改変及び構築可能である、カスタマイズされたＲＮＡ配列鋳型を含む。特定の実施形態では、カスタマイズされたＲＮＡ配列鋳型は、エクソン及び／又は導入遺伝子をコードする配列を含むように、転写因子アクチベーター、リプレッサ、エンハンサーなどに対する結合部位、及びそれらの組合せを意図して、改変され得る。一部の実施形態では、カスタマイズされた鋳型は、標的部位に作動可能に連結された内因性ＲＮＡ転写物又は内因性タンパク質において発現される核酸又はペプチドタグをコードするように改変され得る。他の実施形態では、コード配列は、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、又はポリＡテールで更にカスタマイズされ得る。

【０３１５】

システムの鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、典型的に、所望の配列を標的ＤＮＡに書き込むための目的配列（例えば、異種目的配列）を含む。目的配列は、コーディング又はノンコーディング配列であり得る。鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、標的ＤＮＡ遺伝子座において挿入、突然変異、又は欠失をもたらすように設計され得る。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、標的ＤＮＡにおける挿入を引き起こすように設計され得る。例えば、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、異種配列を含み得、逆転写は、異種配列の標的ＤＮＡへの挿入をもたらすことになる。他の実施形態では、ＲＮＡ鋳型は、欠失を標的ＤＮＡに導入するように設計され得る。例えば、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、所望の欠失の上流及び下流で標的ＤＮＡに一致することがあり、逆転写は、介在配列を有しない鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）からの上流及び下流配列の複製をもたらし、例えば、介在配列の欠失を引き起こすことになる。他の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、編集を標的ＤＮＡに導入するように設計され得る。例えば、鋳型ＲＮＡは、１つ又は複数のヌクレオチドを例外として、標的ＤＮＡ配列に一致することがあり、逆転写は、標的ＤＮＡへのこれらの編集の複製をもたらし、例えば、突然変異、例えば、トランジション又はトランスバージョン突然変異をもたらすことになる。

【０３１６】

一部の実施形態では、標的部位への目的配列の書き込みは、ヌクレオチドの置換をもたらし、例えば、ここで、目的配列の完全長は、１つ又は複数のミスマッチ塩基を有する標

的部位の一致している長さに対応する。一部の実施形態では、異種目的配列は、配列変異の組合せ、例えば、同時の付加及び欠失、付加及び置換、又は欠失及び置換が存在し得るように設計され得る。

【０３１７】

一部の実施形態では、異種目的配列は、オープンリーディングフレーム又はオープンリーディングフレームの断片を含有し得る。一部の実施形態では、異種目的配列は、コザック配列を有する。一部の実施形態では、異種目的配列は、内部リボソーム進入部位を有する。一部の実施形態では、異種目的配列は、Ｔ２Ａ又はＰ２Ａ部位などの自己切断型ペプチドを有する。一部の実施形態では異種目的配列は、開始コドンを有する。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、スプライスアクセプター部位を有する。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、スプライスドナー部位を有する。例示的なスプライスアクセプター及びスプライスドナー部位は、国際公開第２０１６０４４４１６号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。例示的なスプライスアクセプター部位配列は、当業者に公知である。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、停止コドンの下流にｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位を有する。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、オープンリーディングフレームの停止コドンの下流にポリＡテールを有する。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、１つ又は複数のエクソンを含む。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、１つ又は複数のイントロンを含む。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、真核生物転写ターミネーターを含む。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、増強された翻訳エレメント又は翻訳増強エレメントを含む。一部の実施形態では、ＲＮＡは、ヒトＴ細胞白血病ウイルス（ｈｕｍａｎ Ｔ－ｃｅｌｌ ｌｅｕｋｅｍｉａ ｖｉｒｕｓ）（ＨＴＬＶ－１）Ｒ領域を含む。一部の実施形態では、ＲＮＡは、核外輸送を増強する転写後調節配列、例えば、Ｂ型肝炎ウイルス（Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｂ Ｖｉｒｕｓ）（ＨＰＲＥ）又はウッドチャック肝炎ウイルス（Ｗｏｏｄｃｈｕｃｋ Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｖｉｒｕｓ）（ＷＰＲＥ）のものを含む。

【０３１８】

一部の実施形態では、異種目的配列は、ノンコーディング配列を含有し得る。例えば、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、調節エレメント、例えば、プロモータ又はエンハンサー配列又はｍｉＲＮＡ結合部位を含み得る。一部の実施形態では、標的部位での目的配列の組み込みは、内因性遺伝子の上方制御をもたらすことになる。一部の実施形態では、標的部位での目的配列の組み込みは、内因性遺伝子の下方制御をもたらすことになる。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、組織特異的プロモータ又はエンハンサーを含み、その各々は、一方向又は二方向であり得る。一部の実施形態では、プロモータは、ＲＮＡポリメラーゼＩプロモータ、ＲＮＡポリメラーゼＩＩプロモータ、又はＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモータである。一部の実施形態では、プロモータは、ＴＡＴＡエレメントを含む。一部の実施形態では、プロモータは、Ｂ認識エレメントを含む。一部の実施形態では、プロモータは、転写因子のための１つ又は複数の結合部位を有する。

【０３１９】

一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、エピジェネティック修飾を連携させる部位を含む。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、クロマチン絶縁体を含む。例えば、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、ＣＴＣＦ部位又はＤＮＡメチル化に対して標的化された部位を含む。

【０３２０】

一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、エフェクター配列に作動可能に連結された少なくとも１つの調節領域から構成される遺伝子発現ユニットを含む。エフェクター配列は、ＲＮＡに転写される配列（例えば、コーディング配列又はノンコーディング配列、例えば、ｍｉｃｒｏＲＮＡをコードする配列）であり得る。

【０３２１】

一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列は、内因性イン

トロン中に標的ゲノムに挿入される。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列は、標的ゲノムに挿入され、それにより新しいエクソンとして作用する。一部の実施形態では、異種目的配列の標的ゲノムへの挿入は、天然のエクソンの置換又は天然のエクソンのスキッピングをもたらす。

【０３２２】

一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列は、ＡＡＶＳ１、ＣＣＲ５、ＲＯＳＡ２６、又はアルブミン遺伝子座などのゲノムセーフハーバー部位中の標的ゲノムに挿入される。一部の実施形態では、遺伝子組換えを用いて、ＣＡＲをＴ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）遺伝子座に組み込む（Ｅｙｑｕｅｍ ｅｔ ａｌ Ｎａｔｕｒｅ ５４３，１１３－１１７（２０１７））。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムを用いて、ＣＡＲをＴ細胞受容体β定常（ＴＲＢＣ）遺伝子座に組み込む。多くの他のセーフハーバーが、コンピューター手法によって同定されており（Ｐｅｌｌｅｎｚ ｅｔ ａｌ Ｈｕｍ Ｇｅｎ Ｔｈｅｒ ３０，８１４－８２８（２０１９））、遺伝子組換えシステム媒介性組み込みに使用可能である。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列は、インタージェニック又はイントラジェニック領域内のゲノムに付加される。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列は、内因性活性遺伝子の０．１ｋｂ、０．２５ｋｂ、０．５ｋｂ、０．７５、ｋｂ、１ｋｂ、２ｋｂ、３ｋｂ、４ｋｂ、５ｋｂ、７．５ｋｂ、１０ｋｂ、１５ｋｂ、２０ｋｂ、２５ｋｂ、５０、７５ｋｂ若しくは１００ｋｂ以内のゲノム５’又は３’に付加される。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列は、内因性プロモータ又はエンハンサー０．１ｋｂ、０．２５ｋｂ、０．５ｋｂ、０．７５、ｋｂ、１ｋｂ、２ｋｂ、３ｋｂ、４ｋｂ、５ｋｂ、７．５ｋｂ、１０ｋｂ、１５ｋｂ、２０ｋｂ、２５ｋｂ、５０、７５ｋｂ若しくは１００ｋｂ以内のゲノム５’又は３’に付加される。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列は、例えば、５０～５０，０００塩基対（例えば、５０～４０，０００ｂｐ間、５００～３０，０００ｂｐ間、５００～２０，０００ｂｐ間、１００～１５，０００ｂｐ間、５００～１０，０００ｂｐ間、５０～１０，０００ｂｐ間、５０～５，０００ｂｐ間であり得る。

【０３２３】

鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、標的ＤＮＡ遺伝子座で挿入、突然変異、又は欠失をもたらすように設計され得る。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、標的ＤＮＡ中に挿入を引き起こすように設計され得る。例えば、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、異種目的配列を含み得、逆転写は、異種目的配列の標的ＤＮＡへの挿入をもたらすことになる。他の実施形態では、ＲＮＡ鋳型は、欠失を標的ＤＮＡに書き込むように設計され得る。例えば、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、所望の欠失の上流及び下流で標的ＤＮＡに一致することがあり、逆転写は、介在配列を有しない鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）からの上流及び下流配列の複製をもたらし、例えば、介在配列の欠失を引き起こすことになる。他の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、編集を標的ＤＮＡに書き込むように設計され得る。例えば、鋳型ＲＮＡは、１つ又は複数のヌクレオチドを例外として、標的ＤＮＡ配列に一致することがあり、逆転写は、標的ＤＮＡへのこれらの編集の複製をもたらし、例えば、突然変異、例えば、トランジション又はトランスバージョン突然変異をもたらすことになる。

【０３２４】

一部の実施形態では、前編集相同性ドメインは、標的核酸分子に含まれる核酸配列との１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【０３２５】

一部の実施形態では、後編集相同性ドメインは、標的核酸分子に含まれる核酸配列との１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【０３２６】

ＰＢＳ配列

一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、ＰＢＳ配列を含む。一部の

実施形態では、ＰＢＳ配列は、異種目的配列の３’側に配置され、本明細書に記載されるシステムによって修飾されるべき部位に隣接した配列に対して相補的であるか、又はシステム／遺伝子組換えポリペプチドによって修飾されるべき部位に隣接した配列に相補的な配列に対して、１、２、３、４若しくは５つ以下のミスマッチを含む。一部の実施形態では、ＰＢＳ配列は、標的核酸分子中のニック部位の１、２、３、４、５、６、７、８、９若しくは１０ヌクレオチド以内に結合する。一部の実施形態では、ＰＢＳ配列の標的核酸分子への結合は、例えば、ＴＰＲＴについてのプライマーとして作用する３’相同性ドメインによる、ターゲットプライム逆転写（ＴＰＲＴ）の開始を可能にする。一部の実施形態では、ＰＢＳ配列は、長さが、３～５、５～１０、１０～３０、１０～２５、１０～２０、１０～１９、１０～１８、１０～１７、１０～１６、１０～１５、１０～１４、１０～１３、１０～１２、１０～１１、１１～３０、１１～２５、１１～２０、１１～１９、１１～１８、１１～１７、１１～１６、１１～１５、１１～１４、１１～１３、１１～１２、１２～３０、１２～２５、１２～２０、１２～１９、１２～１８、１２～１７、１２～１６、１２～１５、１２～１４、１２～１３、１３～３０、１３～２５、１３～２０、１３～１９、１３～１８、１３～１７、１３～１６、１３～１５、１３～１４、１４～３０、１４～２５、１４～２０、１４～１９、１４～１８、１４～１７、１４～１６、１４～１５、１５～３０、１５～２５、１５～２０、１５～１９、１５～１８、１５～１７、１５～１６、１６～３０、１６～２５、１６～２０、１６～１９、１６～１８、１６～１７、１７～３０、１７～２５、１７～２０、１７～１９、１７～１８、１８～３０、１８～２５、１８～２０、１８～１９、１９～３０、１９～２５、１９～２０、２０～３０、２０～２５若しくは２５～３０ヌクレオチド、例えば長さが１０～１７、１２～１６若しくは１２～１４ヌクレオチドである。一部の実施形態では、ＰＢＳ配列は、長さが、５～２０、８～１６、８～１４、８～１３、９～１３、９～１２若しくは１０～１２ヌクレオチド、例えば長さが９～１２ヌクレオチドである。

【０３２７】

鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、標的ＤＮＡに対していくらかの相同性を有し得る。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、ＰＢＳ配列ドメインは、標的ＤＮＡに対するアニーリング領域として機能し得ることで、標的ＤＮＡは、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の逆転写をプライムするように位置づけられる。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、ＲＮＡの３’末端で、標的ＤＮＡと少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１７５、２００又はそれ以上の塩基の正確な相同性を有する。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、例えば、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の５’末端で、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１７５、２００又はそれ以上の塩基の、標的ＤＮＡに対する少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％又は１００％の相同性を有する。

【０３２８】

誘導性活性を有するｇＲＮＡ

一部の実施形態では、本明細書に記載されるｇＲＮＡ（例えば、鋳型ＲＮＡの一部であるｇＲＮＡ又は第２の鎖ニッキングのために使用されるｇＲＮＡ）は、誘導性活性を有する。誘導性活性は、（ｇＲＮＡに加えて）ブロッキングドメインを更に含む鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡによって達成され得、ブロッキングドメインの一部又は全部の配列は、ｇＲＮＡの一部又は全部に対して、少なくとも部分的に相補的である。従って、ブロッキングドメインは、ｇＲＮＡの一部又は全部に対してハイブリダイズ又は実質的にハイブリダイズ可能である。一部の実施形態では、ブロッキングドメイン及び誘導性活性ｇＲＮＡは、鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡ上に配置されることで、ｇＲＮＡは、ブロッキングドメインがｇＲＮＡに対してハイブリダイズ又は実質的にハイブリダイズされる場合の第１

の立体構造と、ブロッキングドメインがｇＲＮＡに対してハイブリダイズされない又は実質的にハイブリダイズされない場合の第２の立体構造とをとり得る。一部の実施形態では、第１の立体構造において、ｇＲＮＡは、遺伝子組換えポリペプチド（例えば、鋳型核酸結合ドメイン、ＤＮＡ結合ドメイン、又はエンドヌクレアーゼドメイン（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質））に結合できない、又はブロッキングドメインを欠く以外には同様の鋳型ＲＮＡと比較して、実質的に減少した親和性で結合する。一部の実施形態では、第２の立体構造において、ｇＲＮＡは、遺伝子組換えポリペプチド（例えば、鋳型核酸結合ドメイン、ＤＮＡ結合ドメイン、又はエンドヌクレアーゼドメイン（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質））に結合可能である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡが第１又は第２の立体構造のいずれであるかは、遺伝子組換えポリペプチドの（例えば、遺伝子組換えポリペプチドが含むＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質の）ＤＮＡ結合又はエンドヌクレアーゼ活性のいずれが活性であるかに影響し得る。

【０３２９】

一部の実施形態では、第２のニックを連携させるｇＲＮＡは、誘導性活性を有する。一部の実施形態では、第２のニックを連携させるｇＲＮＡは、鋳型が逆転写された後に誘導される。一部の実施形態では、ｇＲＮＡのブロッキングドメインへのハイブリダイゼーションは、開口分子を用いて破壊され得る。一部の実施形態では、開口分子は、ｇＲＮＡ又はブロッキングドメインの一部又は全てに結合し、ｇＲＮＡのブロッキングドメインへのハイブリダイゼーションを阻害する薬剤を含む。一部の実施形態では、開口分子は、例えば、ｇＲＮＡ、ブロッキングドメイン、又は両方に対して部分的に又は全体的に相補的である配列を含む核酸を含む。適切な開口分子を選択又は設計することにより、開口分子の提供は、それがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質と会合し、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質の関連機能（例えば、ＤＮＡ結合及び／又はエンドヌクレアーゼ活性）を提供し得るように、ｇＲＮＡの立体構造の変化を促進し得る。特定の理論に束縛されることを意図しないが、選択された時間及び／又は位置での開口分子の提供は、ｇＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質、又はそれらを含む遺伝子組換えシステムの活性の空間的及び時間的制御を可能にし得る。一部の実施形態では、開口分子は、遺伝子組換えポリペプチド及び／又は鋳型核酸を含む細胞に対して外因性である。一部の実施形態では、開口分子は、（例えば、遺伝子組換えポリペプチド並びに／又はｇＲＮＡ及びブロッキングドメインを含む鋳型核酸を含む細胞に対して内因性である）内因性薬剤を含む。例えば、誘導性ｇＲＮＡ、ブロッキングドメイン、及び開口分子は、開口分子が標的細胞又は組織内で発現される内因性薬剤であるように選択され得、例えば、それにより、標的細胞又は組織内での遺伝子組換えシステムの活性が確認される。更なる例として、誘導性ｇＲＮＡ、ブロッキングドメイン、及び開口分子は、開口分子が１つ又は複数の非標的細胞又は組織内で存在しないか又は実質的に発現されないように選択され得、例えば、それにより、遺伝子組換えシステムの活性は、１つ又は複数の非標的細胞又は組織内で存在しないか若しくは実質的に存在しない、又は標的細胞又は組織と比較して低下したレベルで存在することが確認される。例示的なブロッキングドメイン、開口分子、及びその使用については、ＰＣＴ出願公開の国際公開第２０２００４４０３９Ａ１号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。一部の実施形態では、鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡは、遺伝子組換えポリペプチドの１つ又は複数の成分による、例えば、逆転写酵素又はＲＮＡ結合ドメインによる結合のための１つ又は複数の配列又は構造、及びｇＲＮＡを含み得る。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、遺伝子組換えポリペプチドの鋳型核酸結合ドメイン（例えば、ＲＮＡ結合ドメイン）との相互作用を促進する。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、遺伝子組換えポリペプチドを、例えば、標的細胞ゲノム中の一致する標的配列に導く。

【０３３０】

遺伝子組換えシステムにおける環状ＲＮＡ及びリボザイム

標的細胞内での製剤化、送達又は遺伝子組換え反応中、環状及び／又は線状ＲＮＡ状態を使用することが有用であり得ると考えられる。従って、本明細書に記載の態様のいずれ

かの一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、１つ又は複数の環状ＲＮＡ（ｃｉｒｃＲＮＡ）を含む。本明細書に記載の態様のいずれかの一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、１つ又は複数の線状ＲＮＡを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸（例えば、鋳型核酸、遺伝子組換えポリペプチド、又は両方をコードする核酸分子）は、ｃｉｒｃＲＮＡである。一部の実施形態では、環状ＲＮＡ分子は、遺伝子組換えポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするｃｉｒｃＲＮＡ分子は、宿主細胞に送達される。一部の実施形態では、環状ＲＮＡ分子は、例えば、本明細書に記載されるようなリコンビナーゼをコードする。一部の実施形態では、リコンビナーゼをコードするｃｉｒｃＲＮＡ分子は、宿主細胞に送達される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするｃｉｒｃＲＮＡ分子は、翻訳前に（例えば、宿主細胞内で、例えば、宿主細胞の核内で）線状化される。

【０３３１】

環状ＲＮＡ（ｃｉｒｃＲＮＡ）は、細胞内で天然に生じることが見出されており、ヒト細胞内での非コード及びタンパク質をコードする役割の両方を含む、多様な機能を有することが見出されている。ｃｉｒｃＲＮＡが、ＲＮＡの環状化をもたらすように、自己スプライシングイントロンをＲＮＡ分子（又はＲＮＡ分子をコードするＤＮＡ）に組み込むことによって改変され得、改変されたｃｉｒｃＲＮＡが、増強されたタンパク質の生成及び安定性を有し得ることが示されている（Ｗｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ　２０１８）。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ｃｉｒｃＲＮＡとしてコードされる。特定の実施形態では、鋳型核酸は、ｄｓＤＮＡ又はｓｓＤＮＡなどのＤＮＡである。特定の実施形態では、ｃｉｒｃＤＮＡは、鋳型ＲＮＡを含む。

【０３３２】

一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは、１つ又は複数のリボザイム配列を含む。一部の実施形態では、リボザイム配列は、例えば宿主細胞内で、自己切断のため、活性化され、例えば、それにより、ｃｉｒｃＲＮＡの線状化をもたらす。一部の実施形態では、リボザイムは、マグネシウムの濃度が、例えば宿主細胞内で、切断にとって十分なレベルに達するとき、活性化される。一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは、宿主細胞への送達の前、低いマグネシウム環境下で維持される。一部の実施形態では、リボザイムは、タンパク質応答性リボザイムである。一部の実施形態では、リボザイムは、核酸応答性リボザイムである。一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは、切断部位を含む。一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは、第２の切断部位を含む。

【０３３３】

一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは、標的細胞の核内で線状化される。一部の実施形態では、細胞の核内でのｃｉｒｃＲＮＡの線状化は、例えば、切断事象を活性化するため、細胞の核内に存在する成分に関連する。一部の実施形態では、核エレメント、例えば、核タンパク質、例えば、ゲノムと相互作用するタンパク質、例えば、エピジェネティック修飾因子、例えば、ＥＺＨ２に対して応答性がある、リボザイム、例えば、Ｂ２又はＡＬＵエレメント由来のリボザイムは、例えば、遺伝子組換えシステムの、ｃｉｒｃＲＮＡに組み込まれる。一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡの核局在化は、リボザイムの自己触媒活性の増加及びｃｉｒｃＲＮＡの線状化をもたらす。

【０３３４】

一部の実施形態では、リボザイムは、遺伝子組換えシステムの他の成分の１つ又は複数に対して異種である。一部の実施形態では、誘導性リボザイム（例えば、本明細書に記載されるｃｉｒｃＲＮＡ中）は、例えば、タンパク質リガンド応答性のアプタマー設計を用いることによって合成的に作製される。ＭＳ２コートタンパク質アプタマーを有するタバコ輪斑ウイルス（ｔｏｂａｃｃｏ　ｒｉｎｇｓｐｏｔ　ｖｉｒｕｓ）ハンマーヘッド型リボザイムのサテライトＲＮＡを使用するためのシステムは、ＭＳ２コートタンパク質の存在下で、リボザイム活性の活性化をもたらすことが記載されている（Ｋｅｎｎｅｄｙ　ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　４２（１９）：１２３０６－１２３２

１（２０１４）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる））。複数の実施形態では、こうしたシステムは、細胞質又は核に局在されたタンパク質リガンドに応答する。一部の実施形態では、タンパク質リガンドは、ＭＳ２でない。標的リガンドに対するＲＮＡアプタマーを作製する方法は、例えば、指数関数的濃縮（ＳＥＬＥＸ）によるリガンドの系統的進化に基づき、記載されており（Ｔｕｅｒｋ ａｎｄ Ｇｏｌｄ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９（４９６８）：５０５－５１０（１９９０）；Ｅｌｌｉｎｇｔｏｎ ａｎｄ Ｓｚｏｓｔａｋ，Ｎａｔｕｒｅ ３４６（６２８７）：８１８－８２２（１９９０）；それらの各々の方法は参照により本明細書に組み込まれる）、いくつかの事例では、インシリコ設計によって支援されている（Ｂｅｌｌ ｅｔ ａｌ．ＰＮＡＳ １１７（１５）：８４８６－８４９３、それらの方法は参照により本明細書に組み込まれる）。従って、一部の実施形態では、標的リガンドに対するアプタマーは、合成リボザイムシステム中に作製され、組み込まれ、例えば、例えば、タンパク質リガンドの存在下で、リボザイム媒介性切断及びｃｉｒｃＲＮＡの線状化を誘起する。一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡの線状化は、例えば、細胞質内でリガンドと会合するアプタマーを用いて、細胞質内で誘起される。一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡの線状化は、例えば、核内でリガンドと会合するアプタマーを用いて、核内で誘起される。複数の実施形態では、核内のリガンドは、エピジェネティック修飾因子又は転写因子を含む。一部の実施形態では、線状化を誘起するリガンドは、オンターゲット細胞内に、オフターゲット細胞より高いレベルで存在する。

【０３３５】

更に、ｃｉｒｃＲＮＡの線状化のため、核酸応答性リボザイムシステムが使用され得ると考えられる。例えば、リボザイム活性化を誘起するための、規定された標的核酸分子を感知するバイオセンサーは、例えば、Ｐｅｎｃｈｏｖｓｋｙ（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ａｄｖａｎｃｅｓ ３２（５）：１０１５－１０２７（２０１４）、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。これらの方法により、リボザイムは、天然に不活性状態にフォールドし、規定された標的核酸分子（例えば、ＲＮＡ分子）の存在下のみで活性化される。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムのｃｉｒｃＲＮＡは、規定された標的核酸、例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ガイドＲＮＡ、ｇＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ、ｎｃＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ又はｍｔＲＮＡの存在下で活性化される、核酸応答性リボザイムを含む。一部の実施形態では、線状化を誘起する核酸は、オンターゲット細胞内に、オフターゲット細胞より高いレベルで存在する。

【０３３６】

本明細書中の態様のいずれかの一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、目的の標的組織又は標的細胞に対する誘導特異性を有する１つ又は複数のリボザイム、例えば、目的の標的組織又は標的細胞においてより高いレベルで存在するリガンド又は核酸によって活性化されるリボザイムを組み込む。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、細胞内区画、例えば、核、核小体、細胞質、又はミトコンドリアに対する誘導特異性を有するリボザイムを組み込む。一部の実施形態では、リボザイムは、標的細胞内区画中により高いレベルで存在するリガンド又は核酸によって活性化される。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムのＲＮＡ成分は、例えば、線状化によって活性化される、ｃｉｒｃＲＮＡとして提供される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするｃｉｒｃＲＮＡの線状化は、翻訳のための分子を活性化する。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムのｃｉｒｃＲＮＡ成分を活性化するシグナルが、オンターゲット細胞又は組織内により高いレベルで存在することで、例えば、システムは、これらの細胞内で特異的に活性化される。

【０３３７】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムのＲＮＡ成分は、線状化によって不活性化されるｃｉｒｃＲＮＡとして提供される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするｃｉｒｃＲＮＡは、切断及び分解によって不活性化される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするｃｉｒｃＲＮＡは、翻訳シグナルをポリペプチドのコーディング配列から分離する切断によって不活性化される。一部の実施形態

では、遺伝子組換えシステムのｃｉｒｃＲＮＡ成分を不活性化するシグナルが、オフターゲット細胞又は組織内により高いレベルで存在することで、システムは、これらの細胞内で特異的に不活性化される。

【０３３８】

標的核酸部位

一部の実施形態では、遺伝子組換え後、編集された配列周囲の標的部位は、例えば、Ｋａｒｓｔ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）ｂｉｏＲｘｉｖ　ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／６４５９０３（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、例として、例えば、標的部位のロングリードアンプリコン配列決定により判定して、編集事象の約５０％又は１０％未満において、限られた数の挿入又は欠失を含む。一部の実施形態では、標的部位は、例えば、Ｋａｒｓｔ　ｅｔ　ａｌ．ｂｉｏＲｘｉｖ　ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／６４５９０３（２０２０）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、例えば、標的部位のロングリードアンプリコン配列決定により判定して、複数の連続した編集事象、例えば、ヘッドトゥーテール又はヘッドトゥヘッド重複を示さない。一部の実施形態では、標的部位は、鋳型ＲＮＡに対応する組み込まれた配列を含む。一部の実施形態では、標的部位は、例えば、Ｋａｒｓｔ　ｅｔ　ａｌ．ｂｉｏＲｘｉｖ　ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／６４５９０３（２０２０）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、例えば、標的部位のロングリードアンプリコン配列決定により判定して、事象の約１％又は１０％超において、内因性ＲＮＡから得られる挿入を含まない。一部の実施形態では、標的部位は、鋳型ＲＮＡに対応する組み込まれた配列を含む。

【０３３９】

本発明の特定の態様では、遺伝子組換えシステムによって組み込まれる宿主ＤＮＡ結合部位は、遺伝子内、イントロン内、エクソン内、ＯＲＦ内、任意の遺伝子のコード領域外、遺伝子の調節領域内、又は遺伝子の調節領域外に存在し得る。他の態様では、ポリペプチドは、１つ又は２つ以上の宿主ＤＮＡ配列に結合し得る。

【０３４０】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムを用いて、複数の対立遺伝子中の標的遺伝子座を編集する。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、特定の対立遺伝子を編集するように設計される。例えば、遺伝子組換えポリペプチドは、一方の対立遺伝子上のみに存在する特定の配列に導かれ得、例えば、標的対立遺伝子、例えば、第２のコグネイト対立遺伝子に対してではなく、ｇＲＮＡ又はアニーリングドメインに対して相同性を有する鋳型ＲＮＡを含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、ハプロタイプに特異的な対立遺伝子を改変し得る。一部の実施形態では、特定の対立遺伝子を標的にする遺伝子組換えシステムは、その対立遺伝子を優先的に標的にし、例えば、標的対立遺伝子に対する少なくとも２、４、６、８、又は１０倍の優先性を有する。

【０３４１】

第２の鎖ニッキング

一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムは、第１の鎖に切れ目を入れるニッカーゼ活性（例えば、遺伝子組換えポリペプチド中）、及び標的ＤＮＡの第２の鎖に切れ目を入れるニッカーゼ活性（例えば、遺伝子組換えポリペプチドと別個のポリペプチド中）を含む。本明細書に記載されるように、特定の理論に束縛されることを意図しないが、標的部位ＤＮＡの第１の鎖のニッキングは、鋳型ＲＮＡの配列、例えば、異種目的配列を逆転写するために、ＲＴドメインによって使用され得る３’ＯＨを提供すると考えられる。特定の理論に束縛されることを意図しないが、更なるニックの第２の鎖への導入が、元のゲノム配列より高頻度で異種目的配列ベースの配列をとるように細胞ＤＮＡ修復機構をバイアスし得ると考えられる。一部の実施形態では、第２の鎖に対する更なるニックが、第１の鎖に対するニックとして同じエンドヌクレアーゼドメイン（例えば、ニッカーゼドメイン）によって作製される。一部の実施形態では、同じ遺伝子組換えポリペプチドは、第１の鎖に対するニック及び第２の鎖に対するニックの両方の機能を果た

す。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含み、第２の鎖に対する更なるニックは、例えば、第２の鎖に切れ目を入れるようにＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを導く第２のｇＲＮＡを含む更なる核酸によって導かれる。他の実施形態では、更なる第２の鎖ニックは、第１の鎖に対するニックと異なるエンドヌクレアーゼドメイン（例えば、ニッカーゼドメイン）によって作製される。一部の実施形態では、その異なるエンドヌクレアーゼドメインは、遺伝子組換えポリペプチドと別個に、更なるポリペプチド中に位置する（例えば、本発明のシステムは、更なるポリペプチドを更に含む）。一部の実施形態では、更なるポリペプチドは、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼドメイン（例えば、ニッカーゼドメイン）を含む。一部の実施形態では、更なるポリペプチドは、例えば、本明細書に記載されるＤＮＡ結合ドメインを含む。

【０３４２】

第１の鎖ニックと比較して、第２の鎖ニックが生じる位置は、所望の遺伝子組換えＤＮＡ修飾が得られる範囲、望まれない二本鎖切断（ＤＳＢ）が生じる範囲、望まれない挿入が生じる範囲、又は望まれない欠失が生じる範囲の１つ又は複数に影響し得ることは、本明細書で企図される。特定の理論に束縛されることを意図しないが、第２の鎖ニッキングは、２つの一般的な方向性：内向きニック（ｉｎｗａｒｄ　ｎｉｃｋ）及び外向きニック（ｏｕｔｗａｒｄ　ｎｉｃｋ）において生じ得る。

【０３４３】

一部の実施形態では、内向きニック方向性において、ＲＴドメインは、第２の鎖ニックから離れて（例えば、鋳型ＲＮＡ（例えば、異種目的配列）を用いて）重合する。一部の実施形態では、内向きニック方向性において、第１の鎖に対するニックの位置及び第２の鎖に対するニックの位置は、第１のＰＡＭ部位と第２のＰＡＭ部位との間に位置づけられる（例えば、両方のニックが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含むポリペプチド（例えば、遺伝子組換えポリペプチド）によって作製される状況で）。一部の実施形態では、内向きニック方向性において、第１鎖に対するニックの位置及び第２鎖に対するニックの位置は、ポリペプチドが標的ＤＮＡに結合する部位と更なるポリペプチドが標的ＤＮＡに結合する部位の間に存在する。一部の実施形態では、内向きニック方向性において、第２鎖に対するニックの位置は、第１鎖に対するニックの位置に対する、ポリペプチド及び更なるポリペプチドの結合部位の同じ側に位置づけられる。一部の実施形態では、内向きニック方向性において、第１鎖に対するニックの位置及び第２鎖に対するニックの位置は、ＰＡＭ部位と、標的部位から距離を置いた部位の間に位置づけられる。

【０３４４】

内向きニック方向性を提供する遺伝子組換えシステムの例は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド、第１の鎖上の標的部位ＤＮＡのニッキングを導くｇＲＮＡを含む鋳型ＲＮＡ、及び第１のニックの位置から距離を置いた部位でニッキングを導く更なるｇＲＮＡを含む更なる核酸を含み、第１のニックの位置及び第２のニックの位置は、２つのｇＲＮＡが遺伝子組換えポリペプチドを導く部位のＰＡＭ部位間に存在する。更なる例として、内向きニック方向性を提供する別の遺伝子組換えシステムは、ジンクフィンガー分子及び第１のニッカーゼドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含む更なるポリペプチド、及び第２の鎖上の標的部位ＤＮＡから距離を置いた部位に切れ目を入れるように更なるポリペプチドを導くｇＲＮＡを含む更なる核酸を含み、ここで、ジンクフィンガー分子は、標的部位の第１の鎖に切れ目を入れるように第１のニッカーゼドメインを導く様式で標的ＤＮＡに結合し；第１のニックの位置及び第２のニックの位置が、ＰＡＭ部位とジンクフィンガー分子が結合する部位との間に存在する。更なる例として、内向きニック方向性を提供する別の遺伝子組換えシステムは、ジンクフィンガー分子及び第１のニッカーゼドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド、ＴＡＬエフェクター分子及び第２のニッカーゼドメインを含む更なるポリペプチドを含み、ここで、ジンクフィンガー分子は、標的部位の第１の鎖に切れ目を入れるように第１のニッカーゼドメインを導く様式で標的ＤＮＡに結合し；ここで、ＴＡＬエフェクター分子は、第２の鎖に切れ目を入れるように更なるポリペプチドを導く様式で標的部位

から距離を置いた部位に結合し、第１のニックの位置及び第２のニックの位置は、ＴＡＬエフェクター分子が結合する部位とジンクフィンガー分子が結合する部位との間に存在する。

【０３４５】

一部の実施形態では、外向きニック方向性において、ＲＴドメインは、（例えば、鋳型ＲＮＡ（例えば、異種目的配列）を用いて）第２の鎖ニックに向けて重合する。一部の実施形態では、内向きニック方向性において、第１及び第２のニックの両方がＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含むポリペプチド（例えば、遺伝子組換えポリペプチド）によって作製される場合、第１のＰＡＭ部位及び第２のＰＡＭ部位は、第１の鎖に対するニックの位置と第２の鎖に対するニックの位置との間に位置づけられる。一部の実施形態では、内向きニック方向性において、ポリペプチド（例えば、遺伝子組換えポリペプチド）及び更なるポリペプチドは、第１鎖に対するニックの位置と第２鎖に対するニックの位置の間の標的ＤＮＡ上の部位に結合する。一部の実施形態では、内向きニック方向性において、第２鎖に対するニックの位置は、第１鎖に対するニックの位置に対する、ポリペプチド及び更なるポリペプチドの結合部位の反対側に位置づけられる。一部の実施形態では、内向きの方向性において、ＰＡＭ部位及び標的部位から距離を置いた部位は、第１鎖に対するニックの位置と第２鎖に対するニックの位置の間に位置づけられる。

【０３４６】

外向きニック方向性を提供する遺伝子組換えシステムの例は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド、第１の鎖上の標的部位ＤＮＡのニッキングを導くｇＲＮＡを含む鋳型ＲＮＡ、及び第１のニックの位置から距離を置いた部位でニッキングを導く更なるｇＲＮＡを含む更なる核酸を含み、第１のニックの位置及び第２のニックの位置は、２つのｇＲＮＡが遺伝子組換えポリペプチドを導く部位のＰＡＭ部位外側に存在する（すなわち、ＰＡＭ部位は、第１のニックの位置と第２のニックの位置との間に存在する）。更なる例として、外向きニック方向性を提供する別の遺伝子組換えシステムは、ジンクフィンガー分子及び第１のニッカーゼドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含む更なるポリペプチド並びに第２の鎖上の標的部位ＤＮＡから距離を置いた部位に切れ目を入れるように更なるポリペプチドを導くｇＲＮＡを含む更なる核酸を含み、ここで、ジンクフィンガー分子は、標的部位の第１の鎖に切れ目を入れるように第１のニッカーゼドメインを導く様式で標的ＤＮＡに結合し；第１のニックの位置及び第２のニックの位置は、ＰＡＭ部位及びジンクフィンガー分子が結合する部位の外側に存在する（すなわち、ＰＡＭ部位及びジンクフィンガー分子が結合する部位は、第１のニックの位置と第２のニックの位置との間に存在する）。更なる例として、外向きニック方向性を提供する別の遺伝子組換えシステムは、ジンクフィンガー分子及び第１のニッカーゼドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド、ＴＡＬエフェクター分子及び第２のニッカーゼドメインを含む更なるポリペプチドを含み、ここで、ジンクフィンガー分子は、標的部位の第１の鎖に切れ目を入れるように第１のニッカーゼドメインを導く様式で標的ＤＮＡに結合し；ここで、ＴＡＬエフェクター分子は、第２の鎖に切れ目を入れるように更なるポリペプチドを導く様式で標的部位から距離を置いた部位に結合し、第１のニックの位置及び第２のニックの位置は、ＴＡＬエフェクター分子が結合する部位及びジンクフィンガー分子が結合する部位の外側に存在する（すなわち、ＴＡＬエフェクター分子が結合する部位及びジンクフィンガー分子が結合する部位は、第１のニックの位置と第２のニックの位置との間に存在する）。

【０３４７】

特定の理論に束縛されることを意図しないが、第２の鎖ニックが提供される遺伝子組換えシステムの場合、外向きニック方向性が一部の実施形態において好ましいと考えられる。本明細書に記載のように、内向きニックは、外向きニック方向性より多い数の二本鎖切断（ＤＳＢ）を生成し得る。ＤＳＢは、細胞の核内のＤＳＢ修復経路によって認識され得、望まれない挿入及び欠失を生じ得る。外向きニック方向性は、ＤＳＢ形成のリスク低減、及び対応するより少量の望まれない挿入及び欠失を提供し得る。一部の実施形態では、

望まれない挿入及び欠失は、異種目的配列によってコードされない挿入及び欠失、例えば、異種目的配列によってコードされる修飾と無関係の二本鎖切断修復経路によって生成される挿入又は欠失である。一部の実施形態では、所望の遺伝子組換えは、異種目的配列によってコードされる（例えば、異種目的配列を標的部位に書き込む遺伝子組換えによって達成される）標的ＤＮＡに対する改変（例えば、置換、挿入、又は欠失）を含む。一部の実施形態では、第１の鎖ニック及び第２の鎖ニックは、外向きの方向性である。

【０３４８】

更に、第１の鎖ニックと第２の鎖ニックとの間の距離は、所望の遺伝子組換えシステムＤＮＡ修飾が得られる範囲、望まれない二本鎖切断（ＤＳＢ）が生じる範囲、望まれない挿入が生じる範囲、又は望まれない欠失が生じる範囲の１つ又は複数に影響し得る。特定の理論に束縛されることを意図しないが、第２の鎖ニックは、異種目的配列の標的ＤＮＡへの組み込みに向けてＤＮＡ修復をバイアスすることが、第１の鎖ニックと第２の鎖ニックとの間の距離の減少に応じて増加することから有利であると考えられる。しかしながら、第１の鎖ニックと第２の鎖ニックとの間の距離の減少に応じてＤＳＢ形成のリスクも増加すると考えられる。それに応じて、望まれない挿入及び／又は欠失の数が、第１の鎖ニックと第２の鎖ニックとの間の距離の減少に応じて増加し得ると考えられる。一部の実施形態では、第１の鎖ニックと第２の鎖ニックとの間の距離は、異種目的配列の標的ＤＮＡへの組み込みに向けてＤＮＡ修復をバイアスする利点と、ＤＳＢ形成及び望まれない欠失及び／又は挿入のリスクとを均衡させるように選択される。一部の実施形態では、第１の鎖ニック及び第２の鎖ニックが少なくとも閾値距離離れている場合のシステムは、第１のニック及び第２のニックが閾値距離未満離れている場合のそれ以外には同様の内向きニック方向性システムと比較して、所望の遺伝子組換えシステム修飾結果のレベル増加、望まれない欠失のレベル低下、及び／又は望まれない挿入のレベル低下を有する。一部の実施形態では、閾値距離は、以下に与えられる。

【０３４９】

一部の実施形態では、第１のニック及び第２のニックは、少なくとも２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０若しくは２００ヌクレオチド離れている。一部の実施形態では、第１のニック及び第２のニックは、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００若しくは２５０ヌクレオチド以下離れている。一部の実施形態では、第１のニック及び第２のニックは、２０～２００、３０～２００、４０～２００、５０～２００、６０～２００、７０～２００、８０～２００、９０～２００、１００～２００、１１０～２００、１２０～２００、１３０～２００、１４０～２００、１５０～２００、１６０～２００、１７０～２００、１８０～２００、１９０～２００、２０～１９０、３０～１９０、４０～１９０、５０～１９０、６０～１９０、７０～１９０、８０～１９０、９０～１９０、１００～１９０、１１０～１９０、１２０～１９０、１３０～１９０、１４０～１９０、１５０～１９０、１６０～１９０、１７０～１９０、１８０～１９０、２０～１８０、３０～１８０、４０～１８０、５０～１８０、６０～１８０、７０～１８０、８０～１８０、９０～１８０、１００～１８０、１１０～１８０、１２０～１８０、１３０～１８０、１４０～１８０、１５０～１８０、１６０～１８０、１７０～１８０、２０～１７０、３０～１７０、４０～１７０、５０～１７０、６０～１７０、７０～１７０、８０～１７０、９０～１７０、１００～１７０、１１０～１７０、１２０～１７０、１３０～１７０、１４０～１７０、１５０～１７０、１６０～１７０、２０～１６０、３０～１６０、４０～１６０、５０～１６０、６０～１６０、７０～１６０、８０～１６０、９０～１６０、１００～１６０、１１０～１６０、１２０～１６０、１３０～１６０、１４０～１６０、１５０～１６０、２０～１５０、３０～１５０、４０～１５０、５０～１５０、６０～１５０、７０～１５０、８０～１５０、９０～１５０、１００～１５０、１１０～１５０、１２０～１５０、１３０～１５０、１４０～１５０、２０～１４

０、３０～１４０、４０～１４０、５０～１４０、６０～１４０、７０～１４０、８０～１４０、９０～１４０、１００～１４０、１１０～１４０、１２０～１４０、１３０～１４０、２０～１３０、３０～１３０、４０～１３０、５０～１３０、６０～１３０、７０～１３０、８０～１３０、９０～１３０、１００～１３０、１１０～１３０、１２０～１３０、２０～１２０、３０～１２０、４０～１２０、５０～１２０、６０～１２０、７０～１２０、８０～１２０、９０～１２０、１００～１２０、１１０～１２０、２０～１１０、３０～１１０、４０～１１０、５０～１１０、６０～１１０、７０～１１０、８０～１１０、９０～１１０、１００～１１０、２０～１００、３０～１００、４０～１００、５０～１００、６０～１００、７０～１００、８０～１００、９０～１００、２０～９０、３０～９０、４０～９０、５０～９０、６０～９０、７０～９０、８０～９０、２０～８０、３０～８０、４０～８０、５０～８０、６０～８０、７０～８０、２０～７０、３０～７０、４０～７０、５０～７０、６０～７０、２０～６０、３０～６０、４０～６０、５０～６０、２０～５０、３０～５０、４０～５０、２０～４０、３０～４０若しくは２０～３０ヌクレオチド離れている。一部の実施形態では、第１のニック及び第２のニックは、４０～１００ヌクレオチド離れている。

【０３５０】

特定の理論に束縛されることを意図しないが、第２の鎖ニックが提供され、且つ内向きニック方向性が選択される遺伝子組換えシステムの場合、第１の鎖ニックと第２の鎖ニックとの間の距離の増加が好ましいことがあると考えられる。本明細書に記載のように、内向きニック方向性は、外向きニック方向性よりも多い数のＤＳＢを生成し得、外向きニック方向性よりも多い量の望まれない挿入及び欠失をもたらし得るが、ニック間の距離の増加が、ＤＳＢ、望まれない欠失、及び／又は望まれない挿入のそうした増加を緩和し得る。一部の実施形態では、第１のニック及び第２のニックが少なくとも閾値距離離れている場合の内向きニック方向性は、第１のニック及び第２のニックが閾値距離未満離れている場合のそれ以外には同様の内向きニック方向性システムと比較して、所望の遺伝子組換えシステム修飾結果のレベル増加、望まれない欠失のレベル低下、及び／又は望まれない挿入のレベル低下を有する。一部の実施形態では、閾値距離は、以下に与えられる。

【０３５１】

一部の実施形態では、第１の鎖ニック及び第２の鎖ニックは、内向き方向性である。一部の実施形態では、第１の鎖ニック及び第２の鎖ニックは、内向き方向性であり、第１の鎖ニック及び第２の鎖ニックは、少なくとも１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２２０、２４０、２６０、２８０、３００、３５０、４００、４５０若しくは５００ヌクレオチド離れており、例えば、少なくとも１００ヌクレオチド離れている（及び任意選択で５００、４００、３００、２００、１９０、１８０、１７０、１６０、１５０、１４０、１３０若しくは１２０ヌクレオチド以下離れている）。一部の実施形態では、第１の鎖ニック及び第２の鎖ニックは、内向き方向性であり、第１の鎖ニック及び第２の鎖ニックは、１００～２００、１１０～２００、１２０～２００、１３０～２００、１４０～２００、１５０～２００、１６０～２００、１７０～２００、１８０～２００、１９０～２００、１００～１９０、１１０～１９０、１２０～１９０、１３０～１９０、１４０～１９０、１５０～１９０、１６０～１９０、１７０～１９０、１８０～１９０、１００～１８０、１１０～１８０、１２０～１８０、１３０～１８０、１４０～１８０、１５０～１８０、１６０～１８０、１７０～１８０、１００～１７０、１１０～１７０、１２０～１７０、１３０～１７０、１４０～１７０、１５０～１７０、１６０～１７０、１００～１６０、１１０～１６０、１２０～１６０、１３０～１６０、１４０～１６０、１５０～１６０、１００～１５０、１１０～１５０、１２０～１５０、１３０～１５０、１４０～１５０、１００～１４０、１１０～１４０、１２０～１４０、１３０～１４０、１００～１３０、１１０～１３０、１２０～１３０、１００～１２０、１１０～１２０若しくは１００～１１０ヌクレオチド離れている。

【０３５２】

化学修飾核酸及び核酸末端の特徴

本明細書に記載される核酸（例えば、鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡ；又は遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸（例えば、ｍＲＮＡ）；又はｇＲＮＡ）は、非修飾又は修飾核酸塩基を含み得る。天然に存在するＲＮＡは、４つの塩基性リボヌクレオチド：ＡＴＰ、ＣＴＰ、ＵＴＰ及びＧＴＰから合成されるが、転写後修飾ヌクレオチドを含み得る。更に、ＲＮＡにおいて、約１００の異なるヌクレオシド修飾が同定されている（Ｒｏｚｅｎｓｋｉ，Ｊ，Ｃｒａｉｎ，Ｐ，ａｎｄ ＭｃＣｌｏｓｋｅｙ，Ｊ．（１９９９）．Ｔｈｅ ＲＮＡ Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｄａｔａｂａｓｅ：１９９９ ｕｐｄａｔｅ．Ｎｕｃｌ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ２７：１９６－１９７）。ＲＮＡは、天然に存在しない、全体的に合成のヌクレオチドも含み得る。

【０３５３】

一部の実施形態では、化学修飾は、国際公開第２０１６／１８３４８２号パンフレット、米国特許出願公開第２００９０２８６８５２号明細書、国際特許の国際公開第２０１２／０１９１６８号パンフレット、国際公開第２０１２／０４５０７５号パンフレット、国際公開第２０１２／１３５８０５号パンフレット、国際公開第２０１２／１５８７３６号パンフレット、国際公開第２０１３／０３９８５７号パンフレット、国際公開第２０１３／０３９８６１号パンフレット、国際公開第２０１３／０５２５２３号パンフレット、国際公開第２０１３／０９０６４８号パンフレット、国際公開第２０１３／０９６７０９号パンフレット、国際公開第２０１３／１０１６９０号パンフレット、国際公開第２０１３／１０６４９６号パンフレット、国際公開第２０１３／１３０１６１号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６６９号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１７３６号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６７２号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６６４号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６６５号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６６８号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６７１号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６６７号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６７０号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６６６号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６６３号パンフレット、国際公開第２０１４／０２８４２９号パンフレット、国際公開第２０１４／０８１５０７号パンフレット、国際公開第２０１４／０９３９２４号パンフレット、国際公開第２０１４／０９３５７４号パンフレット、国際公開第２０１４／１１３０８９号パンフレット、国際公開第２０１４／１４４７１１号パンフレット、国際公開第２０１４／１４４７６７号パンフレット、国際公開第２０１４／１４４０３９号パンフレット、国際公開第２０１４／１５２５４０号パンフレット、国際公開第２０１４／１５２０３０号パンフレット、国際公開第２０１４／１５２０３１号パンフレット、国際公開第２０１４／１５２０２７号パンフレット、国際公開第２０１４／１５２２１１号パンフレット、国際公開第２０１４／１５８７９５号パンフレット、国際公開第２０１４／１５９８１３号パンフレット、国際公開第２０１４／１６４２５３号パンフレット、国際公開第２０１５／００６７４７号パンフレット、国際公開第２０１５／０３４９２８号パンフレット、国際公開第２０１５／０３４９２５号パンフレット、国際公開第２０１５／０３８８９２号パンフレット、国際公開第２０１５／０４８７４４号パンフレット、国際公開第２０１５／０５１２１４号パンフレット、国際公開第２０１５／０５１１７３号パンフレット、国際公開第２０１５／０５１１６９号パンフレット、国際公開第２０１５／０５８０６９号パンフレット、国際公開第２０１５／０８５３１８号パンフレット、国際公開第２０１５／０８９５１１号パンフレット、国際公開第２０１５／１０５９２６号パンフレット、国際公開第２０１５／１６４６７４号パンフレット、国際公開第２０１５／１９６１３０号パンフレット、国際公開第２０１５／１９６１２８号パンフレット、国際公開第２０１５／１９６１１８号パンフレット、国際公開第２０１６／０１１２２６号パンフレット、国際公開第２０１６／０１１２２２号パンフレット、国際公開第２０１６／０１１３０６号パンフレット、国際公開第２０１６／０１４８４６号パンフレット、国際公開第２０１６／０２２９１４号パンフレット、国際公開第２０１６／０３６９０２号パンフレット、国際公開第２０１６／０７７１２５号パンフレット、又は国際公開第２０１６／０７７１２３号パンフレット（それらの各々は、その全体が参照

により本明細書に組み込まれる）に提供されるものである。化学修飾ヌクレオチドのポリヌクレオチドへの組み込みが、ヌクレオチド中の修飾の位置に応じて、核酸塩基、バックボーン、又は両方に組み込まれている修飾を生じ得ることが理解される。一部の実施形態では、バックボーン修飾は、欧州特許第２８１３５７０号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に提供されるものである。一部の実施形態では、修飾キャップは、米国特許出願公開第２００５０２８７５３９号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に提供されるものである。

【０３５４】

一部の実施形態では、化学修飾核酸（例えば、ＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、ＡＲＣＡ：アンチリバースキャップ類似体（ｍ２７．３’－ＯＧＰ３Ｇ）、ＧＰ３Ｇ（非メチル化キャップ類似体）、ｍ７ＧＰ３Ｇ（モノメチル化キャップ類似体）、ｍ３２．２．７ＧＰ３Ｇ（トリメチル化キャップ類似体）、ｍ５ＣＴＰ（５’－メチル－シチジン三リン酸）、ｍ６ＡＴＰ（Ｎ６－メチル－アデノシン－５’－三リン酸）、ｓ２ＵＴＰ（２－チオ－ウリジン三リン酸）、及びΨ（プソイドウリジン三リン酸）の１つ又は複数を含む。

【０３５５】

一部の実施形態では、化学修飾核酸は、５’キャップ、例えば：７－メチルグアノシンキャップ（例えば、Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇキャップ）；過剰メチル化キャップ類似体；ＮＡＤ＋由来のキャップ類似体（例えば、Ｋｉｌｅｄｊｉａｎ，Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２８，４５４－４６４（２０１８）に記載のもの）；又は修飾、例えば、ビオチン化されたキャップ類似体（例えば、Ｂｅｄｎａｒｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈｉｌ Ｔｒａｎｓ Ｒ Ｓｏｃ Ｂ ３７３，２０１８０１６７（２０１８）に記載のもの）を含む。

【０３５６】

一部の実施形態では、化学修飾核酸は、ポリＡテール；不対の５ヌクレオチドによって隣接された１６ヌクレオチド長のステム－ループ構造（例えば、Ｍａｎｎｉｒｏｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １７，９１１３－９１２６（１９８９）に記載のもの）；三重らせん構造（例えば、Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ １０９，１９２０２－１９２０７（２０１２）に記載のもの）；ｔＲＮＡ、ＹＲＮＡ若しくはヴォールトＲＮＡ構造（例えば、Ｌａｂｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ １８６３，３１２５－３１４７（２０１６）に記載のもの）；１つ又は複数のデオキシリボヌクレオチド三リン酸（ｄＮＴＰｓ）、２’Ｏ－メチル化ＮＴＰ若しくはホスホロチオエート－ＮＴＰの組み込み；単一のヌクレオチド化学修飾（例えば、３’末端リボースの反応性アルデヒドへの酸化とその後のアルデヒド反応性修飾ヌクレオチドのコンジュゲーション）；又は別の核酸分子への化学ライゲーションの１つ又は複数から選択される３’の特徴を含む。

【０３５７】

一部の実施形態では、核酸（例えば、鋳型核酸）は、例えば、ジヒドロウリジン、イノシン、７－メチルグアノシン、５－メチルシチジン（５ｍＣ）、５’リン酸リボチミジン、２’－Ｏ－メチルリボチミジン、２’－Ｏ－エチルリボチミジン、２’－フルオロリボチミジン、Ｃ－５プロピニル－デオキシシチジン（ｐｄＣ）、Ｃ－５プロピニル－デオキシウリジン（ｐｄＵ）、Ｃ－５プロピニル－シチジン（ｐＣ）、Ｃ－５プロピニル－ウリジン（ｐＵ）、５－メチルシチジン、５－メチルウリジン、５－メチルデオキシシチジン、５－メチルデオキシウリジンメトキシ、２，６－ジアミノプリン、５’－ジメトキシトリチル－Ｎ４－エチル－２’－デオキシシチジン、Ｃ－５プロピニル－ｆ－シチジン（ｐｆＣ）、Ｃ－５プロピニル－ｆ－ウリジン（ｐｆＵ）、５－メチルｆ－シチジン、５－メチルｆ－ウリジン、Ｃ－５プロピニル－ｍ－シチジン（ｐｍＣ）、Ｃ－５プロピニル－ｆ－ウリジン（ｐｍＵ）、５－メチルｍ－シチジン、５－メチルｍ－ウリジン、ＬＮＡ（ロックド核酸）、ＭＧＢ（副溝結合剤）プソイドウリジン（Ψ）、１－Ｎ－メチルプソイドウリジン（１－Ｍｅ－Ψ）、又は５－メトキシウリジン（５－ＭＯ－Ｕ）から選択される１つ又は複数の修飾ヌクレオチドを含む。

【０３５８】
一部の実施形態では、核酸は、バックボーン修飾、例えば、バックボーン中の糖又はリン酸基に対する修飾を含む。一部の実施形態では、核酸は、核酸塩基修飾を含む。
【０３５９】
一部の実施形態では、核酸は、表９の１つ又は複数の化学修飾ヌクレオチド、表１０の１つ又は複数の化学バックボーン修飾、表１１の１つ又は複数の化学修飾キャップを含む。例えば、一部の実施形態では、核酸は、２つ以上（例えば、３、４、５、６、７、８、９、又は１０又はそれ以上）の異なるタイプの化学修飾を含む。例として、核酸は、例えば、本明細書に記載の、例えば、表９中の２つ以上（例えば、３、４、５、６、７、８、９、又は１０又はそれ以上）の異なるタイプの修飾核酸塩基を含み得る。代替的に又は組み合わせて、核酸は、例えば、本明細書に記載の、例えば、表１０中の２つ以上（例えば、３、４、５、６、７、８、９、又は１０又はそれ以上）の異なるタイプのバックボーン修飾を含み得る。代替的に又は組み合わせて、核酸は、例えば、本明細書に記載の、例えば、表１１中の１つ又は複数の修飾キャップを含み得る。例えば、一部の実施形態では、核酸は、１つ若しくは複数のタイプの修飾核酸塩基及び１つ若しくは複数のタイプのバックボーン修飾；１つ若しくは複数のタイプの修飾核酸塩基及び１つ若しくは複数の修飾キャップ；１つ若しくは複数のタイプの修飾キャップ及び１つ若しくは複数のタイプのバックボーン修飾；又は１つ若しくは複数のタイプの修飾核酸塩基、１つ若しくは複数のタイプのバックボーン修飾、及び１つ若しくは複数のタイプの修飾キャップを含む。
【０３６０】
一部の実施形態では、核酸は、１つ又は複数（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、又はそれ以上）の修飾核酸塩基を含む。一部の実施形態では、核酸の全ての核酸塩基が修飾される。一部の実施形態では、核酸は、バックボーン中の１つ又は複数（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、又はそれ以上）の位置で修飾される。一部の実施形態では、核酸の全てのバックボーン位置が修飾される。
【０３６１】

【表９－１】

表9．修飾ヌクレオチド

5-アザ-ウリジン	N2-メチル-6-チオ-グアノシン
2-チオ-5-アザ-ミジン	N2,N2-ジメチル-6-チオ-グアノシン
2-チオウリジン	ピリジン-4-オンリボヌクレオシド
4-チオ-プソイドウリジン	2-チオ-5-アザ-ウリジン
2-チオ-プソイドウリジン	2-チオミジン(thiomidine)
5-ヒドロキシウリジン	4-チオ-プソイドミジン(pseudomidine)
3-メチルウリジン	2-チオ-プソイドウィジン(pseudowidine)
5-カルボキシメチル-ウリジン	3-メチルミジン
1-カルボキシメチル-プソイドウリジン	1-プロピニル-プソイドミジン
5-プロピニル-ウリジン	1-メチル-1-デアザ-プソイドミジン
1-プロピニル-プソイドウリジン	2-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン
5-タウリノメチルウリジン	4-メトキシ-プソイドミジン
1-タウリノメチル-プソイドウリジン	5'-O-(1-チオホスフェート)-アデノシン
5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン	5'-O-(1-チオホスフェート)-シチジン
1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン	5'-O-(1-チオホスフェート)-グアノシン
5-メチル-ウリジン	5'-O-(1-チオホスフェート)-ウリジン
1-メチル-プソイドウリジン	5'-O-(1-チオホスフェート)-プソイドウリジン
4-チオ-1-メチル-プソイドウリジン	2'-O-メチル-アデノシン
2-チオ-1-メチル-プソイドウリジン	2'-O-メチル-シチジン
1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン	2'-O-メチル-グアノシン
2-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドミジン	2'-O-メチル-ウリジン
ジヒドロウリジン	2'-O-メチル-プソイドウリジン
ジヒドロプソイドウリジン	2'-O-メチル-イノシン
2-チオ-ジヒドロミジン	2-メチルアデノシン
2-チオ-ジヒドロプソイドウリジン	2-メチルチオ-N6-メチルアデノシン
2-メトキシウリジン	2-メチルチオ-N6 イソペンテニルアデノシン
2-メトキシ-4-チオ-ウリジン	2-メチルチオ-N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン
4-メトキシ-プソイドウリジン	N6-メチル-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン
4-メトキシ-2-チオ-プソイドウリジン	N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン
5-アザ-シチジン	2-メチルチオ-N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン
プソイドイソシチジン	2'-O-リボシルアデノシン(ホスフェート)
3-メチル-シチジン	1,2'-O-ジメチルイノシン
N4-アセチルシチジン	5,2'-O-ジメチルシチジン
5-ホルミルシチジン	N4-アセチル-2'-O-メチルシチジン
N4-メチルシチジン	ライシジン
5-ヒドロキシメチルシチジン	7-メチルグアノシン
1-メチル-プソイドイソシチジン	N2,2'-O-ジメチルグアノシン
ピロロ-シチジン	N2,N2,2'-O-トリメチルグアノシン
ピロロ-プソイドイソシチジン	2'-O-リボシルグアノシン(ホスフェート)
2-チオ-シチジン	ワイブトシン
2-チオ-5-メチル-シチジン	ペルオキシワイブトシン
4-チオ-プソイドイソシチジン	ヒドロキシワイブトシン
4-チオ-1-メチル-プソイドイソシチジン	未修飾ヒドロキシワイブトシン
4-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドイソシチジン	メチルワイオシン
1-メチル-1-デアザ-プソイドイソシチジン	キューオシン
ゼブラリン	エポキシキューオシン

【０３６２】

【表９－２】

5-アザ-ゼブラリン	ガラクトシル-キューオシン
5-メチル-ゼブラリン	マンノシル-キューオシン
5-アザ-2-チオ-ゼブラリン	7-シアノ-7-デアザグアノシン
2-チオ-ゼブラリン	7-アミノメチル-7-デアザグアノシン
2-メトキシ-シチジン	アーキオシン
2-メトキシ-5-メチル-シチジン	5,2'-O-ジメチルウリジン
4-メトキシ-プソイドイソシチジン	4-チオウリジン
4-メトキシ-1-メチル-プソイドイソシチジン	5-メチル-2-チオウリジン
2-アミノプリン	2-チオ-2'-O-メチルウリジン
2,6-ジアミノプリン	3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン
7-デアザ-アデニン	5-メトキシウリジン
7-デアザ-8-アザ-アデニン	ウリジン 5-オキシ酢酸
7-デアザ-2-アミノプリン	ウリジン 5-オキシ酢酸メチルエステル
7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン	5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン)
7-デアザ-2,6-ジアミノプリン	5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジンメチルエステル
7-デアザ-8-アザ-2,6-ジアミノプリン	5-メトキシカルボニルメチルウリジン
1-メチルアデノシン	5-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチルウリジン
N6-イソペンテニルアデノシン	5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン
N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン	5-アミノメチル-2-チオウリジン
2-メチルチオ-N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン	5-メチルアミノメチルウリジン
N6-グリシニルカルバモイルアデノシン	5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン
N6-トレオニルカルバモイルアデノシン	5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン
2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン	5-カルバモイルメチルウリジン
N6,N6-ジメチルアデノシン	5-カルバモイルメチル-2'-O-メチルウリジン
7-メチルアデニン	5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン
2-メチルチオ-アデニン	5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-O-メチルウリジン
2-メトキシ-アデニン	5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン
イノシン	N4,2'-O-ジメチルシチジン
1-メチル-イノシン	5-カルボキシメチルウリジン
ワイオシン	N6,2'-O-ジメチルアデノシン
ワイブトシン	N,N6,O-2'-トリメチルアデノシン
7-デアザ-グアノシン	N2,7-ジメチルグアノシン
7-デアザ-8-アザ-グアノシン	N2,N2,7-トリメチルグアノシン
6-チオ-グアノシン	3,2'-O-ジメチルウリジン
6-チオ-7-デアザ-グアノシン	5-メチルジヒドロウリジン
6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン	5-ホルミル-2'-O-メチルシチジン
7-メチル-グアノシン	1,2'-O-ジメチルグアノシン
6-チオ-7-メチル-グアノシン	4-デメチルワイオシン
7-メチルイノシン	イソワイオシン
6-メトキシ-グアノシン	N6-アセチルアデノシン
1-メチルグアノシン	
N2-メチルグアノシン	
N2,N2-ジメチルグアノシン	
8-オキソ-グアノシン	
7-メチル-8-オキソ-グアノシン	
1-メチル-6-チオ-グアノシン	

【０３６３】

【表１０】

表 10. 骨格修飾

2'-O-メチル骨格
ペプチド核酸 (PNA)骨格
ホスホロチオエート骨格
モルホリノ骨格
カルバメート骨格
シロキサン骨格
スルフィド骨格
スルホキシド骨格
スルホン骨格
ホルムアセチル骨格
チオホルムアセチル骨格
メチレンホルムアセチル骨格
リボアセチル骨格
アルケン含有骨格
スルファメート骨格
スルホン酸骨格
スルホンアミド骨格
メチレンイミノ骨格
メチレンヒドラジノ骨格
アミド骨格

【０３６４】

【表１１】

表 11. 修飾キャップ

m7GpppA
m7GpppC
m2,7GpppG
m2,2,7GpppG
m7Gpppm7G
m7,2'OmeGpppG
m72'dGpppG
m7,3'OmeGpppG
m7,3'dGpppG
GppppG
m7GppppG
m7GppppA
m7GppppC
m2,7GppppG
m2,2,7GppppG
m7Gppppm7G
m7,2'OmeGppppG
m72'dGppppG
m7,3'OmeGppppG
m7,3'dGppppG

【０３６５】

遺伝子組換えシステムの鋳型を含むヌクレオチドは、天然又は修飾塩基、又はそれらの組合せであり得る。例えば、鋳型は、プソイドウリジン、ジヒドロウリジン、イノシン、７－メチルグアノシン、又は他の修飾塩基を含み得る。一部の実施形態では、鋳型は、ロックド核酸ヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、鋳型中で使用される修飾塩基は、鋳型の逆転写を阻害しない。一部の実施形態では、鋳型中で使用される修飾塩基は、

逆転写、例えば、特異性又は忠実度を改善し得る。
【０３６６】
一部の実施形態では、システムのＲＮＡ成分（例えば、鋳型ＲＮＡ又はｇＲＮＡ）は、１つ又は複数のヌクレオチド修飾を含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡの修飾パターンは、（例えば、Ｆｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ　２２（９）：２２２７－２２３５（２０１８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）からの図１Ｄに示される）非修飾又は末端修飾ガイドと比較して、インビボ活性に有意に影響し得る。特定の理論に束縛されることを意図しないが、このプロセスは、少なくとも部分的には、修飾によって付与されるＲＮＡの安定化に起因し得る。こうした修飾の非限定的な例は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）、２’－０－（２－メトキシエチル）（２’－０－ＭＯＥ）、２’－フルオロ（２’－Ｆ）、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）結合、Ｇ－Ｃ置換並びにヌクレオチド間の逆位脱塩基結合及びそれらの均等物を含み得る。
【０３６７】
一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡ（例えば、標的部位に結合するその１部分）又はガイドＲＮＡは、５’末端領域を含む。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡ又はガイドＲＮＡは、５’末端領域を含まない。一部の実施形態では、５’末端領域は、例えば、ＢｒｉｎｅｒＡＥ　ｅｔ　ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ　５６：３３３－３３９（２０１４）（全体が参照により本明細書に組み込まれる；例えば、全てのガイドＲＮＡに、本明細書で適用可能）中のｓｇＲＮＡに関する記載のように、ｇＲＮＡスペーサー領域を含む。一部の実施形態では、５’末端領域は、５’末端修飾を含む。一部の実施形態では、５’末端領域は、スペーサー領域と共に又はスペーサー領域なしで、ｃｒＲＮＡ、ｔｒＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ及び／又はｄｇＲＮＡと会合され得る。ｇＲＮＡスペーサー領域は、いくつかの事例では、ガイド領域、ガイドドメイン、又は標的ドメインを含み得る。
【０３６８】
一部の実施形態では、本明細書に記載される鋳型ＲＮＡ（例えば、標的部位に結合するその１部分）又はガイドＲＮＡは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の表４に示される配列のいずれかを含む。一部の実施形態では、配列が、ガイド及び／又はスペーサー領域を示す場合、組成物は、この領域を含んでも又は含まなくてもよい。一部の実施形態では、ガイドＲＮＡは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４に示される、例えば、その中で配列番号によって同定されたような配列のいずれかの修飾の１つ又は複数を含む。複数の実施形態では、ヌクレオチドは、同じであるか又は異なり得、且つ／又は示される修飾パターンは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４に示されるようなガイド配列の修飾パターンに対して同一又は類似であり得る。一部の実施形態では、修飾パターンは、ｇＲＮＡの修飾の相対的位置及び同一性又はｇＲＮＡの領域（例えば５’末端領域、より下流のステム領域、バルジ領域、より上流のステム領域、ネクサス領域、ヘアピン１領域、ヘアピン２領域、３’末端領域）を含む。一部の実施形態では、修飾パターンは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４の配列カラムに示される配列のいずれか１つの、及び／又はその配列の１つ若しくは複数の領域にわたる修飾の少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％を含む。一部の実施形態では、修飾パターンは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４の配列カラムに示される配列のいずれか１つの修飾パターンと、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４に示される配列の１つ又は複数の領域にわたり、例えば、５’末端領域、より下流のステム領域、バルジ領域、より上流のステム領域、ネクサス領域、ヘアピン１領域、ヘアピン２領域、及び／又は３’末端領域において、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修

飾パターンは、５’末端領域にわたる配列の修飾パターンに対して、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、より下流のステムにわたり、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、バルジにわたり、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、より上流のステムにわたり、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、ネクサスにわたり、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、ヘアピン１にわたり、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、ヘアピン２にわたり、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、３’末端にわたり、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４の配列、又はこうした配列の領域（例えば５’末端、より下流のステム、バルジ、より上流のステム、ネクサス、ヘアピン１、ヘアピン２、３’末端）の修飾パターンと、例えば、０、１、２、３、４、５、６、又はそれ以上のヌクレオチドで異なる。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４の配列の修飾と、例えば、０、１、２、３、４、５、６、又はそれ以上のヌクレオチドで異なる修飾を含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４の配列の領域（例えば５’末端、より下流のステム、バルジ、より上流のステム、ネクサス、ヘアピン１、ヘアピン２、３’末端）の修飾と、例えば、０、１、２、３、４、５、６、又はそれ以上のヌクレオチドで異なる修飾を含む。

【０３６９】

一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡ（例えば、標的部位に結合するその１部分）又はｇＲＮＡは、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端修飾、３’末端修飾、又は５’及び３’末端修飾を含む。一部の実施形態では、５’末端修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含む。一部の実施形態では、５’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ＭＯＥ）、及び／又は２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、５’末端修飾は、少なくとも１つのホスホロチオエート（ＰＳ）結合及び２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ＭＯＥ）、及び／又は２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドの１つ又は複数を含む。末端修飾は、ホスホロチオエート（ＰＳ）、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ＭＯＥ）、及び／又は２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾を含み得る。等価な末端修飾も、本明細書に記載される実施形態によって包含される。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡ又はｇＲＮＡは、鋳型ＲＮＡ又はｇＲＮＡの１つ又は複数の領域の修飾と組み合わせた末端修飾を含む。ＲＮＡ、例えば、ｇＲＮＡ、及びその組成式を保護するための更なる例示的な修飾及び方法は、国際公開第２０１８１２６１７６Ａ１号パンフレッ

ト（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。
【０３７０】
一部の実施形態では、構造－ガイド及び系統学的手法を用いて、例えば、Ｍｉｒ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ ９：２６４１（２０１８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、鋳型ＲＮＡ又はガイドＲＮＡに修飾（例えば、２’－ＯＭｅ－ＲＮＡ、２’－Ｆ－ＲＮＡ、及びＰＳ修飾）を導入する。一部の実施形態では、２’－Ｆ－ＲＮＡの組み込みは、例えば、Ｃ３’－エンド糖パッカリングに最小限に干渉しながら、ＲＮＡ：ＲＮＡ又はＲＮＡ：ＤＮＡ二本鎖の熱安定性及びヌクレアーゼ安定性を増加させる。一部の実施形態では、２’－Ｆは、２’－ＯＨがＲＮＡ：ＤＮＡ二本鎖安定性に重要である場合の位置で２’－ＯＭｅより優れた耐容性を示し得る。一部の実施形態では、ｃｒＲＮＡは、Ｃａｓ９活性を低下させない１つ又は複数の修飾、例えば、Ｍｉｒｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ ９：２６４１（２０１８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の補足表１に記載の、例えば、Ｃ１０、Ｃ２０、又はＣ２１（完全に修飾）を含む。一部の実施形態では、ｔｒａｃｒＲＮＡは、Ｃａｓ９活性を低下させない１つ又は複数の修飾、例えば、Ｍｉｒ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ ９：２６４１（２０１８）の補足表１のＴ２、Ｔ６、Ｔ７、又はＴ８（完全に修飾）を含む。一部の実施形態では、（例えば、本明細書に記載されるような）１つ又は複数の修飾を含むｃｒＲＮＡは、１つ又は複数の修飾、例えば、Ｃ２０及びＴ２を含むｔｒａｃｒＲＮＡと対合され得る。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、例えば、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡのキメラを含む（例えば、Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３７（６０９６）：８１６－８２１（２０１２））。複数の実施形態では、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡの修飾は、例えば、安定性が増強された修飾ｇＲＮＡを作製するため、単一ガイドキメラ上にマッピングされる。
【０３７１】
一部の実施形態では、ｇＲＮＡ分子は、天然に存在する構成成分、例えば、ヘアピンの付加又はサブトラクションによって修飾され得る。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、例えば、国際公開第２０１８１０６７２７号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、１つ又は複数の３’ヘアピン要素が欠失されたｇＲＮＡを含み得る。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、付加されたヘアピン構造、例えば、Ｋｏｃａｋ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３７（６）：６５７－６６６（２０１９）の教示内容中でＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの特異性を増加させることが示された、スペーサー領域内に付加されたヘアピン構造を含有し得る。短縮されたｇＲＮＡ及びインビボ活性を改善する特定の修飾の例を含む更なる修飾は、米国特許出願公開第２０１９０３１６１２１号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に見出すことができる。
【０３７２】
一部の実施形態では、構造－ガイド及び系統学的手法（例えば、Ｍｉｒ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ ９：２６４１（２０１８）に記載のとおり；全体が参照により本明細書に組み込まれる）を用いて、鋳型ＲＮＡに対する修飾を見出す。複数の実施形態では、その修飾は、鋳型ＲＮＡのガイド領域の包含又は除外によって同定される。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡに結合されたポリペプチドの構造を用いて、ＲＮＡの非タンパク質と接触したヌクレオチドを判定し、次に、例えば、ＲＮＡとポリペプチドとの会合を破壊するリスクがより低い修飾について選択することができる。更に、鋳型ＲＮＡ中の二次構造は、ソフトウェアツール、例えば、ｒｎａ．ｕｒｍｃ．ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ．ｅｄｕ／ＲＮＡｓｔｒｕｃｔｕｒｅＷｅｂで利用可能なＲＮＡ構造ツールによってインシリコで予測し（Ｂｅｌｌａｏｕｓｏｖ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４１：Ｗ４７１－Ｗ４７４（２０１３）；その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、例えば、修飾、例えば、ヘアピン、ステム、及び／又はバルジを選択するための二次構造を決定することが可能である。
【０３７３】

組成物及びシステムの作製

当業者に理解されるように、核酸構築物及びタンパク質又はポリペプチド（本明細書に記載されるシステム、構築物及びポリペプチドなど）を設計及び構築する方法は、当技術分野において常用的である。一般に、組換え法が使用され得る。概略については、Ｓｍａｌｅｓ ＆ Ｊａｍｅｓ（Ｅｄｓ．）、Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ），Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２００５）；及びＣｒｏｍｍｅｌｉｎ，Ｓｉｎｄｅｌａｒ ＆ Ｍｅｉｂｏｈｍ（Ｅｄｓ．），Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ（２０１３）を参照されたい。核酸組成物を設計、調製、評価、精製及び操作する方法は、Ｇｒｅｅｎ ａｎｄ Ｓａｍｂｒｏｏｋ（Ｅｄｓ．），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｆｏｕｒｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（２０１２）に記載されている。

【０３７４】

本開示は、部分的に、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチド、本明細書に記載される鋳型核酸、又は両方をコードする核酸、例えば、ベクターを提供する。一部の実施形態では、ベクターは、選択マーカ、例えば、抗生物質耐性マーカを含む。一部の実施形態では、抗生物質耐性マーカは、カナマイシン耐性マーカである。一部の実施形態では、抗生物質耐性マーカは、βラクタム抗生物質に耐性を付与しない。一部の実施形態では、ベクターは、アンピシリン耐性マーカを含まない。一部の実施形態では、ベクターは、カナマイシン耐性マーカを含み、アンピシリン耐性マーカを含まない。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするベクターは、標的細胞ゲノムに組み込まれる（例えば、標的細胞、組織、器官、又は対象への投与時に）。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするベクターは、標的細胞ゲノムに組み込まれない（例えば、標的細胞、組織、器官、又は対象への投与時に）。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）をコードするベクターは、標的細胞ゲノムに組み込まれない（例えば、標的細胞、組織、器官、又は対象への投与時に）。一部の実施形態では、ベクターが、標的細胞ゲノム中の標的部位に組み込まれる場合、選択マーカは、ゲノムに組み込まれない。一部の実施形態では、ベクターが、標的細胞ゲノム中の標的部位に組み込まれる場合、ベクターの維持に関与する遺伝子又は配列（例えば、プラスミド維持遺伝子）は、ゲノムに組み込まれない。一部の実施形態では、ベクターが、標的細胞ゲノム中の標的部位に組み込まれる場合、移入調節配列（例えば、ＡＡＶ由来の、例えば、逆位末端配列）は、ゲノムに組み込まれない。一部の実施形態では、ベクター（例えば、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチド、本明細書に記載される鋳型核酸、又はその両方をコードする）を標的細胞、組織、器官、又は対象へ投与することにより、前記標的細胞、組織、器官、又は対象のゲノム中の１つ若しくは複数の標的部位へのベクターの１部分の組み込みが起こる。一部の実施形態では、組み込まれた物質を含む標的部位の９９、９５、９０、８０、７０、６０、５０、４０、３０、２０、１０、５、４、３、２若しくは１％未満（例えば、標的部位なし）は、ベクター由来の、選択マーカ（例えば、抗生物質耐性遺伝子）、移入調節配列（例えば、ＡＡＶ由来の、例えば、逆位末端配列）、又は両方を含む。

【０３７５】

本明細書に記載される医薬用タンパク質又はポリペプチドを生産する例示的な方法は、哺乳動物細胞での発現を含むが、適切なプロモータの制御下の昆虫細胞、酵母、細菌、又は他の細胞を用いて、組換えタンパク質を生産することもできる。哺乳動物発現ベクターは、非転写因子、例えば、複製起点、好適なプロモータ、並びに他の５’若しくは３’フランキング非転写配列、並びに５’若しくは３’非翻訳配列、例えば必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー及びアクセプター部位並びに終結配列を含み得る。ＳＶ４０ウイルスゲノム由来のＤＮＡ配列、例えばＳＶ４０オリジン、アーリープ

ロモータ、スプライス、及びポリアデニル化部位を使用して、異種ＤＮＡ配列の発現に必要な他の遺伝因子を提供することができる。細菌、真菌、酵母、及び哺乳動物細胞宿主での使用に適切なクローニング及び発現ベクターは、Ｇｒｅｅｎ ＆ Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｆｏｕｒｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（２０１２）に記載されている。

【０３７６】

様々な哺乳動物細胞培養システムを使用して、組換えタンパク質を発現させ、製造することができる。哺乳動物発現システムの例として、ＣＨＯ、ＣＯＳ、ＨＥＫ２９３、ＨｅＬＡ、及びＢＨＫ細胞株が挙げられる。タンパク質治療薬生産のための宿主細胞培養方法は、Ｚｈｏｕ ａｎｄ Ｋａｎｔａｒｄｊｉｅｆｆ（Ｅｄｓ．），Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ ｆｏｒ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ（Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ／Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），Ｓｐｒｉｎｇｅｒ（２０１４）に記載されている。本明細書に記載される組成物は、組換えタンパク質をコードするベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターを含み得る。一部の実施形態では、ベクター、例えば、ウイルスベクターは、組換えタンパク質をコードする核酸を含み得る。

【０３７７】

タンパク質治療薬の精製は、Ｆｒａｎｋｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ，Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｓｔａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２０１３）；及びＣｕｔｌｅｒ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ），Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２０１０）に記載されている。

【０３７８】

本開示は、遺伝子組換えポリペプチド及び／又はゲノム標的部位に対する特異性を有する鋳型核酸分子（例えば、鋳型ＲＮＡ）の作製のための組成物及び方法も提供する。一態様では、本方法は、上流の相同性セグメント、異種目的配列セグメント、遺伝子組換えポリペプチド結合モチーフ、及びｇＲＮＡセグメントを含むＲＮＡセグメントの作製を含む。

【０３７９】

用途

治療用途

一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを用いて、細胞（例えば、動物細胞、植物細胞、又は真菌細胞）を修飾することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを用いて、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）を修飾することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを用いて、家畜動物（例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ラマ、アルパカ、ラクダ、ヤク、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、又はダチョウ）由来の細胞を修飾することができる。一部の実施形態では、例えば、動物細胞、例えば、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）、植物細胞、又は真菌細胞を修飾するために、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを、実験ツール若しくは研究ツールとして使用するか、又は実験方法若しくは研究方法に使用することができる。

【０３８０】

コーディング遺伝子をＲＮＡ配列鋳型に組み込むことにより、例えば、機能喪失型変異を有する個体において治療導入遺伝子の発現を提供することにより、機能獲得型変異を正常な導入遺伝子で置換することにより、機能獲得型変異発現を排除するために調節配列を提供することにより、及び／又は作動可能に連結された遺伝子、導入遺伝子及びそのシステムの発現を制御することにより、遺伝子組換えシステムは、治療ニーズに対処することができる。特定の実施形態では、ＲＮＡ配列鋳型は、宿主細胞の治療ニーズに特異的なプ

ロモータ領域、例えば組織特異的プロモータ又はエンハンサーをコードする。更に他の実施形態では、プロモータは、コーディング配列と作動可能に連結させることができる。

【０３８１】

一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、標的遺伝子の発現（例えば、転写又は翻訳）を増加又は減少させる。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、プロモータ又はエンハンサー内の配列、例えば転写因子に結合する配列を改変し、付加し、又は欠失させることにより、標的遺伝子の発現（例えば、転写又は翻訳）を増加又は減少させる。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、標的遺伝子の翻訳を改変し（例えば、アミノ酸配列を改変し）、開始若しくは停止コドンを挿入するか若しくは欠失させ、遺伝子の翻訳フレームを改変若しくは修復する。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、例えば、スプライスアクセプター又はドナー部位を挿入し、欠失させ、又は改変することにより、標的遺伝子のスプライシングを改変する。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、転写物又はタンパク質の半減期を改変する。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、標的遺伝子、例えば、標的遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を改変し、増加させ、減少させる。

【０３８２】

代償性編集（ｃｏｍｐｅｎｓａｔｏｒｙ　ｅｄｉｔ）

一部の実施形態では、本明細書に提供されるシステム又は方法を用いて、代償性編集を導入することができる。一部の実施形態では、代償性編集は、疾患を引き起こす突然変異の位置と異なる、疾患又は障害に関連する遺伝子の位置に存在する。一部の実施形態では、代償性突然変異は、原因突然変異を含む遺伝子中に存在しない。一部の実施形態では、代償性編集は、疾患を引き起こす突然変異を無効にするか又は代償し得る。一部の実施形態では、代償性編集は、本明細書に提供されるシステム又は方法によって導入され、疾患を引き起こす突然変異の変異体の効果を抑制し、又は元に戻すことができる。

【０３８３】

調節編集

一部の実施形態では、本明細書に提供されるシステム又は方法を用いて、調節編集を導入することができる。一部の実施形態では、調節編集は、遺伝子の調節配列、例えば、遺伝子プロモータ、遺伝子エンハンサー、遺伝子リプレッサ、又は遺伝子スプライシングを制御する配列に導入される。一部の実施形態では、調節編集は、標的遺伝子の発現レベルを増加又は減少させる。一部の実施形態では、標的遺伝子は、疾患を引き起こす突然変異を含む遺伝子と同じである。一部の実施形態では、標的遺伝子は、疾患を引き起こす突然変異を含む遺伝子と異なる。

【０３８４】

リピート伸長病

一部の実施形態では、本明細書に提供されるシステム又は方法を用いて、リピート伸長病を処置することができる。一部の実施形態では、本明細書に提供されるシステム又は方法、例えば、遺伝子組換えポリペプチドを含むものを用いて、カスタマイズされたＲＮＡ鋳型に従う遺伝子座でリピートの数をリセットすることにより、リピート伸長病を処置することができる。

【０３８５】

治療適応症

一部の実施形態では、本明細書に提供されるシステム又は方法を用いて、以下の表１２～１５のいずれかの適応症を処置することができる。例えば、一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、細胞内のゲノムＤＮＡ中の標的部位を修飾し、ここで、標的部位は、表１２～１５のいずれかの遺伝子中、例えば、表１２～１５のいずれかに列記される対応する適応症を有する対象中に存在する。一部の実施形態では、細胞は、肝細胞であり、且つ標的部位は、表１２の遺伝子中、例えば、表１２に列記される対応する適応症を有する対象中に存在する。一部の実施形態では、細胞は、造血幹細胞（ＨＳＣ）であり、且つ

標的部位は、表１３の遺伝子中、例えば、表１３に列記される対応する適応症を有する対象中に存在する。一部の実施形態では、細胞は、中枢神経系（ＣＮＳ）細胞であり、且つ標的部位は、表１４の遺伝子中、例えば、表１４に列記される対応する適応症を有する対象中に存在する。一部の実施形態では、細胞は、眼の細胞であり、且つ標的部位は、表１５の遺伝子中、例えば、表１５に列記される対応する適応症を有する対象中に存在する。一部の実施形態では、標的部位は、遺伝子のコード領域内に存在する。一部の実施形態では、標的部位は、プロモータ内に存在する。一部の実施形態では、標的部位は、表１２～１５のいずれかの遺伝子の５’ＵＴＲ又は３’ＵＴＲ内に存在する。一部の実施形態では、標的部位は、遺伝子のイントロン又はエクソン内に存在する。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、遺伝子中の突然変異を修正する。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、（例えば、疾患を引き起こす突然変異を通じて）遺伝子から欠失されていた配列を挿入する。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、（例えば、疾患を引き起こす突然変異を通じて）遺伝子中で重複されていた配列を欠失させる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、突然変異（例えば、疾患を引き起こす突然変異）を対応する野生型配列と置換する。一部の実施形態では、突然変異は、置換、挿入、欠失、又は逆位である。

【０３８６】

【表１２－１】

表 12: 例えば肝臓における適応症及び遺伝的標的

疾患	疾患遺伝子
急性間欠性ポルフィリン症	HMBS
α1 アンチトリプシン欠損症 (AAT)	SERPINA1
アルギナーゼ欠損症	ARG1
アルギニノコハク酸尿症	ASL
カルバモイルホスフェートシンテターゼ I 欠損症	CPS1
シトリン欠損症	SLC25A13
シトルリン血症 I 型	ASS1
クリグラー・ナジャー症候群 (高ビリルビン血症)	UGT1A1
ファブリー病	GLA
家族性高コレステロール血症 4 (ホモ接合性家族性コレステロール血症)	LDLRAP1
グルタル酸血症 I 型	GCDH
グルタル酸血症 II 型 (多種アシル CoA 脱水素酵素欠損症)	GA IIA: ETFA GA IIB: ETFB GA IIC: ETFDH
糖原病 IV 型	GBE1
血友病 A	F8
血友病 B	F9
遺伝性ヘモクロマトーシス	HFE
ホモシスチン尿症	CBS
メープルシロップ尿症 (MSUD)	Ia 型: BCKDHA Ib 型: BCKDHB II 型: DBT
メチルマロン酸血症 (メチルマロニル-CoA ムターゼ欠損症)	MMUT
MPS 1S (シャイエ症候群)	IDUA
MPS2	IDS
MPS3 (サンフィリッポ症候群)	IIIa 型: SGSH IIIb 型: NAGLU IIIc 型: HGSNAT IIId 型: GNS
MPS4	IVA 型: GALNS IVB 型: GLB1

【０３８７】

【表１２－２】

疾患	疾患遺伝子
MPS6	ARSB
MPS7	GUSB
オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC
フェニルケトン尿症 (フェニルアラニン水酸化酵素欠損症)	PAH
多嚢胞肝	PCLD1: PRKCSH PCLD2: SEC63 PLCD3: ALG8 PCLD4: LRP5
ポンペ病	GAA
原発性高シュウ酸尿症１型 (シュウ酸症)	AGXT
進行性家族性肝内胆汁うっ滞症１型	ATP8B1
進行性家族性肝内胆汁うっ滞症２型	ABCB11
進行性家族性肝内胆汁うっ滞症３型	ABCB4
プロピオン酸血症	PCCB; PCCA
ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損症	PC
高チロシン血症Ｉ型	FAH
ウィルソン病	ATP7B

【０３８８】

【表１３】

表 13: HSC における適応症及び遺伝的標的

疾患	疾患遺伝子
副腎白質ジストロフィー (CALD)	ABCD1
α マンノース症	MAN2B1
ブラックファン・ダイアモンド貧血	
先天性無巨核球性血小板減少症	MPL
先天性角化異常症	TERC
ファンコニ貧血	FANC
ゴーシェ病	GBA
グロボイド細胞白質ジストロフィー (クラッベ病)	GALC
血球貪食性リンパ組織球症	PRF1; STX11; STXBP2; UNC13D
悪性小児性大理石骨病-常染色体劣性大理石骨病	多くの遺伝子が関連する
異染性白質ジストロフィー	PSAP
MPS 1S (シャイエ症候群)	IDUA
MPS2	IDS
MPS7	GUSB
ムコリピドーシス II 型	GNPTAB
ニーマン・ピック病 A 型及び B 型	SMPD1
ニーマン・ピック病 C 型	NPC1
ポンペ病	GAA
ピルビン酸キナーゼ欠損症 (PKD)	PKLR
鎌状赤血球症 (SCD)	HBB
テイ・サックス病	HEXA
サラセミア	HBB

【０３８９】

【表１４】

表 14: CNS における適応症及び遺伝的標的

疾患	疾患遺伝子
αマンノース症	MAN2B1
血管拡張性失調症	ATM
CADASIL	NOTCH3
カナバン病	ASPA
カルバモイルホスフェートシンテターゼ 1 欠損症	CPS1
CLN1 病	PPT1
CLN2 病	TPP1
CLN3 病（若年型神経セロイドリポフスチン症、バッテン病）	CLN3
コフィン・ローリー症候群	RPS6KA3
先天性筋無力症候群 5 型	COLQ
コルネリア・デ・ランゲ症候群（NIPBL）	NIPBL
コルネリア・デ・ランゲ症候群（SMC1A）	SMC1A
ドラベ症候群（SCN1A）	SCN1A
グリシン脳症（GLDC）	GLDC
GM1 ガングリオシドーシス	GLB1
ハンチントン病	HTT
シルビウス水道狭窄を伴う水頭症	L1CAM
リー症候群	SURF1
異染性白質ジストロフィー（ARSA）	ARSA
ムコ多糖症 2 型	IDS
ムコ多糖症 3 型	3a 型: SGSH 3b 型: NAGLU
ムコリピドーシス IV 型	MCOLN1
神経線維腫症 1 型	NF1
神経線維腫症 2 型	NF2
パントテン酸キナーゼ関連神経変性症	PANK2
ピリドキシン依存性てんかん	ALDH7A1
レット症候群（MECP2）	MECP2
サンドホフ病	HEXB
意味性認知症（前頭側頭型認知症）	MAPT
軸索型ニューロパチーを伴う脊髄小脳失調症(眼球運動失行を伴う失調症)	SETX
テイ・サックス病	HEXA
X 連鎖副腎白質ジストロフィー	ABCD1

【０３９０】

【表１５】

表 15: 眼における適応症及び遺伝的標的

疾患	疾患遺伝子
色覚異常	CNGB3
先天性黒内障 (LCA1)	GUCY2D
先天性黒内障 (LCA10)	CEP290
先天性黒内障 (LCA2)	RPE65
先天性黒内障 (LCA8)	CRB1
全脈絡膜萎縮	CHM
錐体杆体ジストロフィー (ABCA4)	ABCA4
錐体杆体ジストロフィー (GUCY2D)	GUCY2D
シスチン症、眼性非腎症性	CTNS
Doyne 蜂巣状網膜ジストロフィー (DHRD)	EFEMP1
家族性眼軟膜アミロイドーシス	TTR
角膜炎・魚鱗癬・難聴 (KID)	GJB2
格子状角膜ジストロフィーI 型	TGFBI
斑状角膜ジストロフィー (MCD)	CHST6
メースマン角膜ジストロフィー	KRT12; KRT3
視神経萎縮症	OPA1
網膜色素変性症 (AR)	USH2A
網膜色素変性症 (AD)	RHO
ソースビー眼底変性症	TIMP3
シュタルガルト病	ABCA4

【０３９１】

植物への適用

一部の実施形態では、本明細書に提供されるシステム又は方法を用いて、例えば、植物の適応度を高めるために、植物又は植物部分（例えば、葉、根、花、果実若しくは種子）を修飾することができる。

【０３９２】

植物への送達

本明細書には、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを植物に送達する方法が提供される。植物、又はその部分を、遺伝子組換えシステムと接触させることにより、植物に遺伝子組換えシステムを送達する方法が含まれる。これらの方法は、例えば、植物の適応度を高める目的で、植物を修飾するために有用である。

【０３９３】

より具体的には、一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸（例えば、遺伝子組換えシステムをコードする核酸）は、ベクター内でコードされ得、例えば、植物ベクター（例えば、ｐＨＵＣ４１１）中の植物プロモータ、例えば、トウモロコシユビキチンプロ

モータ（ＺｍＵＢＩ）に隣接して挿入され得る。一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸は、アグロバクテリア（ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉａ）を介して、植物（例えば、ジャポニカ米（ｊａｐｏｎｉｃａ　ｒｉｃｅ））又は植物の一部（例えば、植物のカルス）に導入される。一部の実施形態では、植物遺伝子（例えば、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ（ＨＰＴ））をヌルアレル（例えば、開始コドンに塩基置換を含む）で置換することにより、本明細書に記載されるシステム及び方法を植物に使用することができる。植物ゲノムを修飾するためのシステム及び方法は、Ｘｕ　ｅｔ．ａｌ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　ｏｆ　ｐｌａｎｔ　ｐｒｉｍｅ－ｅｄｉｔｉｎｇ　ｓｙｓｔｅｍｓ　ｆｏｒ　ｐｒｅｃｉｓｅ　ｇｅｎｏｍｅ　ｅｄｉｔｉｎｇ，２０２０，Ｐｌａｎｔ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓに記載されている。

【０３９４】

一態様では、植物の適応度を高める方法が本明細書に提供され、この方法は、非処置の植物（例えば、遺伝子組換えシステムを送達されていない植物）と比較して、植物の適応度を高めるために、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを（例えば、有効な量及び期間で）植物に送達することを含む。

【０３９５】

遺伝子組換えシステムの送達の結果としての植物の適応度増大は、いくつかの方法で維持することができ、例えば、それにより、植物の生産改善、例えば、収率の向上、植物の成長力若しくは植物から収穫された産物の品質の向上、農業若しくは園芸に関して望ましいとみなされる収穫前後の特徴（例えば、味、外観、貯蔵寿命）の改善、又はそれ以外にヒトに有益な特徴改善（例えば、アレルゲン生成の低減）が達成される。植物の収率改善は、同じ条件下であるが、本組成物の適用なしで生産された植物の同じ産物の収率に対して又は従来の植物修飾剤の適用と比較して、測定可能な量による、植物の産物の収率の増加（例えば、植物バイオマス、穀粒、種子若しくは果実収率、タンパク質含量、炭水化物若しくは油含量又は葉面積により測定可能な）に関する。例えば、収率は、少なくとも約０．５％、約１％、約２％、約３％、約４％、約５％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約１００％、又は１００％超増加し得る。いくつかの事例では、本方法は、非処置植物と比較して、収率を約２倍、５倍、１０倍、２５倍、５０倍、７５倍、１００倍、又は１００倍超増加するのに有効である。収率は、植物の重量若しくは体積、又は何らかの基準に基づく植物の産物に関して表すことができる。基準は、時間、栽培面積、生産される植物の重量、又は使用される原材料の量に関して表すことができる。例えば、こうした方法は、限定されないが、種子、果実、穀粒、実、塊茎、根、及び葉などの植物組織の収率を増加し得る。

【０３９６】

遺伝子組換えシステムの送達の結果としての植物の適応度増大は、他の手段、例えば、同じ条件下であるが、本組成物の投与なしで、又は従来の植物修飾剤を適用して、生産された植物の産物の同じ要因と比較して、測定可能若しくは認識可能な量による、成長力評価、群落（面積単位当たりの植物の数）、植物の高さ、茎の状況、茎の長さ、葉の数、葉のサイズ、林冠、外観（例えば、濃い緑色の葉の色など）、根評価、出芽、タンパク質含量、分けつ増加、葉のサイズの増加、葉の増加、根出葉の減少、より強い新芽、必要な肥料の減少、必要な種子の減少、より生産性の高い新芽、より早い開花、より早い穀粒若しくは種子成熟、植物の傾き（ｖｅｒｓｅ）（倒伏）の減少、シュートの成長増大、より早期の発芽、又はこれらの要因の任意の組合せの増大若しくは改善によって測定することもできる。

【０３９７】

従って、本明細書には、植物を修飾する方法が提供され、この方法は、本明細書に提供される遺伝子組換えシステムのいずれかを有効な量で植物に送達することを含み、ここで、上記方法は、植物を修飾し、それにより、非処置植物と比較して、植物に有益な特徴を導入するか、又はそれを（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加する。

特に、本方法は、非処置植物と比較して、植物適応度を（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加し得る。

【０３９８】

いくつかの事例では、植物適応度の増加は、疾患耐性、干ばつ耐性、耐熱性、耐寒性、耐塩性、金属耐性、除草剤耐性、薬剤耐性、水使用効率、窒素利用、窒素ストレス耐性、窒素固定、害虫耐性、草食動物耐性、病原体耐性、収率、水制限条件下での収率、成長力、成長、光合成能力、栄養、タンパク質含量、炭水化物含量、油含量、バイオマス、シュート長さ、根長さ、根構造、種子重量、又は収穫可能な産物の量の（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％若しくは１００％超の）増加である。

【０３９９】

いくつかの事例では、適応度の増加は、発育、成長、収率、非生物ストレス源に対する耐性、又は生物ストレス源に対する耐性の（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％若しくは１００％超の）増加である。非生物ストレスは、植物又は植物部分が被る環境ストレス条件を指し、例えば、干ばつストレス、塩ストレス、熱ストレス、低温ストレス、及び低栄養ストレスが挙げられる。生物ストレスは、植物又は植物部分が被る環境ストレス条件を指し、例えば、線虫ストレス、草食昆虫ストレス、真菌病原体ストレス、細菌性病原体ストレス、又はウイルス病原体ストレスが挙げられる。ストレスは、一過性、例えば、数時間、数日、数ヶ月の場合もあれば、又は永続的、例えば、植物の寿命にわたる場合もある。

【０４００】

いくつかの事例では、植物適応度の増加は、植物から収穫される産物の品質の（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超の）増加である。例えば、植物適応度の増加は、植物から収穫される産物の商業的に好ましい特徴（例えば、味又は外観）の改善であり得る。他の事例では、植物適応度の増加は、植物から収穫される産物の貯蔵寿命の（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超の）増加である。

【０４０１】

代わりに、適応度の増加は、ヒト又は動物の健康に対して有益な特徴の改変、例えば、アレルゲン生成の低減であり得る。例えば、適応度の増加は、動物（例えば、ヒト）の免疫応答を刺激するアレルゲン（例えば、花粉）の生成の（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超の）低減であり得る。

【０４０２】

植物の修飾（例えば、適応度の増加）は、１つ又は複数の植物部分の修飾から起こり得る。例えば、植物は、植物の葉、種子、花粉、根、果実、シュート、花、細胞、プロトプラスト、又は組織（例えば、分裂組織）を接触させることにより、修飾することができる。従って、別の態様では、植物の適応度を増加する方法が本明細書に提供され、この方法は、有効量の本明細書における植物修飾組成物のいずれかと植物の花粉を接触させることを含み、この方法は、非処置植物と比較して、植物の適応度を（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加する。

【０４０３】

また別の態様では、植物の適応度を増加する方法が本明細書に提供され、この方法は、有効量の本明細書に開示の遺伝子組換えシステムのいずれかと植物の種子を接触させることを含み、この方法は、非処置植物と比較して、植物の適応度を（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加する。

【０４０４】
別の態様では、有効量の本明細書に記載の遺伝子組換えシステムのいずれかと植物のプロトプラストを接触させることを含む方法が本明細書に提供され、この方法は、非処置植物と比較して、植物の適応度を（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加する。
【０４０５】
更に別の態様では、植物の適応度を増加する方法が本明細書に提供され、この方法は、有効量の本明細書に記載の遺伝子組換えシステムのいずれかと植物の植物細胞を接触させることを含み、この方法は、非処置植物と比較して、植物の適応度を（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加する。
【０４０６】
別の態様では、植物の適応度を増加する方法が本明細書に提供され、この方法は、有効量の本明細書における植物修飾組成物のいずれかと植物の分裂組織を接触させることを含み、この方法は、非処置植物と比較して、植物の適応度を（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加する。
【０４０７】
別の態様では、植物の適応度を増加する方法が本明細書に提供され、この方法は、有効量の本明細書における植物修飾組成物のいずれかと植物の胚を接触させることを含み、この方法は、非処置植物と比較して、植物の適応度を（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加する。
【０４０８】
植物投与方法
本明細書に記載の植物は、組成物を植物に送達又は投与することを可能にする任意の好適な様式で、本明細書に記載の遺伝子組換えシステム組成物のいずれかに曝露することができる。遺伝子組換えシステムは、単独で、又は他の活性（例えば、肥料）若しくは非活性物質と組み合わせて送達され得、例えば有効濃度の植物修飾組成物を送達するために製剤化された濃縮液、ゲル、溶液、懸濁液、スプレー、粉末、ペレット、ブリケット、ブリックなどの形態において、噴霧、注入（例えば、マイクロインジェクション）、植物を媒介して注ぎ込み、浸漬することにより、適用することができる。本明細書に記載の組成物の適用のための量及び位置は、一般に、植物の生息地、植物修飾組成物により植物をターゲティングすることができる生活環段階、適用を実施しようとする部位並びに植物修飾組成物の物理的及び機能的特性により決定する。
【０４０９】
いくつかの事例では、組成物は、例えば、バックパック噴霧、空中噴霧、作物噴霧／散布などにより、植物、例えば、作物に直接噴霧する。遺伝子組換えシステムを植物に送達する場合、遺伝子組換えシステムを受ける植物は、植物成長の任意の段階であり得る。例えば、製剤化された植物修飾組成物を植物成長の早期段階で種子コーティング若しくは根処理として、又は作物サイクルの後期段階での全植物処理として適用することができる。いくつかの事例では、植物修飾組成物は、植物に対する局所薬剤として適用され得る。
【０４１０】
更に、遺伝子組換えシステムは、植物の組織を通して吸収及び分布される浸透性薬剤として（例えば、植物が成長する土壌に、又は植物の水遣りに使用する水に）適用され得る。いくつかの事例では、遺伝子組換えシステムを発現するように、植物又はえさ生物を遺伝子的に形質転換することもできる。
【０４１１】
また、溶解性若しくは生体内分解性コーティング層、例えば、ゼラチンで、遺伝子組換

えシステム又は植物修飾組成物を含む組成物をコーティングすることにより、遅延又は連続的放出を達成することも可能であり、上記のコーティングは、使用環境内で溶解又は分解し、その後、植物修飾システム位置が利用可能になるか、又は溶解性若しくは分解性マトリックス中に薬剤を分散することによっても達成することができる。こうした連続的放出及び／又は分散は、デバイスを有利に使用して、本明細書に記載の植物修飾組成物の１つ又は複数の有効濃度を一定に維持し得ることを意味する。

【０４１２】

いくつかの事例では、遺伝子組換えシステムを、植物の一部、例えば、その葉、種子、花粉、根、果実、シュート、若しくは花、若しくは組織、細胞又はプロトプラストに送達する。いくつかの事例では、遺伝子組換えシステムを、植物の細胞に送達する。いくつかの事例では、遺伝子組換えシステムを、植物のプロトプラストに送達する。いくつかの事例では、遺伝子組換えシステムを、植物の組織に送達する。例えば、植物の分裂組織（例えば、頂端分裂組織、側方分裂組織、又は介在分裂組織）に組成物を送達することもできる。いくつかの事例では、植物の永久組織（例えば、単組織（例えば、柔組織、厚角組織若しくは厚膜組織）又は複合永久組織（例えば、木部若しくは師部））に組成物を送達する。いくつかの事例では、植物胚に遺伝子組換えシステムを送達する。

【０４１３】

植物

本明細書に記載の遺伝子組換えシステムで処置するために、多様な植物に送達することができる。本方法に従って遺伝子組換えシステムを送達する（すなわち、「処置する」）ことができる植物は、全植物及び植物部分を含み、そうしたものとして、限定されないが、シュート栄養器官／構造（例えば、葉、茎及び塊茎）、根、花及び花器官／構造（例えば、苞葉、萼片、花弁、雄蕊、心皮、葯及び胚珠）、種子（胚、胚乳、子葉、及び種皮を含む）並びに果実（成熟卵胞）、植物組織（例えば、維管束組織、基本組織など）並びに細胞（例えば、孔辺細胞、卵細胞など）並びにそれらの子孫が挙げられる。植物部分は、更に、シュート、根、茎、種子、托葉、葉、花弁、花、胚珠、苞葉、枝、葉柄、節間、樹皮、軟毛、新芽、根茎、葉状体、（イネ科植物の）葉、花粉、雄蕊などの植物の部分も指す。

【０４１４】

本明細書に開示される方法で処置することができる植物のクラスは、高等及び下等植物のクラスを含み、被子植物（単子葉及び双子葉植物）、裸子植物、シダ、ツクシ、古生マツバラン（ｐｓｉｌｏｐｈｙｔｅ）、小葉植物、コケ植物、及び藻類（例えば、多細胞又は単細胞藻類）が挙げられる。本方法に従って処置することができる植物は更に、任意の維管束植物、例えば、単子葉若しくは双子葉植物、又は裸子植物を含み、限定されないが、以下のものが挙げられる：アルファルファ、リンゴ、シロイヌナズナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）、バナナ、カノーラ、トウゴマ、キク、クローバー、カカオ、コーヒー、綿、綿実、トウモロコシ、ハマナ（ｃｒａｍｂｅ）、クランベリー、キュウリ、デンドロビウム（ｄｅｎｄｒｏｂｉｕｍ）、ヤマノイモ、ユーカリ、ウシノケグサ、亜麻、グラジオラス、リリアセア（ｌｉｌｉａｃｅａ）、亜麻仁、キビ、マスクメロン、カラシ、オートムギ、アブラヤシ、アブラナ、ピーナッツ、パイナップル、観賞植物、インゲンマメ（Ｐｈａｓｅｏｌｕｓ）、ジャガイモ、ナタネ、コメ、ライムギ、ライグラス、サフラワー、ゴマ、モロコシ、ダイズ、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ、イチゴ、タバコ、トマト、シバ、コムギ並びにレタス、セロリ、ブロッコリー、カリフラワー、ウリ科植物（ｃｕｃｕｒｂｉｓ）などの野菜作物；リンゴ、ナシ、モモ、オレンジ、グレープフルーツ、レモン、ライム、アーモンド、ペカン、クルミ、ヘーゼルなどの果実及び堅果樹；ブドウ（例えば、ブドウ園）、キーウィ、ホップなどのつる植物；ラズベリー、ブラックベリー、グーズベリーなどの果実低木及びブランブル；トネリコ、マツ、モミ、カエデ、オーク、クリ、ポプラなどの森林樹；並びにアルファルファ、カノーラ、トウゴマ、トウモロコシ、綿、ハマナ（ｃｒａｍｂｅ）、亜麻、亜麻仁、カラシ、アブラヤシ、アブラナ、ピーナッツ、ジャガイモ、コメ、サフラワー、ゴマ、ダイズ、テンサイ、ヒマワリ、タバコ、トマト

、及びコムギ。本明細書に開示される方法に従って処置することができる植物は、あらゆる作物植物、例えば、飼料作物、油糧種子作物、穀粒作物、果物作物、野菜作物、繊維作物、香辛料作物、ナッツ作物、芝土作物、糖料作物、飲料作物、及び森林作物を含む。特定の事例では、本方法で処置される作物植物は、ダイズ植物である。他の特定の事例では、作物植物は、コムギである。他の特定の事例では、作物植物は、トウモロコシである。他の特定の事例では、作物植物は、綿である。特定の事例では、作物植物は、アルファルファである。特定の事例では、作物植物は、テンサイである。特定の事例では、作物植物は、コメである。特定の事例では、作物植物は、ジャガイモである。特定の事例では、作物植物は、トマトである。

【０４１５】

特定の事例では、植物は、作物である。こうした作物植物の例として、限定されないが、単子葉及び双子葉植物が挙げられ、限定されないが、下記のものから選択される飼料若しくは飼い葉用マメ科植物、観賞植物、食用作物、樹木、又は低木を含む：カエデ属種（Ａｃｅｒ　ｓｐｐ．）、アリウム属種（Ａｌｌｉｕｍ　ｓｐｐ．）、アマランサス属種（Ａｍａｒａｎｔｈｕｓ　ｓｐｐ．）、パイナップル（Ａｎａｎａｓ　ｃｏｍｏｓｕｓ）、セロリ（Ａｐｉｕｍ　ｇｒａｖｅｏｌｅｎｓ）、ラッカセイ属種（Ａｒａｃｈｉｓ　ｓｐｐ）、アスパラガス（Ａｓｐａｒａｇｕｓ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ）、サトウダイコン（Ｂｅｔａ　ｖｕｌｇａｒｉｓ）、アブラナ属種（Ｂｒａｓｓｉｃａ　ｓｐｐ．）（例えば、セイヨウアブラナ（Ｂｒａｓｓｉｃａ　ｎａｐｕｓ）、ブラッシカ・ラパ種（Ｂｒａｓｓｉｃａ　ｒａｐａ　ｓｓｐ．）（カノーラ、アブラナ（ｏｉｌｓｅｅｄ　ｒａｐｅ）、ナバナ（ｔｕｒｎｉｐ　ｒａｐｅ））、カメリア・シネンシス（Ｃａｍｅｌｌｉａ　ｓｉｎｅｎｓｉｓ）、ダンドク（Ｃａｎｎａ　ｉｎｄｉｃａ）、アサ（Ｃａｎｎａｂｉｓ　ｓａｌｉｖａ）、トウガラシ属種（Ｃａｐｓｉｃｕｍ　ｓｐｐ．）、クリ属種（Ｃａｓｔａｎｅａ　ｓｐｐ．）、エンダイブ（Ｃｉｃｈｏｒｉｕｍ　ｅｎｄｉｖｉａ）、スイカ（Ｃｉｔｒｕｌｌｕｓ　ｌａｎａｔｕｓ）、シトラス属種（Ｃｉｔｒｕｓ　ｓｐｐ．）、ココス属種（Ｃｏｃｏｓ　ｓｐｐ．）、コーヒーノキ属種（Ｃｏｆｆｅａ　ｓｐｐ．）、コリアンダー（Ｃｏｒｉａｎｄｒｕｍ　ｓａｔｉｖｕｍ）、ハシバミ属種（Ｃｏｒｙｌｕｓ　ｓｐｐ．）、クラタエグス属種（Ｃｒａｔａｅｇｕｓ　ｓｐｐ．）、カボチャ属種（Ｃｕｃｕｒｂｉｔａ　ｓｐｐ．）、ククミス属種（Ｃｕｃｕｍｉｓ　ｓｐｐ．）、ニンジン（Ｄａｕｃｕｓ　ｃａｒｏｔａ）、ブナ属種（Ｆａｇｕｓ　ｓｐｐ．）、イチジク（Ｆｉｃｕｓ　ｃａｒｉｃａ）、フラガリア属種（Ｆｒａｇａｒｉａ　ｓｐｐ．）、イチョウ（Ｇｉｎｋｇｏ　ｂｉｌｏｂａ）、ダイズ属種（Ｇｌｙｃｉｎｅ　ｓｐｐ．）（例えば、グリシン・マックス（Ｇｌｙｃｉｎｅ　ｍａｘ）、ソーヤ・ヒスピダ（Ｓｏｊａ　ｈｉｓｐｉｄａ）若しくはソーヤ・マックス（Ｓｏｊａ　ｍａｘ））、リクチワタ（Ｇｏｓｓｙｐｉｕｍ　ｈｉｒｓｕｔｕｍ）、ヒマワリ属種（Ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ　ｓｐｐ．）（例えば、ヒマワリ（Ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ　ａｎｎｕｕｓ））、ハイビスカス属種（Ｈｉｂｉｓｃｕｓ　ｓｐｐ．）、オオムギ属種（Ｈｏｒｄｅｕｍ　ｓｐｐ．）（例えば、オオムギ（Ｈｏｒｄｅｕｍ　ｖｕｌｇａｒｅ））、サツマイモ（Ｉｐｏｍｏｅａ　ｂａｔａｔａｓ）、クルミ属種（Ｊｕｇｌａｎｓ　ｓｐｐ．）、レタス（Ｌａｃｔｕｃａ　ｓａｔｉｖａ）、アマ（Ｌｉｎｕｍ　ｕｓｉｔａｔｉｓｓｉｍｕｍ）、レイシ（Ｌｉｔｃｈｉ　ｃｈｉｎｅｎｓｉｓ）、ミヤコグサ属種（Ｌｏｔｕｓ　ｓｐｐ．）、トカドヘチマ（Ｌｕｆｆａ　ａｃｕｔａｎｇｕｌａ）、ルピナス属種（Ｌｕｐｉｎｕｓ　ｓｐｐ．）、トマト属種（Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ　ｓｐｐ．）（例えば、トマト（Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ　ｅｓｃｕｌｅｎｔｕｒｎ）、リコペルシコン・リコペルシカム（Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ　ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｕｍ）、リコペルシコン・ピリフォルメ（Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ　ｐｙｒｉｆｏｒｍｅ））、リンゴ属種（Ｍａｌｕｓ　ｓｐｐ．）、ムラサキウマゴヤシ（Ｍｅｄｉｃａｇｏ　ｓａｔｉｖａ）、ハッカ属種（Ｍｅｎｔｈａ　ｓｐｐ．）、ススキ（Ｍｉｓｃａｎｔｈｕｓ　ｓｉｎｅｎｓｉｓ）、クロミグワ（Ｍｏｒｕｓ　ｎｉｇｒａ）、バショウ種種（Ｍｕｓａ　ｓｐｐ．）、タバコ属種（Ｎｉｃｏｔｉａｎａ　ｓｐｐ．）、オリーブ属種（Ｏｌｅａ　ｓｐｐ．）、オリザ属種（Ｏｒｙｚａ　ｓｐｐ．）（例え

ば、イネ（Ｏｒｙｚａ ｓａｔｉｖａ）、オリザ・ラティフォリア（Ｏｒｙｚａ ｌａｔｉｆｏｌｉａ））、キビ（Ｐａｎｉｃｕｍ ｍｉｌｉａｃｅｕｍ）、スイッチグラス（Ｐａｎｉｃｕｍ ｖｉｒｇａｔｕｍ）、パッションフルーツ（Ｐａｓｓｉｆｌｏｒａ ｅｄｕｌｉｓ）、イタリアンパセリ（Ｐｅｔｒｏｓｅｌｉｎｕｍ ｃｒｉｓｐｕｍ）、インゲンマメ属種（Ｐｈａｓｅｏｌｕｓ ｓｐｐ．）、マツ属種（Ｐｉｎｕｓ ｓｐｐ．）、ピスタチオ（Ｐｉｓｔａｃｉａ ｖｅｒａ）、エンドウ属種（Ｐｉｓｕｍ ｓｐｐ．）、イチゴツナギ属種（Ｐｏａ ｓｐｐ．）、ハコヤナギ属種（Ｐｏｐｕｌｕｓ ｓｐｐ．）、サクラ属種（Ｐｒｕｎｕｓ ｓｐｐ．）、セイヨウナシ（Ｐｙｒｕｓ ｃｏｍｍｕｎｉｓ）、コナラ属種（Ｑｕｅｒｃｕｓ ｓｐｐ．）、ラディッシュ（Ｒａｐｈａｎｕｓ ｓａｔｉｖｕｓ）、ショクヨウダイオウ（Ｒｈｅｕｍ ｒｈａｂａｒｂａｒｕｍ）、スグリ属種（Ｒｉｂｅｓ ｓｐｐ．）、トウゴマ（Ｒｉｃｉｎｕｓ ｃｏｍｍｕｎｉｓ）、キイチゴ属種（Ｒｕｂｕｓ ｓｐｐ．）、サトウキビ属種（Ｓａｃｃｈａｒｕｍ ｓｐｐ．）、ヤナギ属種（Ｓａｌｉｘ ｓｐ．）、ニワトコ属種（Ｓａｍｂｕｃｕｓ ｓｐｐ．）、ライムギ（Ｓｅｃａｌｅ ｃｅｒｅａｌｅ）、ゴマ属種（Ｓｅｓａｍｕｍ ｓｐｐ．）、シナピス属種（Ｓｉｎａｐｉｓ ｓｐｐ．）、ナス属種（Ｓｏｌａｎｕｍ ｓｐｐ．）（例えば、ジャガイモ（Ｓｏｌａｎｕｍ ｔｕｂｅｒｏｓｕｍ）、ヒラナス（Ｓｏｌａｎｕｍ ｉｎｔｅｇｒｉｆｏｌｉｕｍ）若しくはトマト（Ｓｏｌａｎｕｍ ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｕｍ））、モロコシ（Ｓｏｒｇｈｕｍ ｂｉｃｏｌｏｒ）、セイバンモロコシ（Ｓｏｒｇｈｕｍ ｈａｌｅｐｅｎｓｅ）、ホウレンソウ属種（Ｓｐｉｎａｃｉａ ｓｐｐ．）、タマリンディス・インディカ（Ｔａｍａｒｉｎｄｕｓ ｉｎｄｉｃａ）、テオブロマ・カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ ｃａｃａｏ）、トリフォリウム属種（Ｔｒｉｆｏｌｉｕｍ ｓｐｐ．）、トリチコセケル・リンパウイ（Ｔｒｉｔｉｃｏｓｅｃａｌｅ ｒｉｍｐａｕｉ）、コムギ属種（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ｓｐｐ．）（例えば、コムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ａｅｓｔｉｖｕｍ）、デュラムコムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ｄｕｒｕｍ）、ベットコムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ｔｕｒｇｉｄｕｍ）、トリチカム・ヒベルナム（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ｈｙｂｅｒｎｕｍ）、トリチカム・マチャ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ｍａｃｈａ）、トリチカム・サチバム（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ｓａｔｉｖｕｍ）若しくはリチカム・ブルガレ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ｖｕｌｇａｒｅ））、スノキ属種（Ｖａｃｃｉｎｉｕｍ ｓｐｐ．）、ソラマメ属種（Ｖｉｃｉａ ｓｐｐ．）、ササゲ属種（Ｖｉｇｎａ ｓｐｐ．）、ニオイスミレ（Ｖｉｏｌａ ｏｄｏｒａｔａ）、ブドウ属種（Ｖｉｔｉｓ ｓｐｐ．）並びにトウモロコシ（Ｚｅａ ｍａｙｓ）。特定の実施形態では、作物植物は、コメ、アブラナ、カノーラ、ダイズ、トウモロコシ（トウモロコシ）、綿、サトウキビ、アルファルファ、モロコシ、又はコムギである。

【０４１６】

本発明で使用される植物又は植物部分は、植物発育のあらゆる段階の植物を含む。特定の事例では、送達は、発芽、苗成長、栄養成長、及び生殖成長の段階中に行うことができる。特定の事例では、植物への送達は、栄養及び生直成長段階の間に行う。いくつかの事例では、組成物は、植物の花粉に送達する。いくつかの事例では、植物の種子に組成物を送達する。いくつかの事例では、植物のプロトプラストに組成物を送達する。いくつかの事例では、植物の組織に組成物を送達する。例えば、植物の分裂組織（例えば、頂端分裂組織、側方分裂組織、又は介在分裂組織）に組成物を送達することもできる。いくつかの事例では、植物の永久組織（例えば、単組織（例えば、柔組織、厚角組織若しくは厚膜組織）又は複合永久組織（例えば、木部若しくは師部））に組成物を送達する。いくつかの事例では、植物胚に組成物を送達する。いくつかの事例では、植物細胞に組成物を送達する。栄養及び生殖成長の段階は、本明細書において、「成体」又は「成熟」植物とも呼ばれる。

【０４１７】

遺伝子組換えシステムを植物部分に送達する事例では、植物修飾剤により植物部分を修飾し得る。代わりに、遺伝子組換えシステムを植物の他の部分に分布させ（例えば、植物の循環系によって）、その後、それらの部分を植物修飾剤により修飾する。

【０４１８】
投与及び送達
本明細書に記載される組成物及びシステムは、インビトロ又はインビボで使用され得る。一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、例えば、インビトロ又はインビボで細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞）に送達される。一部の実施形態では、細胞は、真核細胞、例えば、多細胞生物、例えば、植物又は動物、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ブタ、ウシ）、鳥類（例えば、家禽類、例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、又はアヒル）、又は魚類の細胞である。一部の実施形態では、細胞は、非ヒト動物細胞（例えば、実験動物、家畜動物、又はコンパニオンアニマル）である。一部の実施形態では、細胞は、幹細胞（例えば、造血幹細胞）、線維芽細胞、又はＴ細胞である。一部の実施形態では、細胞は、免疫細胞、例えば、Ｔ細胞（例えば、Ｔｒｅｇ、ＣＤ４、ＣＤ８、γδ、又はメモリーＴ細胞）、Ｂ細胞（例えば、メモリーＢ細胞又は形質細胞）、又はＮＫ細胞である。一部の実施形態では、細胞は、非分裂細胞、例えば、非分裂線維芽細胞又は非分裂Ｔ細胞である。一部の実施形態では、細胞は、ＨＳＣであり、ｐ５３は上方制御されないか、又は例えば、ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０４８６０７号明細書の実施例３０に記載の方法に従って決定されるように、１０％、５％、２％、又は１％未満上方制御される。当業者は、遺伝子組換えシステムの成分が、ポリペプチド、核酸（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ）、及びそれらの組合せの形態で送達され得ることが理解されるであろう。
【０４１９】
一実施形態では、システム及び／又はシステムの成分は、核酸として送達される。例えば、遺伝子組換えポリペプチドは、ポリペプチドをコードするＤＮＡ又はＲＮＡの形態で送達され得、鋳型ＲＮＡは、ＲＮＡ又はＲＮＡに転写されるその相補的ＤＮＡの形態で送達され得る。一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、１、２、３、４、又はそれ以上の個別の核酸分子上で送達される。一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、ＤＮＡ及びＲＮＡの組合せとして送達される。一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、ＤＮＡ及びタンパク質の組合せとして送達される。一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、ＲＮＡ及びタンパク質の組合せとして送達される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、タンパク質として送達される。
【０４２０】
一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、ベクターを用いて、細胞、例えば哺乳動物細胞又はヒト細胞に送達される。ベクターは、例えば、プラスミド又はウイルスであり得る。一部の実施形態では、送達は、インビボ、インビトロ、エクスビボ、又はインサイチュである。一部の実施形態では、ウイルスは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レンチウイルス、又はアデノウイルスである。一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、ウイルス様粒子又はビロソームを用いて細胞に送達される。一部の実施形態では、送達は、２つ以上のウイルス、ウイルス様粒子又はビロソームを使用する。
【０４２１】
一実施形態では、本明細書に記載される組成物及びシステムは、リポソーム又は他の類似の小胞中に製剤化することができる。リポソームは、内部水性コンパートメントを取り囲む単層又は多重層脂質二重膜と、及び比較的不透過性の外側親油性リン脂質二重膜から構成される球状の小胞構造である。リポソームは、アニオン性、中性又はカチオン性であり得る。リポソームは、生体適合性、非毒性であり、親水性及び親油性薬物分子の両方を送達し、それらのカーゴをプラズマ酵素による分解から保護すると共に、それらのロードを生体膜及び血液脳関門（ＢＢＢ）を介して輸送することができる（例えば、論評については、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照）。
【０４２２】
小胞は、いくつかの異なるタイプの脂質から製造することができるが；薬物担体として

リポソームを作製するためにはリン脂質が最も一般的に使用される。多重層小胞脂質の調製方法は、当技術分野で公知である（例えば、米国特許第６，６９３，０８６号明細書を参照、多重層小胞脂質の調製に関するその教示内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。脂質膜を水溶液と混合すれば、小胞形成は自然に起こり得るが、ホモジナイザー、超音波発生装置、又は押出機を用いて振盪の形態で力を加えることにより、それを促進することもできる（例えば、論評については、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照）。押出脂質は、Ｔｅｍｐｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ，１５：６４７－６５２，１９９７（押出脂質調製に関するその教示内容は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、サイズ漸減フィルターを介した押出により調製することができる。

【０４２３】

リポソーム、脂質ナノ粒子、カチオン性脂質ナノ粒子、イオン化可能な脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、金ナノ粒子、デンドリマー、シクロデキストリンナノ粒子、ミセル、又は前述の組み合わせなどの、様々なナノ粒子を送達に使用できる。

【０４２４】

脂質ナノ粒子は、本明細書に記載される医薬組成物のための生体適合性及び生分解性送達系を提供する担体の一例である。ナノ構造脂質担体（ＮＬＣ）は、ＳＬＮの特徴を保持し、薬物安定性及び負荷容量を向上させると共に、薬物漏出を防ぐ、修飾固体脂質ナノ粒子（ＳＬＮ）である。ポリマーナノ粒子（ＰＮＰ）は、薬物送達の重要な成分である。これらのナノ粒子は、特定の標的に対して薬物送達を効果的に指向し、薬物安定性及び薬物放出制御を改善することができる。脂質－ポリマーナノ粒子（ＰＬＮ）、すなわちリポソーム及びポリマーを組み合わせたタイプの担体も使用し得る。これらのナノ粒子は、ＰＮＰ及びリポソームの相補的利点を有する。ＰＬＮは、コア－シェル構造から構成され；ポリマーコアは、安定した構造を提供し、リン脂質シェルは良好な生体適合性を賦与する。このように、２つの成分は、薬物封入効率を高め、表面修飾を促進すると共に、水溶性薬物の漏出を防ぐ。例えば、論評については、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．２０１７，Ｎａｎｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ７，１２２；ｄｏｉ：１０．３３９０／ｎａｎｏ７０６０１２２を参照されたい。

【０４２５】

本明細書に記載される組成物及びシステム用の薬物送達ビヒクルとしてエクソソームを使用することもできる。論評については、Ｈａ ｅｔ ａｌ．Ｊｕｌｙ ２０１６．Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａ Ｓｉｎｉｃａ Ｂ．Ｖｏｌｕｍｅ ６，Ｉｓｓｕｅ ４，Ｐａｇｅｓ ２８７－２９６；ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ａｐｓｂ．２０１６．０２．００１を参照されたい。

【０４２６】

フソソームは、標的細胞と相互作用して、それと融合することから、様々な分子の送達ビヒクルとして用いることができる。フソソームは、一般に、管腔又は空洞を封入する両親媒性脂質の二重層及び両親媒性脂質二重層と相互作用するフソゲンからなる。フソゲン成分は、融合及びペイロード送達のための標的細胞特異性を付与し、プログラム可能な細胞特異性を備える送達ビヒクルの作製を可能にするために操作可能であることが示されている（例えば国際公開第２０２００１４２０９号パンフレットを参照されたい。フソソーム設計、調製、及び使用に関するその教示は、参照により本明細書に組み込まれる）。

【０４２７】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムのタンパク質成分は、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）と事前に結合され得る。例えば、一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドを初めに鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）と組み合わせて、リボヌクレオタンパク質（ＲＮＰ）複合体を形成し得る。一部の実施形態では、ＲＮＰは、例えば、トランスフェクション、ヌクレオフェクション、ウイルス、小胞、ＬＮＰ、エクソソーム、フソソー

ムを介して、細胞に送達され得る。
【０４２８】
遺伝子組換えシステムは、細胞、組織及び多細胞生物に導入され得る。一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、機械的手段又は物理的手段を用いて、細胞に送達される。
【０４２９】
タンパク質治療薬の製剤化は、Ｍｅｙｅｒ（Ｅｄ．），Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｒｕｇ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ：Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ ｔｏ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，ａｎｄ ｔｈｅ Ｃｌｉｎｉｃ，Ｗｏｏｄｈｅａｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｓｅｒｉｅｓ（２０１２）に記載されている。
【０４３０】
組織特異的活性／投与
一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステムは、オフターゲット細胞又は組織において活性を制限するために、１つ又は複数の特徴（例えば、プロモータ又はｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位）を利用することができる。
【０４３１】
一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ又は鋳型ＲＮＡをコードするＤＮＡ）は、プロモータ配列、例えば、組織特異的プロモータ配列を含む。一部の実施形態では、組織特異的プロモータを用いて、遺伝子組換えシステムの標的細胞特異性を増加させる。例えば、プロモータは、標的細胞型において活性があるが、非標的細胞型において活性がない（又はより低いレベルで活性がある）ことに基づいて選択され得る。従って、プロモータが非標的細胞のゲノムに組み込まれても、それは、組み込まれた遺伝子の発現を駆動することはない（又は低レベルの発現を駆動するに過ぎない）。更に、鋳型ＲＮＡ中に組織特異的プロモータ配列を有するシステムは、例えば、本明細書に記載のように、例えば、鋳型ＲＮＡ又は遺伝子組換えタンパク質をコードする核酸において、ｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位と組み合わせて使用され得る。鋳型ＲＮＡ中に組織特異的プロモータ配列を有するシステムは、例えば、標的細胞内で、非標的細胞内よりも高いレベルの遺伝子組換えタンパク質を得るため、組織特異的プロモータによって駆動される、遺伝子組換えポリペプチドをコードするＤＮＡと組み合わせても使用され得る。一部の実施形態では、例えば、肝臓の適応症の場合、組織特異的プロモータは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０２００１４２０９号パンフレットの表３から選択される。
【０４３２】
一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ又は鋳型ＲＮＡをコードするＤＮＡ）は、ｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位を含む。一部の実施形態では、ｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位を用いて、遺伝子組換えシステムの標的細胞特異性を増加させる。例えば、ｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位は、非標的細胞型内に存在するが、標的細胞型内に存在しない（又は非標的細胞と比較して低下したレベルで存在する）ｍｉＲＮＡによって認識されることに基づいて選択され得る。従って、鋳型ＲＮＡが非標的細胞内に存在する場合、それはｍｉＲＮＡによって結合されることになり、鋳型ＲＮＡが標的細胞内に存在する場合、それはｍｉＲＮＡによって結合されない（又は専ら非標的細胞と比較して低下したレベルで結合される）ことになる。特定の理論に束縛されることを意図しないが、ｍｉＲＮＡの鋳型ＲＮＡへの結合は、その活性に干渉することがあり、例えば、異種目的配列のゲノムへの挿入に干渉することがある。従って、このシステムであれば、標的細胞のゲノムを、それが非標的細胞のゲノムを編集する場合よりも効率的に編集することになり、例えば、異種目的配列であれば、標的細胞のゲノムに、非標的細胞のゲノムに挿入されるよりも効率的に挿入されることになり、又は挿入若しくは欠失は、標的細胞において、非標的細胞におけるよりも効率的に生成される。更に、鋳型ＲＮＡ（又はそれをコードするＤＮＡ）中にｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位を有するシステムは、遺伝子組換えポリペプチド

をコードする核酸と組み合わせて使用され得、ここで、遺伝子組換えポリペプチドの発現は、例えば、本明細書に記載されるように、第２のｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位によって調節される。一部の実施形態では、例えば、肝臓の適応症の場合、ｍｉＲＮＡは、国際公開第２０２００１４２０９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の表４から選択される。

【０４３３】

一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、ｍｉｃｒｏＲＮＡ配列、ｓｉＲＮＡ配列、ガイドＲＮＡ配列、又はｐｉｗｉ　ＲＮＡ配列を含む。

【０４３４】

プロモータ

一部の実施形態では、１つ若しくは複数のプロモータ又はエンハンサーを、遺伝子組換えタンパク質をコードする核酸、又は例えば、異種目的配列の発現を制御する鋳型核酸と作動可能に連結する。特定の実施形態では、１つ若しくは複数のプロモータ又はエンハンサーは、細胞型若しくは組織特異的エレメントを含む。一部の実施形態では、プロモータ又はエンハンサーは、同じであるか、又は異種目的配列の発現を天然で制御するプロモータ若しくはエンハンサーに由来する。例えば、オルニチントランスカルボミラーゼプロモータ及びエンハンサーを用いて、オルニチントランスカルボミラーゼ欠失を補正するために本発明により提供されるシステム若しくは方法におけるオルニチントランスカルボミラーゼ遺伝子の発現を制御することができる。一部の実施形態では、プロモータは、表１６又は１７のプロモータ又はその機能性断片若しくは変異体である。

【０４３５】

市販されている例示的な組織特異的プロモータは、例えば、ＵＲＬ（例えば、ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ．ｃｏｍ／ｔｉｓｓｕｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ－ｐｒｏｍｏｔｅｒｓ）に見出すことができる。一部の実施形態では、プロモータは、ネイティブプロモータ又は最小プロモータ（例えば、所与の遺伝子の５’領域からの単一断片から構成されるもの）である。一部の実施形態では、ネイティブプロモータは、コアプロモータとその天然の５’ＵＴＲを含む。一部の実施形態では、５’ＵＴＲは、イントロンを含む。他の実施形態では、これらは、起源の異なるプロモータを組み合わせるか、又は同じ起源の最小プロモータと共に遠位エンハンサーをアセンブリングすることにより作製された複合プロモータを含む。

【０４３６】

例示的な細胞又は組織特異的プロモータを以下の表に記載し、それらをコードする例示的な核酸は、当技術分野で公知であり、様々なリソース、例えば、ＲｅｆＳｅｑ．を含むＮＣＢＩデータベース並びにＥｕｋａｒｙｏｔｉｃ　Ｐｒｏｍｏｔｅｒ　Ｄａｔａｂａｓｅ（／／ｅｐｄ．ｅｐｆｌ．ｃｈ／／ｉｎｄｅｘ．ｐｈｐ）を用いて、容易に入手することができる。

【０４３７】

【表１６】

表 16. 例示的な細胞又は組織特異的プロモータ

プロモータ	標的細胞
B29 プロモータ	B 細胞
CD14 プロモータ	単球性細胞
CD43 プロモータ	白血球及び血小板
CD45 プロモータ	造血細胞
CD68 プロモータ	マクロファージ
デスミンプロモータ	筋肉細胞
エラスターゼ-1 プロモータ	膵腺房細胞
エンドグリンプロモータ	内皮細胞
フィブロネクチンプロモータ	分化細胞、治癒再生組織
Flt-1 プロモータ	内皮細胞
GFAP プロモータ	星状膠細胞
GPIIB プロモータ	巨核球
ICAM-2 プロモータ	内皮細胞
INF-β プロモータ	造血細胞
Mb プロモータ	筋肉細胞
Nphs1 プロモータ	ポドサイト
OG-2 プロモータ	骨芽細胞、象牙芽細胞(Odonblasts)
SP-B プロモータ	肺
Syn1 プロモータ	ニューロン
WASP プロモータ	造血細胞
SV40/bAlb プロモータ	肝臓
SV40/bAlb プロモータ	肝臓
SV40/Cd3 プロモータ	白血球及び血小板
SV40/CD45 プロモータ	造血細胞
NSE/RU5'プロモータ	成熟ニューロン

【０４３８】

【表１７－１】

表 17.更なる例示的な細胞又は組織特異的プロモータ

プロモータ	遺伝子記述	遺伝子特異性
APOA2	アポリポタンパク質 A-II	肝細胞 (肝細胞前駆体由来)
SERPINA1 (hAAT)	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレード A (α1 抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン)、メンバー1 (別名:α1 アンチトリプシン)	肝細胞 (胚体内胚葉期からの)
CYP3A	チトクロム P450、ファミリー3、サブファミリーA、ポリペプチド	成熟肝細胞
MIR122	MicroRNA 122	肝細胞 (初期胚性肝細胞由来) 及び内胚葉
膵臓特異的プロモータ		
プロモータ	**遺伝子記述**	**遺伝子特異性**
INS	インスリン	膵 β 細胞 (胚体内胚葉期からの)
IRS2	インスリン受容体基質 2	膵 β 細胞
Pdx1	膵臓及び十二指腸ホメオボックス 1	膵臓 (胚体内胚葉期からの)
Alx3	アリスタレス(Aristaless)様ホメオボックス 3	膵 β 細胞 (胚体内胚葉期からの)
Ppy	膵ポリペプチド	PP 膵細胞 (ガンマ細胞)
心臓特異的プロモータ		
プロモータ	**遺伝子記述**	**遺伝子特異性**
Myh6 (aMHC)	ミオシン、重鎖 6、心筋、α	心筋細胞の後期分化マーカ (心房特異性)
MYL2 (MLC-2v)	ミオシン、軽鎖 2、調節、心臓、低速	心筋細胞の後期分化マーカ (心室特異性)
ITNNI3 (cTnI)	トロポニン I タイプ 3 (心臓)	心筋細胞 (未成熟な状態からの)
ITNNI3 (cTnI)	トロポニン I タイプ 3 (心臓)	心筋細胞 (未成熟な状態からの)

【０４３９】

【表１７－２】

プロモータ	遺伝子記述	遺伝子特異性
NPPA (ANF)	ナトリウム利尿ペプチド前駆体 A (別名:心房性ナトリウム利尿因子)	成体細胞における心房特異性
Slc8a1 (Ncx1)	溶質キャリアファミリー8 (ナトリウム/カルシウム交換体)、メンバー1	初期発生段階由来の心筋細胞
CNS 特異的プロモータ		
SYN1 (hSyn)	シナプシン I	ニューロン
GFAP	グリア線維酸性タンパク質	星状膠細胞
INA	インターネキシンニューロン中間径フィラメントタンパク質、α (a-インターネキシン)	神経前駆細胞
NES	ネスチン	神経前駆細胞及び外肺葉
MOBP	ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質	オリゴデンドロサイト
MBP	ミエリン塩基性タンパク質	オリゴデンドロサイト
TH	チロシンヒドロキシラーゼ	ドーパミン作動性ニューロン
FOXA2 (HNF3β)	フォークヘッドボックス A2	ドーパミン作動性ニューロン (内肺葉のマーカとしても使用される)
皮膚特異的プロモータ		
プロモータ	**遺伝子記述**	**遺伝子特異性**
FLG	フィラグリン	顆粒層由来のケラチノサイト
K14	ケラチン 14	顆粒層及び基底層由来のケラチノサイト
TGM3	トランスグルタミナーゼ 3	顆粒層由来のケラチノサイト
免役細胞特異的プロモータ		
プロモータ	**遺伝子記述**	**遺伝子特異性**
ITGAM (CD11B)	インテグリン、αM (補体成分 3 受容体 3 サブユニット)	単球、マクロファージ、顆粒球、ナチュラルキラー細胞
尿生殖器細胞特異的プロモータ		
プロモータ	**遺伝子記述**	**遺伝子特異性**
Pbsn	プロバシン	前立腺上皮
Upk2	ウロプラキン 2	膀胱
Sbp	スペルミン結合タンパク質	前立腺
Fer1l4	Fer-1 様 4	膀胱
内皮細胞特異的プロモータ		
プロモータ	**遺伝子記述**	**遺伝子特異性**
ENG	エンドグリン	内皮細胞
多能性細胞及び胚性細胞特異的プロモータ		

【０４４０】

【表１７－３】

プロモータ	遺伝子記述	遺伝子特異性
Oct4 (POU5F1)	POU クラス 5 ホメオボックス 1	多能性細胞 (生殖細胞、ES 細胞、iPS 細胞)
NANOG	Nanog ホメオボックス	多能性細胞 (ES 細胞、iPS 細胞)
合成 Oct4	Oct-4 コアエンハンサーエレメントに基づく合成プロモータ	多能性細胞 (ES 細胞、iPS 細胞)
T ブラキュリ	ブラキュリ(Brachyury)	中胚葉
NES	ネスチン	神経前駆細胞及び外肺葉
SOX17	SRY (染色体性決定領域 Y)-ボックス 17	内肺葉
FOXA2 (HNFJ β)	フォークヘッドボックス A2	内肺葉 (ドーパミン作動性ニューロンのマーカとしても使用される)
MIR122	MicroRNA 122	内肺葉及び肝細胞 (初期胚性肝細胞由来～

【０４４１】

使用される宿主／ベクターシステムに応じて、構成性及び誘導性プロモータ、転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含め、いくつかの好適な転写及び翻訳制御エレメントのいずれも発現ベクターに使用し得る（例えば、Ｂｉｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１５３：５１６－５４４を参照されたい；尚、その全体が、参照により本明細書に組み込まれる）。

【０４４２】

一部の実施形態では、遺伝子組換えタンパク質をコードする核酸又は鋳型核酸は、制御エレメント、例えば、プロモータなどの転写制御エレメントと作動可能に連結される。転写制御エレメントは、一部の実施形態では、真核生物細胞、例えば、哺乳動物細胞；又は原核生物細胞（例えば、細菌若しくは古細菌細胞）のいずれかで機能性であり得る。一部の実施形態では、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、例えば、原核生物細胞及び真核生物細胞の両方でポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を可能にする、複数の制御エレメントと作動可能に連結される。

【０４４３】

例示の目的のために、空間限定プロモータの例として、限定されないが、ニューロン特異的プロモータ、脂肪細胞特異的プロモータ、心筋細胞特異的プロモータ、平滑筋特異的プロモータ、光受容体特異的プロモータなどが挙げられる。ニューロン特異的空間限定プロモータとして、限定されないが、以下のものが挙げられる：ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）プロモータ（例えば、ＥＭＢＬ ＨＳＥＮＯ２，Ｘ５１９５６を参照）；芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ（ＡＡＤＣ）プロモータ、ニューロフィラメントプロモータ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ ＨＵＭＮＦＬ，Ｌ０４１４７を参照）；シナプシンプロモータ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ ＨＵＭＳＹＮＩＢ，Ｍ５５３０１を参照）；ｔｈｙ－１プロモータ（例えば、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｃｅｌｌ ５１：７－１９；及びＬｌｅｗｅｌｌｙｎ，ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１６（１０）：１１６１－１１６６を参照）；セロトニン受容体プロモータ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ Ｓ６２２８３を参照）；チロシンヒドロキシラーゼプロモータ（ＴＨ）（例えば、Ｏｈ ｅｔ ａｌ．（２００９）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ １６：４３７；Ｓａｓａｏｋａ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｍｏｌ．Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．１６：２７４；Ｂｏｕｎｄｙ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．１８：９９８９；及びＫａｎｅｄａ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｎｅｕｒｏｎ ６：５８３－５９４を参照）；ＧｎＲＨプロモータ（例えば、Ｒａｄｏｖｉｃｋ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．

Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：３４０２－３４０６を参照）；Ｌ７プロモータ（例えば、Ｏｂｅｒｄｉｃｋ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４８：２２３－２２６を参照）；ＤＮＭＴプロモータ（例えば、Ｂａｒｔｇｅ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：３６４８－３６５２を参照）；エンケファリンプロモータ（例えば、Ｃｏｍｂ ｅｔ ａｌ．（１９８８）ＥＭＢＯ Ｊ．１７：３７９３－３８０５を参照）；ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）プロモータ；Ｃａ２＋カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼＩＩ－α（ＣａｍＫＩＩα）プロモータ（例えば、Ｍａｙｆｏｒｄ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：１３２５０；及びＣａｓａｎｏｖａ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｇｅｎｅｓｉｓ ３１：３７を参照）；ＣＭＶエンハンサー／血小板由来成長因子－βプロモータ（例えば、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １１：５２－６０を参照）；など。

【０４４４】

脂肪細胞特異的空間限定プロモータとしては、限定されないが、以下のものが挙げられる：ａＰ２遺伝子プロモータ／エンハンサー、例えば、ヒトａＰ２遺伝子の－５．４ｋｂから＋２１ｂｐまでの領域（例えば、Ｔｏｚｚｏ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１３８：１６０４；Ｒｏｓｓ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：９５９０；及びＰａｖｊａｎｉ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１１：７９７を参照）；グルコーストランスポーター－４（ＧＬＵＴ４）プロモータ（例えば、Ｋｎｉｇｈｔ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １００：１４７２５を参照）；脂肪酸トランスロカーゼ（ＦＡＴ／ＣＤ３６）プロモータ（例えば、Ｋｕｒｉｋｉ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｂｉｏｌ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．２５：１４７６；及びＳａｔｏ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７：１５７０３を参照）；ステアロイル－ＣｏＡデサチュラーゼ－１（ＳＣＤ１）プロモータ（Ｔａｂｏｒ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７４：２０６０３）；レプチンプロモータ（例えば、Ｍａｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１３９：１０１３；及びＣｈｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．２６２：１８７を参照）；アジドネクチンプロモータ（例えば、Ｋｉｔａ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．３３１：４８４；及びＣｈａｋｒａｂａｒｔｉ （２０１０）Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１５１：２４０８を参照）；アジプシンプロモータ（例えば、Ｐｌａｔｔ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：７４９０を参照）；レジスチンプロモータ（例えば、Ｓｅｏ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｍｏｌｅｃ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１７：１５２２を参照）；など。

【０４４５】

心筋細胞特異的空間限定プロモータとしては、限定されないが、以下の遺伝子；ミオシン軽鎖－２、α－ミオシン重鎖、ＡＥ３、心臓トロポニンＣ、心臓アクチンなどに由来する制御配列が挙げられる。Ｆｒａｎｚ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｒｅｓ．３５：５６０－５６６；Ｒｏｂｂｉｎｓ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．７５２：４９２－５０５；Ｌｉｎｎ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｃｉｒｃ．Ｒｅｓ．７６：５８４－５９１；Ｐａｒｍａｃｅｋ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１４：１８７０－１８８５；Ｈｕｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｈｙｐｅｒｔｅｎｓｉｏｎ ２２：６０８－６１７；及びＳａｒｔｏｒｅｌｌｉ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：４０４７－４０５１。

【０４４６】

平滑筋細胞特異的空間限定プロモータとしては、限定されないが、以下のものが挙げられる：ＳＭ２２αプロモータ（例えば、Ａｋｙｕｅｒｅｋ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．６：９８３；及び米国特許第７，１６９，８７４号明細書を参照）；スム

ーセリンプロモータ（例えば、国際公開第２００１／０１８０４８号パンフレットを参照）；α－平滑筋アクチンプロモータ；など。例えば、ＳＭ２２αプロモータの０．４ｋｂ領域（その内部に２つのＣＡｒＧエレメントが位置する）は、血管の平滑筋細胞特異的発現を媒介することが明らかにされている（例えば、Ｋｉｍ，ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１７，２２６６－２２７８；Ｌｉ，ｅｔ　ａｌ．，（１９９６）Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１３２　８４９－８５９；及びＭｏｅｓｓｌｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　１２２，２４１５－２４２５を参照）。

【０４４７】

光受容体特異的空間限定プロモータとしては、限定されないが、以下のものが挙げられる：ロドプシンキナーゼプロモータ（Ｙｏｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．Ｖｉｓ．Ｓｃｉ．４４：４０７６）；βホスホジエステラーゼ遺伝子プロモータ（Ｎｉｃｏｕｄ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｊ．Ｇｅｎｅ　Ｍｅｄ．９：１０１５）；網膜色素変性遺伝子プロモータ（Ｎｉｃｏｕｄ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）前掲）；光受容体間レチノイド結合タンパク質（ＩＲＢＰ）遺伝子エンハンサー（Ｎｉｃｏｕｄ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）前掲）；ＩＲＢＰ遺伝子プロモータ（Ｙｏｋｏｙａｍａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｅｘｐ　Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．５５：２２５）；など。

【０４４８】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステム、例えば、遺伝子組換えポリペプチドをコードするＤＮＡ、鋳型ＲＮＡをコードするＤＮＡ、又は異種目的配列をコードするＤＮＡ若しくはＲＮＡは、１つ又は複数のエレメントが、組織特異的プロモータ、例えば、Ｔ細胞内で活性があるプロモータに作動可能に連結されるように設計される。更なる実施形態では、Ｔ細胞活性プロモータは、他の細胞型、例えば、Ｂ細胞、ＮＫ細胞において不活性である。一部の実施形態では、Ｔ細胞活性プロモータは、Ｔ細胞受容体の成分、例えば、ＴＲＡＣ、ＴＲＢＣ、ＴＲＧＣ、ＴＲＤＣをコードする遺伝子についてのプロモータに由来する。一部の実施形態では、Ｔ細胞活性プロモータは、分化タンパク質のＴ細胞特異的クラスターの成分、例えば、ＣＤ３、例えば、ＣＤ３Ｄ、ＣＤ３Ｅ、ＣＤ３Ｇ、ＣＤ３Ｚをコードする遺伝子についてのプロモータに由来する。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムにおけるＴ細胞特異的プロモータは、公的に利用可能な遺伝子発現データを細胞型にわたって比較し、Ｔ細胞内での発現が増強された遺伝子からプロモータを選択することによって発見される。一部の実施形態では、プロモータは、所望の発現幅に応じて選択され得、例えば、Ｔ細胞のみにおいて活性があるプロモータ、ＮＫ細胞のみにおいて活性があるプロモータ、Ｔ細胞及びＮＫ細胞の両方において活性があるプロモータである。

【０４４９】

当技術分野で公知の細胞特異的プロモータを用いて、例えば、本明細書に記載される遺伝子組換えタンパク質の発現を指令することができる。非限定的な例示的哺乳動物細胞特異的プロモータは、特性決定されており、細胞特異的にＣｒｅリコンビナーゼを発現するマウスに使用されている。いくつかの非限定的な例示的哺乳動物細胞特異的プロモータは、米国特許第９８４５４８１号明細書（参照により本明細書に組み込まれる）の表１に列挙されている。

【０４５０】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターは、発現カセットを含む。典型的に、発現カセットは、プロモータ配列と作動可能に連結した本発明の核酸分子を含む。例えば、プロモータは、それが、コーディング配列の発現に影響を及ぼすことができる場合、コーディング配列と作動可能に連結している（例えば、コーディング配列は、プロモータの転写制御下にある）。コーディング配列は、センス又はアンチセンス配向で調節配列と作動可能に連結することができる。特定の実施形態では、プロモータは、異種プロモータである。特定の実施形態では、発現カセットは、別のエレメント、例えば、イントロン、エンハンサー、ポリアデニル化部位、ウッドチャック（ｗｏｏｄｃｈｕｃｋ）応答エレメント（ＷＲＥ）、及び／又はコーディング配列の発現レベルに影響を及ぼすことがわかっている他のエレメントを含み得る。プロモータは、典型的に、コーディング配列又は機

能性ＲＮＡの発現を制御する。特定の実施形態では、プロモータ配列は、近位及びより遠位の上流エレメントを含み、更にエンハンサーエレメントも含み得る。エンハンサーは、典型的に、プロモータ活性を刺激することができ、プロモータの天然のエレメントであり得るか、又はプロモータのレベル若しくは組織特異性を増強するために挿入された異種エレメントであり得る。特定の実施形態では、プロモータは、その全体がネイティブ遺伝子に由来する。特定の実施形態では、プロモータは、天然に存在する異なるプロモータ由来の様々なエレメントから構成される。特定の実施形態では、プロモータは、合成ヌクレオチド配列を含む。当業者であれば、種々のプロモータが、様々な組織若しくは細胞型において、又は様々な発生段階において、又は様々な環境条件又は薬剤若しくは転写補因子の存在若しくは非存在に応答して、遺伝子の発現を指令し得ることが理解されるであろう。ユビキタス、細胞型特異的、組織特異的、発生段階特異的、及び条件的プロモータ、例えば、薬剤応答性プロモータ（例えばテトラサイクリン応答性プロモータ）は、当業者に周知である。例示的なプロモータとして、限定されないが、ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＫＧ）プロモータ、ＣＡＧ（ＣＭＶエンハンサー、ニワトリβアクチンプロモータ（ＣＢＡ）及びウサギβグロビンイントロンの複合物）、ＮＳＥ（ニューロン特異的エノラーゼ）、シナプシン若しくはＮｅｕＮプロモータ、ＳＶ４０初期プロモータ、マウス乳房腫瘍ウイルスＬＴＲプロモータ；アデノウイルス主要後期プロモータ（Ａｄ　ＭＬＰ）、単純ヘルペスウイルス（ｈｅｒｐｅｓ　ｓｉｍｐｌｅｘ　ｖｉｒｕｓ）（ＨＳＶ）プロモータ、サイトメガロウイルス（ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ）（ＣＭＶ）プロモータ、例えば、ＣＭＶ最初期プロモータ領域（ＣＭＶＩＥ）、ＳＦＦＶプロモータ、ラウス肉腫ウイルス（ｒｏｕｓ　ｓａｒｃｏｍａ　ｖｉｒｕｓ）（ＲＳＶ）プロモータ、合成プロモータ、ハイブリダイゼーションプロモータなどが挙げられる。他のプロモータは、ヒト由来又はマウスをはじめとする他の種由来のものであり得る。一般的なプロモータとしては、例えば、ヒトサイトメガロウイルス（ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ）（ＣＭＶ）最初期遺伝子プロモータ、ＳＶ４０初期プロモータ、ラウス肉腫ウイルス（Ｒｏｕｓ　ｓａｒｃｏｍａ　ｖｉｒｕｓ）の長い末端反復、［β］－アクチン、ラットインスリンプロモータ、ホスホグリセリン酸キナーゼプロモータ、ヒトα－１アンチトリプシン（ｈＡＡＴ）プロモータ、トランスサイレチンプロモータ、ＴＢＧプロモータ及び他の肝臓特異的プロモータ、デスミンプロモータ及び類似の筋肉特異的プロモータ、ＥＦ１－α－プロモータ、多組織特異性を備えるハイブリッドプロモータ、シナプシン及びグリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼプロモータのようなニューロン特異的プロモータが挙げられ、これらは、全て当業者に周知であり、容易に入手可能であり、目的のコーディング配列の高レベルの発現を達成するために使用することができる。加えて、マウスメタロチオネイン遺伝子などの非ウイルス遺伝子由来の配列も本発明において有用であろう。こうしたプロモータ配列は、例えば、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から市販されている。更に別の例示的なプロモータ配列は、例えば、国際公開第２０１８２１３７８６Ａ１号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０４５１】

一部の実施形態では、例えば、肝臓での発現を駆動するために、アポリポタンパク質Ｅエンハンサー（ＡｐｏＥ）又はその機能性断片を使用する。一部の実施形態では、ＡｐｏＥエンハンサー又はその機能性断片の２コピーを使用する。一部の実施形態では、ＡｐｏＥエンハンサー又はその機能性断片をプロモータ、例えば、ヒトα－１アンチトリプシン（ｈＡＡＴ）プロモータと組み合わせて使用する。

【０４５２】

一部の実施形態では、調節配列は、組織特異的遺伝子発現能力を付与する。いくつかのケースでは、組織特異的調節配列は、組織特異的に転写を誘導する組織特異的転写因子に結合する。様々な組織特異的調節配列（例えば、プロモータ、エンハンサーなど）が当技術分野で公知である。例示的な組織特異的調節配列として、限定されないが、以下の組織特異的プロモータが挙げられる：肝臓特異的チロキシン結合グロブリン（ＴＢＧ）プロモ

ータ、インスリンプロモータ、グルカゴンプロモータ、ソマトスタチンプロモータ、膵ポリペプチド（ＰＰＹ）プロモータ、シナプシン－１（Ｓｙｎ）プロモータ、クレアチンキナーゼ（ＭＣＫ）プロモータ、哺乳動物デスミン（ＤＥＳ）プロモータ、α－ミオシン重鎖（ａ－ＭＨＣ）プロモータ、又は心臓トロポニンＴ（ｃＴｎＴ）プロモータ。他の例示的なプロモータとしては、β－アクチンプロモータ、Ｂ型肝炎ウイルスコアプロモータ、Ｓａｎｄｉｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，３：１００２－９（１９９６）；α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）プロモータ、Ａｒｂｕｔｈｎｏｔ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，７：１５０３－１４（１９９６））、骨オステオカルシンプロモータ（Ｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．、Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐ．，２４：１８５－９６（１９９７））；骨シアロタンパク質プロモータ（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｏｎｅ Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．，１１：６５４－６４（１９９６））、ＣＤ２プロモータ（Ｈａｎｓａｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６１：１０６３－８（１９９８）；免疫グロブリン重鎖プロモータ；Ｔ細胞受容体α－鎖プロモータ、ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）プロモータなどのニューロンプロモータ（Ａｎｄｅｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．，１３：５０３－１５（１９９３））、ニューロフィラメント軽鎖遺伝子プロモータ（Ｐｉｃｃｉｏｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ． Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：５６１１－５（１９９１））並びにニューロン特異的ｖｇｆ遺伝子プロモータ（Ｐｉｃｃｉｏｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｎ，１５：３７３－８４（１９９５））などが挙げられる。別の例示的なプロモータ配列は、例えば、米国特許第１０３００１４６号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。一部の実施形態では、組織特異的調節エレメント、例えば、組織特異的プロモータは、例えば、ＲＮＡ－ｓｅｑ若しくはタンパク質発現データ、又はそれらの組合せにより測定して、所与の組織中で高度に発現される遺伝子と作動可能に連結していることがわかっているものから選択される。発現による組織特異性を分析する方法は、Ｆａｇｅｒｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ １３（２）：３９７－４０６ （２０１４）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に教示されている。

【０４５３】

一部の実施形態では、本明細書に記載のベクターは、マルチシストロン性発現構築物である。マルチシストロン性発現構築物として、例えば、第１発現カセット（例えば、第１プロモータ及び第１コーディング核酸配列を含む）と、第２発現カセット（例えば、第２プロモータ及び第２コーディング核酸配列を含む）を有する構築物が挙げられる。こうしたマルチシストロン性発現構築物は、いくつかの事例では、ポリペプチド、例えば遺伝子組換えポリペプチド及び遺伝子組換え鋳型と一緒に、ヘアピンＲＮＡなどの非翻訳遺伝子産物の送達に特に有用となり得る。一部の実施形態では、マルチシストロン性発現構築物は、例えば、プロモータ干渉、又は不適合性核酸エレメントの近接した存在のために、含まれる導入遺伝子の１つ若しくは複数の発現レベル低下を呈示し得る。マルチシストロン性発現構築物がウイルスベクターの一部である場合、自己相補性核酸配列の存在は、いくつかの事例において、ウイルスの増殖又はパッケージングに必要な構造の形成を妨害し得る。

【０４５４】

一部の実施形態では、配列は、ヘアピンを有するＲＮＡをコードする。一部の実施形態では、ヘアピンＲＮＡは、ガイドＲＮＡ、鋳型ＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、又はｍｉｃｒｏＲＮＡである。一部の実施形態では、第１プロモータは、ＲＮＡポリメラーゼＩプロモータである。一部の実施形態では、第１プロモータは、ＲＮＡポリメラーゼＩＩプロモータである。一部の実施形態では、第２プロモータは、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモータである。一部の実施形態では、第２プロモータは、Ｕ６又はＨ１プロモータである。

【０４５５】

特定の理論に束縛されることを意図しないが、マルチシストロン性発現構築物は、ただ１つのシストロンを含む発現システムと比較して、最適な発現レベルを達成しないと考え

られる。２つ以上のプロモータエレメントを含むマルチシストロン性発現構築物を用いて達成される発現レベル低下について示される原因の１つは、プロモータ干渉の現象である（例えば、Ｃｕｒｔｉｎ Ｊ Ａ，Ｄａｎｅ Ａ Ｐ，Ｓｗａｎｓｏｎ Ａ，Ａｌｅｘａｎｄｅｒ Ｉ Ｅ，Ｇｉｎｎ Ｓ Ｌ．Ｂｉｄｉｒｅｃｔｉｏｎａｌ ｐｒｏｍｏｔｅｒ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ ｂｅｔｗｅｅｎ ｔｗｏ ｗｉｄｅｌｙ ｕｓｅｄ ｉｎｔｅｒｎａｌ ｈｅｔｅｒｏｌｏｇｏｕｓ ｐｒｏｍｏｔｅｒｓ ｉｎ ａ ｌａｔｅ－ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ ｃｏｎｓｔｒｕｃｔ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００８ Ｍａｒｃｈ；１５（５）：３８４－９０；及びＭａｒｔｉｎ－Ｄｕｑｕｅ Ｐ，Ｊｅｚｚａｒｄ Ｓ，Ｋａｆｔａｎｓｉｓ Ｌ，Ｖａｓｓａｕｘ Ｇ．Ｄｉｒｅｃｔ ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｉｎｓｕｌａｔｉｎｇ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ ｔｗｏ ｇｅｎｅｔｉｃ ｅｌｅｍｅｎｔｓ ｉｎ ａｎ ａｄｅｎｏｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｔｗｏ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｃａｓｓｅｔｔｅｓ．Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００４ Ｏｃｔｏｂｅｒ；１５（１０）：９９５－１００２を参照されたい；尚、いずれの参照文献も、プロモータ干渉現象の開示について、参照により本明細書に組み込まれる）。一部の実施形態では、プロモータ干渉の問題は、例えば、内部リボソーム進入部位により隔てられる複数のコーディング核酸配列の転写を駆動するただ１つのプロモータを含むマルチシストロン性発現構築物を生成することにより、又は転写インスレータエレメントを備えるそれ自身のプロモータを含むシストロンを分離することによって解消することができる。一部の実施形態では、単一プロモータにより駆動される多シストロンの発現は、シストロンの不均一な発現レベルを招き得る。一部の実施形態では、プロモータを効率的に分離することはできず、分離エレメントは、一部の遺伝子導入ベクター、例えば、一部のレトロウイルスベクターと適合性ではない場合がある。

【０４５６】

ｍｉｃｒｏＲＮＡ

ｍｉｃｒｏＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）及び他の低分子干渉核酸は、一般に、標的ＲＮＡ転写物切断／分解又は標的メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の翻訳抑制によって遺伝子発現を調節する。ｍｉＲＮＡは、いくつかの事例において、典型的に、最終的な１９～２５の非翻訳ＲＮＡ産物として天然に発現され得る。ｍｉＲＮＡは、一般に、標的ｍＲＮＡの３’非翻訳領域（ＵＴＲ）との配列特異的相互作用を介してその活性を呈示する。これらの内在性発現ｍｉＲＮＡは、ヘアピン前駆体を形成し得るが、これらは、後に、ｍｉＲＮＡデュープレックス、更には成熟一本鎖ｍｉＲＮＡ分子にプロセシングされる。この成熟ｍｉＲＮＡは、一般に、多タンパク質複合体、ｍｉＲＩＳＣを誘導し、これは、成熟ｍｉＲＮＡに対するその相補性に基づいて標的ｍＲＮＡの標的３’ＵＴＲ領域を識別する。有用な導入遺伝子産物として、例えば、連結ポリペプチドの発現を調節するｍｉＲＮＡ又はｍｉＲＮＡ結合部位を挙げることができる。ｍｉＲＮＡ遺伝子；これら遺伝子の産物及びその相同体の非限定的なリストは、導入遺伝子として、又は低分子干渉核酸（例えば、ｍｉＲＮＡスポンジ、アンチセンスオリゴヌクレオチド）の標的として、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第１０３００１４６号明細書、２２：２５－２５：４８に列挙されるものなどの方法において有用である。一部の実施形態では、前述したｍｉＲＮＡの１つ又は複数に対する１つ若しくは複数の結合部位は、導入遺伝子、例えば、ｒＡＡＶベクターにより送達される導入遺伝子に組み込まれて、例えば、その導入遺伝子を保有する動物の１つ若しくは複数の組織中の導入遺伝子の発現を阻害する。一部の実施形態では、組織特異的に導入遺伝子の発現を制御するように、結合部位を選択し得る。例えば、肝臓特異適ｍｉＲ－１２２に対する結合部位を導入遺伝子に組み込んで、肝臓中のその導入遺伝子の発現を阻害することができる。別の例示的なｍｉＲＮＡ配列は、例えば、米国特許第１０，３００，１４６号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０４５７】

ｍｉＲ阻害剤又はｍｉＲＮＡ阻害剤は、概して、ｍｉＲＮＡ発現及び／又はプロセシン

グを阻止する薬剤である。こうした薬剤の例として、限定されないが、ｍｉｃｒｏＲＮＡアンタゴニスト、ｍｉｃｒｏＲＮＡ特異的アンチセンス、ｍｉｃｒｏＲＮＡスポンジ、及びｍｉｃｒｏＲＮＡオリゴヌクレオチド（二本鎖、ヘアピン、短いオリゴヌクレオチド）が挙げられ、これらは、Ｄｒｏｓｈａ複合体とのｍｉＲＮＡ相互作用を阻害する。ｍｉｃｒｏＲＮＡ阻害剤、例えば、ｍｉＲＮＡスポンジは、導入遺伝子から細胞に発現させることができる（例えば、Ｅｂｅｒｔ，Ｍ．Ｓ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｔｈｏｄｓ，Ｅｐｕｂ　Ａｕｇ．１２，２００７に記載の通り；尚、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。一部の実施形態では、ｍｉｃｒｏＲＮＡスポンジ、又は他のｍｉＲ阻害剤は、ＡＡＶと一緒に使用される。ｍｉｃｒｏＲＮＡスポンジは、一般に、相補的ヘプタマーシード配列を介して、ｍｉＲＮＡを特異的に阻害する。一部の実施形態では、単一のスポンジ配列を用いて、ｍｉＲＮＡのファミリー全体をサイレンシングすることができる。細胞中でｍｉＲＮＡ機能をサイレンシングする（ｍｉＲＮＡ標的の抑制解除）他の方法は、当業者に明らかであろう。

【０４５８】

一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えシステム、鋳型ＲＮＡ、又はポリペプチドは、標的組織、例えば、第１の組織に投与されるか、又はそこで活性である（例えば、より活性である）。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステム、鋳型ＲＮＡ、又はポリペプチドは、非標的組織に投与されないか、又は非標的組織において活性が低い（例えば、活性でない）。一部の実施形態では、本明細書に記載の遺伝子組換えシステム、鋳型ＲＮＡ、又はポリペプチドは、標的組織、例えば、第１組織において、ＤＮＡを修飾する（そして例えば、非標的組織においてＤＮＡを修飾しない）のに有用である。

【０４５９】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、（ａ）本明細書に記載のポリペプチド又はそれをコードする核酸、（ｂ）本明細書に記載の鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）、及び（ｃ）標的組織に特異的な１つ又は複数の第１組織特異的発現制御配列を含み、ここで、標的組織に特異的な１つ又は複数の第１組織特異的発現制御配列は、（ａ）、（ｂ）、又は（ａ）及び（ｂ）と機能的に関連しており、（ａ）と関連する場合、（ａ）はポリペプチドをコードする核酸を含む。

【０４６０】

一部の実施形態では、（ｂ）の核酸はＲＮＡを含む。

【０４６１】

一部の実施形態では、（ｂ）の核酸はＤＮＡを含む。

【０４６２】

一部の実施形態では、（ｂ）の核酸は：（ｉ）一本鎖であるか、又は一本鎖セグメントを含む、例えば、一本鎖ＤＮＡであるか、又は一本鎖セグメント及び１つ若しくは複数の二本鎖セグメントを含む；（ｉｉ）逆末端反復を有する；又は（ｉｉｉ）（ｉ）と（ｉｉ）の両方である。

【０４６３】

一部の実施形態では、（ｂ）の核酸は二本鎖であるか、又は二本鎖セグメントを含む。

【０４６４】

一部の実施形態では、（ａ）は、ポリペプチドをコードする核酸を含む。

【０４６５】

一部の実施形態では、（ａ）の核酸はＲＮＡを含む。

【０４６６】

一部の実施形態では、（ａ）の核酸はＤＮＡを含む。

【０４６７】

一部の実施形態では、（ａ）の核酸は：（ｉ）一本鎖であるか、又は一本鎖セグメントを含む、例えば、一本鎖ＤＮＡであるか、又は一本鎖セグメント及び１つ若しくは複数の二本鎖セグメントを含む；（ｉｉ）逆末端反復を有する；又は（ｉｉｉ）（ｉ）と（ｉｉ）の両方である。

【０４６８】
一部の実施形態では、（ａ）の核酸は二本鎖であるか、又は二本鎖セグメントを含む。
【０４６９】
一部の実施形態では、（ａ）、（ｂ）、又は（ａ）及び（ｂ）における核酸は線状である。
【０４７０】
一部の実施形態では、（ａ）、（ｂ）、又は（ａ）及び（ｂ）における核酸は、環状、例えば、プラスミド又はミニサークルである。
【０４７１】
一部の実施形態では、異種目的配列は、第１プロモータと機能的に関連している。
【０４７２】
一部の実施形態では、１つ又は複数の第１組織特異的発現制御配列は、組織特異的プロモータを含む。
【０４７３】
一部の実施形態では、組織特異的プロモータは、以下と機能的に関連する第１プロモータを含む：（ｉ）異種目的配列、（ｉｉ）レトロウイルスＲＴをコードする核酸、又は（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）。
【０４７４】
一部の実施形態では、１つ又は複数の第１組織特異的発現制御配列は、以下と機能的に関連する組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列を含む：（ｉ）異種目的配列、（ｉｉ）レトロウイルスＲＴドメインをコードする核酸、又は（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）。
【０４７５】
一部の実施形態では、システムは組織特異的プロモータを含み、システムは１つ又は複数の組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列を更に含み、ここで、（ｉ）組織特異的プロモータは、（Ｉ）異種目的配列、（ＩＩ）レトロウイルスＲＴドメインをコードする核酸、又は（ＩＩＩ）（ｉ）及び（ｉｉ）と機能的に関連している；且つ／又は（ｉｉ）１つ又は複数の組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列は、（Ｉ）異種目的配列、（ＩＩ）レトロウイルスＲＴをコードする核酸、又は（ＩＩＩ）（ｉ）及び（ｉｉ）と機能的に関連している。
【０４７６】
一部の実施形態では、（ａ）は、ポリペプチドをコードする核酸を含み、核酸は、ポリペプチドをコードする核酸と機能的に関連するプロモータを含む。
【０４７７】
一部の実施形態では、ポリペプチドをコードする核酸は、ポリペプチドコード配列と機能的に関連する標的組織に特異的な１つ又は複数の第２組織特異的発現制御配列を含む。
【０４７８】
一部の実施形態では、１つ又は複数の第２組織特異的発現制御配列は、組織特異的プロモータを含む。
【０４７９】
一部の実施形態では、組織特異的プロモータは、ポリペプチドをコードする核酸と機能的に関連するプロモータである。
【０４８０】
一部の実施形態では、１つ又は複数の第２組織特異的発現制御配列は、組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列を含む。
【０４８１】
一部の実施形態では、ポリペプチドをコードする核酸と機能的に関連するプロモータは、組織特異的プロモータであり、システムは、１つ又は複数の組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列を更に含む。
【０４８２】
一部の実施形態では、本発明によって提供されるシステムの核酸成分は、タンパク質発

現レベルを改変する非翻訳領域（ＵＴＲ）に隣接する配列（例えば、ポリペプチドをコードするか、又は異種目的配列を含む）である。様々な５’及び３’ＵＴＲがタンパク質発現に影響を与え得る。例えば、一部の実施形態では、コード配列は、ＲＮＡの安定性又はタンパク質翻訳を修飾する５’ＵＴＲが先行し得る。一部の実施形態では、配列の後に、ＲＮＡの安定性又は翻訳を修飾する３’ＵＴＲが続き得る。一部の実施形態では、配列は、ＲＮＡの安定性又は翻訳を修飾するように、５’ＵＴＲが先行し、３’ＵＴＲが後続し得る。一部の実施形態では、５’及び／又は３’ＵＴＲは、補体因子３（Ｃ３）（ＣＡＣＴＣＣＴＣＣＣＣＡＴＣＣＴＣＴＣＣＣＴＣＴＧＴＣＣＣＴＣＴＧＴＣＣＣＴＣＴＧＡＣＣＣＴＧＣＡＣＴＧＴＣＣＣＡＧＣＡＣＣ）又はオロソムコイド１（ＯＲＭ１）

【化１１】

(CAGGACACAGCCTTGGATCAGGACAGAGACTTGGGGGCCATCCTGCCCCTCCAACC
CGACATGTGTACCTCAGCTTTTTCCCTCACTTGCATCAATAAAGCTTCTGTGTTTGGA
ACAGCTAA)

の５’及び３’ＵＴＲから選択され得る（Ａｓｒａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．ＲＮＡ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　２０１８）。特定の実施形態では、５’ＵＴＲはＣ３からの５’ＵＴＲであり、３’ＵＴＲはＯＲＭ１からの３’ＵＴＲである。特定の実施形態では、タンパク質発現のための５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲ、例えば、遺伝子組換えポリペプチド若しくは異種目的配列のためのｍＲＮＡ（又はＲＮＡをコードするＤＮＡ）は、最適化された発現配列を含む。一部の実施形態では、例えば、Ｒｉｃｈｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１６８（６）：Ｐ１１１４－１１２５（２０１７）（その配列は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、５’ＵＴＲは、ＧＧＧＡＡＡＵＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＵＡＡＧＡＡＧＡＡＡＵＡＵＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣを含み、及び／又は３’ＵＴＲは、ＵＧＡＵＡＡＵＡＧＧＣＵＧＧＡＧＣＣＵＣＧＧＵＧＧＣＣＡＵＧＣＵＵＣＵＵＧＣＣＣＣＵＵＧＧＧＣＣＵＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＵＣＣＵＣＣＣＣＵＵＣＣＵＧＣＡＣＣＣＧＵＡＣＣＣＣＣＧＵＧＧＵＣＵＵＵＧＡＡＵＡＡＡＧＵＣＵＧＡを含む。

【０４８３】

一部の実施形態では、５’及び／又は３’ＵＴＲを選択して、タンパク質発現が増強され得る。一部の実施形態では、過剰産生阻害が最小限に抑えられるようにタンパク質発現を修飾するように、５’及び／又は３’ＵＴＲを選択し得る。一部の実施形態では、ＵＴＲはコード配列の周囲にあり、例えば、コード配列の外側にあり、他の実施形態では、コード配列に近接している。一部の実施形態では、更なる調節エレメント（例えば、ｍｉＲＮＡ結合部位、シス調節部位）がＵＴＲに含まれる。

【０４８４】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムのオープンリーディングフレーム、例えば、遺伝子組換えポリペプチドをコードするｍＲＮＡ（若しくはｍＲＮＡをコードするＤＮＡ）のＯＲＦ又は異種目的配列のｍＲＮＡ（若しくはｍＲＮＡをコードするＤＮＡ）の１つ若しくは複数のＯＲＦは、その発現を増強する、５’及び／又は３’非翻訳領域（ＵＴＲ）によりフランキングされている。一部の実施形態では、システムのｍＲＮＡ成分（又はＤＮＡ成分から産生された転写物）の５’ＵＴＲは、配列５’－ＧＧＧＡＡＡＵＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＵＡＡＧＡＡＧＡＡＡＵＡＵＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ－３’を含む。一部の実施形態では、システムのｍＲＮＡ成分（又はＤＮＡ成分から産生された転写物）の３’ＵＴＲは、配列

【化１２】

5′-

UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCC

AGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA-

3′

を含む。５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲのこの組合せは、Ｒｉｃｈｎｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ １６８（６）：Ｐ１１１４－１１２５（２０１７）（その教示内容及び配列は、参照により本明細書に組み込まれる）により、作動可能に連結したＯＲＦの所望の発現をもたらすことが明らかにされている。一部の実施形態では、本明細書に記載のシステムは、転写物をコードするＤＮＡを含み、この場合、上記ＤＮＡは、上に挙げた配列中のＵをＴで置換した、対応する５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲを含む。一部の実施形態では、システムのＲＮＡ成分を生産するために用いられるＤＮＡベクターは、インビトロ転写を開始するために、５’ＵＴＲの上流にプロモータ、例えば、Ｔ７、Ｔ３、又はＳＰ６プロモータを含む。上記の５’ＵＴＲは、ＧＧＧで開始するが、これは、Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼを用いた転写を最適化するのに好適な開始である。代替５’ＵＴＲに適合するように、転写レベルを調整し、且つ転写開始部位ヌクレオチドを改変するために、Ｄａｖｉｄｓｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｐａｃ Ｓｙｍｐ Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔ ４３３－４４３（２０１０）の教示には、これらの特性の両方を満たすＴ７プロモータ変異体、及びそれを見出す方法が記載されている。

【０４８５】

ウイルスベクター及びその成分

ウイルスは、例えば、本明細書で使用されるポリメラーゼ及びポリメラーゼ機能、例えば、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ、ＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ、ＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素の供給源として、本明細書に記載の関連酵素又はドメインの供給源に加え、本明細書に記載のシステムのための送達ビヒクルの有用な供給源である。一部の酵素、例えば、逆転写酵素は、複数の活性を有する可能性があり、例えば、ＲＮＡ依存性ＤＮＡ重合及びＤＮＡ依存性ＤＮＡ重合の両方（例えば、第１及び第２の鎖合成）が可能であり得る。一部の実施形態では、遺伝子組換え送達システム又はその成分の供給源として使用されるウイルスは、Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ Ｒｅｖ ３５（３）：２３５－２４１（１９７１）により記載される一群から選択され得る。

【０４８６】

一部の実施形態では、ウイルスは、Ｉ群ウイルスから選択され、例えば、ＤＮＡウイルスであり、ｄｓＤＮＡをビリオンにパッケージングする。一部の実施形態では、Ｉ群ウイルスは、例えば、アデノウイルス（Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ）、ヘルペスウイルス（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｕｓ）、ポックスウイルス（Ｐｏｘｖｉｒｕｓ）から選択される。

【０４８７】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＩＩ群ウイルスから選択され、例えば、ＤＮＡウイルスであり、ｓｓＤＮＡをビリオンにパッケージングする。一部の実施形態では、ＩＩ群ウイルスは、例えば、パルボウイルス（Ｐａｒｖｏｖｉｒｕｓ）から選択される。一部の実施形態では、パルボウイルス（ｐａｒｖｏｖｉｒｕｓ）は、ディペンドパルボウイルス属（ｄｅｐｅｎｄｏｐａｒｖｏｖｉｒｕｓ）、例えば、アデノ随伴ウイルス（ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ）（ＡＡＶ）である。

【０４８８】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＩＩＩ群ウイルスから選択され、例えば、ＲＮＡウイルスであり、ｄｓＲＮＡをビリオンにパッケージングする。一部の実施形態では、ＩＩＩ群ウイルスは、例えば、レオウイルス（Ｒｅｏｖｉｒｕｓ）から選択される。一部の実施形態では、こうしたビリオンに含有されるｄｓＲＮＡの一方又は両方の鎖は、宿主細胞

への形質導入時にｍＲＮＡとして直接役立ち得るコーディング分子であり、例えば、介在核酸複製又は重合ステップを一切必要とせずに、宿主細胞への形質導入時に、タンパク質に直接翻訳され得る。

【０４８９】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＩＶ群ウイルスから選択され、例えば、ＲＮＡウイルスであり、ｓｓＲＮＡ（＋）をビリオンにパッケージングする。一部の実施形態では、ＩＶ群ウイルスは、例えば、コロナウイルス（Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｕｓ）、ピコルナウイルス（Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｕｓ）、トガウイルス（Ｔｏｇａｖｉｒｕｓ）から選択される。一部の実施形態では、こうしたビリオンに含有されるｓｓＲＮＡ（＋）は、宿主細胞への形質導入時にｍＲＮＡとして直接役立ち得るコーディング分子であり、例えば、介在核酸複製又は重合ステップを一切必要とせずに、宿主細胞への形質導入時に、タンパク質に直接翻訳され得る。

【０４９０】

一部の実施形態では、ウイルスは、Ｖ群ウイルスから選択され、例えば、ＲＮＡウイルスであり、ｓｓＲＮＡ（－）をビリオンにパッケージングする。一部の実施形態では、ＩＶ群ウイルスは、例えば、オルトミクソウイルス（Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｕｓｅｓ）、ラブドウイルス（Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｕｓ）から選択される。一部の実施形態では、ｓｓＲＮＡ（－）ゲノムを有するＲＮＡウイルスは、ビリオン内部に、ウイルスゲノムと一緒に宿主細胞に形質導入される酵素（例えば、ＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ）も担持しており、これは、ｓｓＲＮＡ（－）を、宿主によって直接翻訳され得るｓｓＲＮＡ（＋）にコピーすることができる。

【０４９１】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＶＩ群ウイルスから選択され、例えば、レトロウイルス（ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）であり、ｓｓＲＮＡ（＋）をビリオンにパッケージングする。一部の実施形態では、ＶＩ群ウイルスは、例えば、レトロウイルスから選択される。一部の実施形態では、レトロウイルス（ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）は、レンチウイルス（ｌｅｎｔｉｖｉｒｕｓ）、例えば、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、ＳＩＶ、ＢＩＶである。一部の実施形態では、レトロウイルスは、スプマウイルス（ｓｐｕｍａｖｉｒｕｓ）、例えば、フォーミーウイルス（ｆｏａｍｙ　ｖｉｒｕｓ）、例えば、ＨＦＶ、ＳＦＶ、ＢＦＶである。一部の実施形態では、こうしたビリオンに含有されるｓｓＲＮＡ（＋）は、宿主細胞への形質導入時にｍＲＮＡとして直接役立ち得るコーディング分子であり、例えば、介在核酸複製又は重合ステップを一切必要とせずに、宿主細胞への形質導入時に、タンパク質に直接翻訳され得る。一部の実施形態では、ｓｓＲＮＡ（＋）は、まず逆転写され、コピーされて、ｄｓＤＮＡゲノム中間体を生成し、そこからｍＲＮＡが宿主に転写され得る。一部の実施形態では、ｓｓＲＮＡ（＋）ゲノムを有するＲＮＡウイルスは、ビリオン内部に、ウイルスゲノムと一緒に宿主細胞に形質導入される酵素（例えば、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ）も担持しており、これは、ｓｓＲＮＡ（＋）をｄｓＤＮＡにコピーすることができ、このｄｓＤＮＡは、宿主によりｍＲＮＡに転写されて、翻訳され得る。一部の実施形態では、ＶＩ群レトロウイルス由来の逆転写酵素は、遺伝子組換えポリペプチドの逆転写酵素ドメインとして組み込まれる。

【０４９２】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＶＩＩ群ウイルスから選択され、例えば、レトロウイルス（ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）であり、ｄｓＲＮＡをビリオンにパッケージングする。一部の実施形態では、ＶＩＩ群ウイルスは、例えば、ヘパドナウイルス（Ｈｅｐａｄｎａｖｉｒｕｓ）から選択される。一部の実施形態では、こうしたビリオンに含有されるｄｓＲＮＡの一方又は両方の鎖は、宿主細胞への形質導入時にｍＲＮＡとして直接役立ち得るコーディング分子であり、例えば、介在核酸複製又は重合ステップを一切必要とせずに、宿主細胞への形質導入時に、タンパク質に直接翻訳され得る。一部の実施形態では、こうしたビリオンに含有されるｄｓＲＮＡの一方又は両方の鎖は、まず逆転写され、コピーされて、ｄｓＤＮＡゲノム中間体を生成し、そこからｍＲＮＡが宿主に転写され得る。一部

の実施形態では、ｄｓＲＮＡゲノムを有するＲＮＡウイルスは、ビリオン内部に、ウイルスゲノムと一緒に宿主細胞に形質導入される酵素（例えば、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ）も担持しており、これは、ｄｓＲＮＡをｄｓＤＮＡにコピーすることができ、このｄｓＤＮＡは、宿主によりｍＲＮＡに転写されて、翻訳され得る。一部の実施形態では、ＶＩＩ群レトロウイルス由来の逆転写酵素は、遺伝子組換えポリペプチドの逆転写酵素ドメインとして組み込まれる。

【０４９３】

一部の実施形態では、本発明で核酸を送達するために用いられるビリオンは、遺伝子組換えのプロセスに関与する酵素も担持し得る。例えば、レトロウイルスビリオンは、核酸と一緒に宿主細胞に送達される逆転写酵素ドメインを含有し得る。一部の実施形態では、ＲＮＡ鋳型は、ビリオン内の遺伝子組換えポリペプチドを随伴し得、それにより、両方が、ウイルス粒子からの核酸の形質導入時に標的細胞に同時送達される。一部の実施形態では、ビリオン内の核酸は、ＤＮＡ、例えば、線状ｓｓＤＮＡ、線状ｄｓＤＮＡ、環状ｓｓＤＮＡ、環状ｄｓＤＮＡ、ミニサークルＤＮＡ、ｄｂＤＮＡ、ｃｅＤＮＡを含み得る。一部の実施形態では、ビリオン内の核酸は、ＲＮＡ、例えば、線状ｓｓＲＮＡ、線状ｄｓＲＮＡ、環状ｓｓＲＮＡ、環状ｄｓＲＮＡを含み得る。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、宿主細胞への形質導入時に環状化され得、例えば、線状ｓｓＲＮＡ分子は、共有結合を経て、環状ｓｓＲＮＡを形成することができ、線状ｄｓＲＮＡ分子は、共有結合を経て、環状ｄｓＲＮＡ又は１つ若しくは複数の環状ｓｓＲＮＡを形成し得る。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、宿主細胞内でのローリングサークル複製により複製し得る。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、単一核酸分子を含み得、例えば非セグメント化ゲノムを含み得る。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、２つ以上の核酸分子を含み得、例えばセグメント化ゲノムを含み得る。一部の実施形態では、ビリオン内の核酸は１つ若しくは複数のタンパク質を随伴し得る。一部の実施形態では、ビリオン内の１つ又は複数のタンパク質を、形質導入時に宿主細胞に送達することができる。一部の実施形態では、標的核酸に対するビリオンパッケージングシグナルの付加により、天然ウイルスを核酸の送達のために改変し得、その場合、宿主細胞を用いて、パッケージングシグナルを含有する標的核酸をパッケージングする。

【０４９４】

一部の実施形態では、送達ビヒクルとして用いられるビリオンは、片利ヒトウイルスを含み得る。一部の実施形態では、送達ビヒクルとして用いられるビリオンは、アネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）を含み得、その使用は、国際公開第２０１８２３２０１７Ａ１号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０４９５】

ＡＡＶ投与

一部の実施形態では、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）が、本明細書に記載されるシステム、鋳型核酸、及び／又はポリペプチドと一緒に使用される。一部の実施形態では、ＡＡＶは、本明細書に記載のシステム、鋳型核酸、及び／又はポリペプチドを送達、投与、又はパッケージングするために使用される。一部の実施形態では、ＡＡＶは組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）である。

【０４９６】

一部の実施形態では、システムは、（ａ）本明細書に記載のポリペプチド又はそれをコードする核酸、（ｂ）本明細書に記載の鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）、及び（ｃ）標的組織に特異的な１つ又は複数の第１組織特異的発現制御配列を含み、ここで、標的組織に特異的な１つ又は複数の第１組織特異的発現制御配列は、（ａ）、（ｂ）、又は（ａ）及び（ｂ）と機能的に関連しており、（ａ）と関連する場合、（ａ）はポリペプチドをコードする核酸を含む。

【０４９７】

一部の実施形態では、本明細書に記載のシステムは、第１組換えアデノ随伴ウイルス（

ｒＡＡＶ）カプシドタンパク質を更に含み、ここで、（ａ）又は（ｂ）の少なくとも１つは、第１ｒＡＡＶカプシドタンパク質と会合し、（ａ）又は（ｂ）の少なくとも１つは、ＡＡＶ逆位末端リピート（ＩＴＲ）が隣接している。

【０４９８】

一部の実施形態では、（ａ）及び（ｂ）は、第１ｒＡＡＶカプシドタンパク質と会合している。

【０４９９】

一部の実施形態では、（ａ）及び（ｂ）は単一核酸上にある。

【０５００】

一部の実施形態では、システムは、第２ｒＡＡＶカプシドタンパク質を更に含み、ここで、（ａ）又は（ｂ）の少なくとも１つは、第２ｒＡＡＶカプシドタンパク質と会合し、第２ｒＡＡＶカプシドタンパク質と会合する（ａ）又は（ｂ）の少なくとも１つは、第１ｒＡＡＶカプシドタンパク質と会合する（ａ）又は（ｂ）の少なくとも１つと異なる。

【０５０１】

一部の実施形態では、（ａ）又は（ｂ）の少なくとも１つは、第１又は第２ｒＡＡＶカプシドタンパク質と会合し、第１又は第２ｒＡＡＶカプシドタンパク質の内部に分散しており、ここで、第１又は第２ｒＡＡＶカプシドタンパク質は、ＡＡＶカプシド粒子の形態である。

【０５０２】

一部の実施形態では、システムはナノ粒子を更に含み、ナノ粒子は（ａ）又は（ｂ）の少なくとも１つと会合している。

【０５０３】

一部の実施形態では、（ａ）及び（ｂ）は、それぞれａ）第１ｒＡＡＶカプシドタンパク質及び第２ｒＡＡＶカプシドタンパク質；ｂ）ナノ粒子及び第１ｒＡＡＶカプシドタンパク質；ｃ）第１ｒＡＡＶカプシドタンパク質；ｄ）第１アデノウイルスカプシドタンパク質；ｅ）第１ナノ粒子及び第２ナノ粒子；又はｆ）第１ナノ粒子と会合している。

【０５０４】

ウイルスベクターは、本発明によって提供されるシステムの全部又は一部を送達するために、例えば、本発明によって提供される方法における使用のために有用である。ポリペプチド又は核酸の送達には、異なるウイルスに由来するシステムが採用されており、例えば、インテグラーゼ欠損レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、単純ヘルペスウイルス、バキュロウイルス（Ｈｏｄｇｅ ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２０１７；Ｎａｒａｙａｎａｖａｒｉ ｅｔ ａｌ．Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２０１７；Ｂｏｅｈｍｅ ｅｔ ａｌ．Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２０１５で論評される）である。

【０５０５】

アデノウイルスは、明確に定義された生物学、遺伝的安定性、高い形質導入効率、及び大規模生産の容易さを考慮して、遺伝子送達ビヒクルとして使用されてきた一般的なウイルスである（例えば、Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅｓ ＆ Ｄｉｓｅａｓｅｓ ２０１７による論評を参照）。それらは線状ｄｓＤＮＡゲノムを有し、組織と細胞の向性が異なる様々な血清型がある。レシピエント細胞での感染性ウイルスの複製を防ぐために、パッケージングに使用されるアデノウイルスゲノムは、ウイルス産生細胞にトランスで提供される内因性ウイルスタンパク質の一部又は全てが欠失している。これにより、ゲノムはヘルパー依存性となる。つまり、ゲノムは、いわゆるヘルパー機能によって提供される欠損成分の存在下でのみ複製され、ウイルス粒子にパッケージングされる。全てのウイルスＯＲＦが除去されたヘルパー依存性アデノウイルスシステムは、最大３７ｋｂの外来ＤＮＡのパッケージングと適合性であり得る（Ｐａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｖｉｒｏｌ １９９７）。一部の実施形態では、アデノウイルスベクターは、遺伝子組換えシステムのポリペプチド又は鋳型成分に対応するＤＮＡを送達するために使用されるか、又は両方が別々の若しくは同じアデノウイルスベクターに含まれる。一部の実施形態では、アデノウイル

スは、自己パッケージングができないヘルパー依存性アデノウイルス（ＨＤ－ＡｄＶ）である。一部の実施形態では、アデノウイルスは、アデノウイルス粒子へのパッケージングに必要な配列成分を保持しながら、内因性ウイルスＯＲＦの全て又は実質的な部分が欠失した高容量アデノウイルス（ＨＣ－ＡｄＶ）である。このベクター型の場合、ゲノムパッケージングに必要な唯一のアデノウイルス配列は、非コード配列：両端の逆位末端リピート（ＩＴＲ）及び５’末端のパッケージングシグナルである（Ｊａｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｐｒｏｔｏｃ　２００９）。一部の実施形態では、アデノウイルスゲノムは、最適な産生及び安定性のための最小ゲノムサイズを満たすスタッファーＤＮＡも含む（例えば、Ｈａｕｓｌ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ　２０１０を参照）。一部の実施形態では、アデノウイルスを使用して、遺伝子組換えシステムを肝臓に送達する。

【０５０６】

一部の実施形態では、アデノウイルスを使用して、遺伝子組換えシステムをＨＳＣ、例えば、ＨＤＡｄ５／３５＋＋に送達する。ＨＤＡｄ５／３５＋＋は、肝臓からベクターの標的を外す、血清型３５線維が改変されたアデノウイルスである（Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｌｏｏｄ　Ａｄｖ　２０１９）。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムをＨＳＣに送達するアデノウイルスは、原始ＨＳＣ上で特異的に発現される受容体、例えばＣＤ４６を利用する。

【０５０７】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）はパルボウイルス（ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅ）科に属し、より具体的にはディペンドパルボウイルス（ｄｅｐｅｎｄｏｐａｒｖｏｖｉｒｕｓ）属を構成する。ＡＡＶゲノムは、約４．７キロベース（ｋｂ）を含む線状一本鎖ＤＮＡ分子で構成され、非構造Ｒｅｐ（複製）及び構造Ｃａｐ（カプシド）タンパク質をコードする２つの主要なオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）で構成される。アセンブリー活性化タンパク質（ＡＡＰ）をコードするキャップ遺伝子内の第２ＯＲＦが同定された。ＡＡＶコード領域に隣接するＤＮＡは、長さが約１４５ヌクレオチドの２つのシス作用性逆位末端リピート（ＩＴＲ）配列であり、ＤＮＡ複製のプライマーとして機能するエネルギー的に安定したヘアピン構造に折りたたむことができる中断されたパリンドローム配列を有する。ＤＮＡ複製におけるその役割に加え、ＩＴＲ配列は、ウイルスＤＮＡの細胞ゲノムへの組込み、宿主ゲノム又はプラスミドからのレスキュー、及びウイルス核酸の成熟ビリオンへのカプシド形成に関与することが示されている（Ｍｕｚｙｃｚｋａ，（１９９２）Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５８：９７－１２９）。一部の実施形態では、１つ又は複数の遺伝子組換え核酸成分は、ウイルスパッケージングのためにＡＡＶに由来するＩＴＲが隣接する。例えば、国際公開第２０１９１１３３１０号パンフレットを参照されたい。

【０５０８】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムの１つ又は複数の成分が、少なくとも１つのＡＡＶベクターを介して輸送される。一部の実施形態では、少なくとも１つのＡＡＶベクターは、特定の細胞、組織、生物に対する向性について選択される。一部の実施形態では、ＡＡＶベクターはシュードタイプ化され（例えば、ＡＡＶ２／８）、ここで、ＡＡＶ２は構築物の設計を表すが、カプシドタンパク質はＡＡＶ８由来のものに置換される。記載されるベクターはいずれも、ＡＡＶゲノムをパッケージングするために使用されるカプシドタンパク質が異なるＡＡＶ血清型のものに由来するシュードタイプ誘導体であり得ることが理解される。ベクターの選択において制限されることを意図しないが、例示的なＡＡＶ血清型のリストは、表１８に見出すことができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えに使用されるＡＡＶは、文献（例えば、Ｄａｖｉｄｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ　２０１９）で示されているように、新規細胞又は組織の向性について進化し得る。

【０５０９】

一部の実施形態では、ＡＡＶ送達ベクターは、２つのＡＡＶ逆位末端リピート（ＩＴＲ）及び目的のヌクレオチド配列（例えば、遺伝子組換えポリペプチド若しくはＤＮＡ鋳型

又はその両方をコードする配列）を有するベクターであり、前記ＩＴＲはそれぞれ中断された（又は不連続な）パリンドローム配列、すなわち、３つのセグメント：５’→３’で読むと同一であるが、互いに反対に配置するとハイブリダイズする、最初のセグメント及び最後のセグメント並びに同一のセグメントを分離する異なるセグメントから構成される配列を有する。例えば、国際公開第２０１２１２３４３０号パンフレットを参照されたい。

【０５１０】

従来、カプシドを有するＡＡＶビリオンは、ｒＡＡＶ又はｓｃＡＡＶゲノム、Ｒｅｐタンパク質、及びＣａｐタンパク質をコードする１つ又は複数のプラスミドを導入することによって産生される（Ｇｒｉｍｍ　ｅｔ　ａｌ，１９９８）。これらのヘルパープラスミドがトランスで導入されると、ＡＡＶゲノムは宿主ゲノムから「レスキュー」され（すなわち、放出され、その後回復される）、更にカプシド化されて感染性ＡＡＶが産生される。一部の実施形態では、１つ又は複数の遺伝子組換え核酸は、ＩＴＲ隣接核酸をヘルパー機能と一緒にパッケージング細胞に導入することにより、ＡＡＶ粒子にパッケージングされる。

【０５１１】

一部の実施形態では、ＡＡＶゲノムは、ＩＴＲ間に位置する配列が、所望の核酸配列の逆相補体に加えて、所望の核酸配列（例えば、遺伝子組換えポリペプチド又は鋳型をコードするＤＮＡ、又はその両方）の両方を含み、これら２つの成分が折り畳まれて自己ハイブリダイズできるようにするように、いわゆる自己相補性ゲノム（ｓｃＡＡＶと呼ばれる）である。一部の実施形態では、自己相補性モジュールは、ＤＮＡがそれ自体に折り畳まれる（例えば、ステムループを形成する）ことを可能にする介在配列によって分離される。ｓｃＡＡＶには、最初にＩＴＲプライミングと第２の鎖合成に依存してｄｓＤＮＡを形成するのではなく、核に入ると転写の準備ができているという利点がある。一部の実施形態では、１つ又は複数の遺伝子組換え成分がｓｃＡＡＶとして設計され、ここで、ＡＡＶＩＴＲ間の配列は、自己ハイブリダイズしてｄｓＤＮＡを生成することができる２つの逆相補モジュールを含む。

【０５１２】

一部の実施形態では、細胞に送達される核酸（例えば、ポリペプチド、又は鋳型、又はその両方をコードする）は、閉鎖型線状デュープレックスＤＮＡ（ＣＥＬｉＤ　ＤＮＡ又はｃｅＤＮＡ）である。一部の実施形態では、ｃｅＤＮＡは、ＡＡＶゲノムの複製形態に由来する（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　２０１３）。一部の実施形態では、核酸（例えば、ポリペプチド若しくは鋳型ＤＮＡ、又はその両方をコードする）は、ＩＴＲ、例えば、ＡＡＶ　ＩＴＲによって隣接され、ここで、ＩＴＲの少なくとも１つは、末端分解部位及び複製タンパク質結合部位（複製タンパク質結合部位と呼ばれることもある）を含む。一部の実施形態では、ＩＴＲは、アデノ随伴ウイルス、例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、又はそれらの組み合わせに由来する。一部の実施形態では、ＩＴＲは対称的である。一部の実施形態では、ＩＴＲは非対称的である。一部の実施形態では、構築物の複製を可能にするために、少なくとも１つのＲｅｐタンパク質が提供される。一部の実施形態では、少なくとも１つのＲｅｐタンパク質は、アデノ随伴ウイルス、例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、又はそれらの組み合わせに由来する。一部の実施形態では、ｃｅＤＮＡは、産生細胞に、（ｉ）ＩＴＲ、例えば、ＡＡＶ　ＩＴＲが隣接するＤＮＡ、及び（ｉｉ）ＩＴＲ依存性複製に必要な成分、例えばＡＡＶタンパク質Ｒｅｐ７８及びＲｅｐ５２（又はタンパク質をコードする核酸）を提供することによって生成される。一部の実施形態では、ｃｅＤＮＡは、カプシドタンパク質を含まず、例えば、感染性ＡＡＶ粒子にパッケージングされていない。一部の実施形態では、ｃｅＤＮＡはＬＮＰに製剤化される（例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ１号パンフレットを参照）。

【０５１３】

一部の実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、２つの自己相補的配列、例えば、本明細書で定義される非対称又は対称又は実質的に対称なＩＴＲからなり、前記発現カセットに隣接し、ここで、ｃｅＤＮＡベクターはカプシドタンパク質と会合していない。一部の実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、ＡＡＶゲノムに見出される２つの自己相補性配列を含み、ここで、少なくとも１つのＩＴＲは、作動可能なＲｅｐ結合エレメント（ＲＢＥ）（本明細書では「ＲＢＳ」とも呼ばれることもある）及びＡＡＶ又はＲＢＥの機能的バリアントの末端分解部位（ｔｒｓ）を含む。例えば、国際公開第２０１９１１３３１０号パンフレットを参照されたい。

【０５１４】

一部の実施形態では、ＡＡＶゲノムは、４つの複製タンパク質及び３つのカプシドタンパク質をそれぞれコードする２つの遺伝子を含む。一部の実施形態では、これらの遺伝子は、１４５ｂｐ逆位末端配列（ＩＴＲ）により両側がフランキングされている。一部の実施形態では、ビリオンは、例えば、１：１：１０の比で産生される、最大３つのカプシドタンパク質（Ｖｐ１、Ｖｐ２、及び／又はＶｐ３）を含む。一部の実施形態では、カプシドタンパク質は、同じオープンリーディングフレーム及び／又は異なるスプライシング（Ｖｐ１）並びに別の翻訳開始部位（それぞれＶｐ２及びＶｐ３）から産生される。一般に、Ｖｐ３は、ビリオン中で最も豊富なサブユニットであり、細胞表面での受容体認識に参加して、ウイルスの屈性を定める。一部の実施形態では、Ｖｐ１は、例えばＶｐ１のＮ末端において、ウイルスの感染力において機能するホスホリパーゼドメインを含む。

【０５１５】

一部の実施形態では、ウイルスベクターのパッケージング能力は、ベクターにパッケージングされ得る遺伝子組換えシステムのサイズを制限する。例えば、ＡＡＶのパッケージング能力は、例えば、１つ又は２つの逆位末端配列（ＩＴＲ）、例えば、１４５塩基ＩＴＲを含め、約４．５ｋｂ（例えば、約３．０、３．５、４．０、４．５、５．０、５．５若しくは６．０ｋｂ）であり得る。

【０５１６】

一部の実施形態では、組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）は、ベクター導入遺伝子カセットをフランキングするシス作用性１４５ｂｐ　ＩＴＲを含み、例えば、外来ＤＮＡのパッケージングのために最大４．５ｋｂを提供する。感染の後、ｒＡＡＶは、いくつかの事例において、本発明の融合タンパク質を発現し、円形の頭－尾コンカテマー内にエピソームとして存在することにより、宿主ゲノムに組み込まれることなく存続する。ｒＡＡＶは、例えば、インビトロ及びインビボで使用することができる。一部の実施形態では、ＡＡＶ媒介遺伝子送達のためには、遺伝子のコーディング配列の長さが野生型ＡＡＶゲノムと等しいか、又はそれ以上である必要がある。

【０５１７】

上記サイズを超える遺伝子のＡＡＶ送達及び／又は大きい生理学的調節エレメントの使用は、例えば、送達しようとするタンパク質を２つ以上の断片に分割することにより、達成することができる。一部の実施形態では、Ｎ－末端断片をインテイン－Ｎ配列と融合させる。一部の実施形態では、Ｃ－末端断片をインテイン－Ｃ配列と融合させる。複数の実施形態では、上記断片を２つ以上のＡＡＶベクターにパッケージングする。

【０５１８】

一部の実施形態では、大きい導入遺伝子発現カセットを２つの個別の半分（５’及び３’末端、又は頭及び尾）に分割することにより、デュアルＡＡＶベクターを作製し、例えば、カセットの各半分を単一のＡＡＶベクター（＜５ｋｂ）にパッケージングする。次に、一部の実施形態では、両方のデュアルＡＡＶベクターによる同じ細胞の同時感染時に、完全長導入遺伝子発現カセットの再アセンブリーを達成することができる。一部の実施形態では、同時感染の後に、（１）５’及び３’ゲノム同士の相同組換え（ＨＲ）（デュアルＡＡＶ重複ベクター）；（２）ＩＴＲ媒介による５’及び３’ゲノムの尾－頭コンカテマー化（デュアルＡＡＶトランス－スプライシングベクター）；及び／又は（３）これら２つの機構の組合せ（デュアルＡＡＶハイブリッドベクター）の１つ若しくは複数が続く。一部

の実施形態では、インビボでのデュアルＡＡＶベクターの使用により、完全長タンパク質の発現が達成される。一部の実施形態では、デュアルＡＡＶベクタープラットフォームの使用は、サイズが約４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、又は５．０ｋｂ超の導入遺伝子のための効率的且つ実行可能な遺伝子移入戦略を表している。一部の実施形態では、ＡＡＶベクターは、例えば、核酸及びペプチドのインビトロ生産において、標的核酸で細胞を形質導入するために使用することもできる。一部の実施形態では、ＡＡＶベクターは、インビボ及びエクスビボ遺伝子療法手順に使用することができる（例えば、Ｗｅｓｔ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １６０：３８－４７（１９８７）；米国特許第４，７９７，３６８号明細書；国際公開第９３／２４６４１号パンフレット；Ｋｏｔｉｎ，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５：７９３－８０１（１９９４）；Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９４：１３５１（１９９４）を参照されたい；尚、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。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、そうしたものとして、米国特許第５，１７３，４１４号明細書；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）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）が挙げられる。

【０５１９】

一部の実施形態では、本明細書に記載の遺伝子組換えポリペプチド（例えば、１つ若しくは複数のガイド核酸を含む、又は含まない）は、ＡＡＶ、レンチウイルス、アデノウイルス、又は他のプラスミド若しくはウイルスベクタータイプを用いて送達することができ、とりわけ、例えば、米国特許第８，４５４，９７２号明細書（アデノウイルス用の製剤、用量）、米国特許第８，４０４，６５８号明細書（ＡＡＶ用の製剤、用量）、及び米国特許第５，８４６，９４６号明細書（ＤＮＡプラスミド用の製剤、用量）並びにレンチウイルス、ＡＡＶ及びアデノウイルスに関係する臨床試験及びそうした臨床試験に関する刊行物から得られる製剤及び用量を用いて、送達することができる。例えば、ＡＡＶの場合、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第８，４５４，９７２号明細書に記載される通り、及びＡＡＶに関係する臨床試験に記載の通りであり得る。アデノウイルスの場合、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第８，４０４，６５８号明細書に記載される通り、及びアデノウイルスに関係する臨床試験に記載の通りであり得る。プラスミド送達の場合、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第５，８４６，９４６号明細書に記載される通り、及びプラスミドに関係する臨床試験に記載の通りであり得る。用量は、平均７０ｋｇの個体（例えば、成人男性）を基準とするか又はそれに外挿され得、異なる体重及び種の患者、対象、哺乳動物について調節することができる。投与頻度は、患者又は対象の年齢、性別、健康全般、他の状態を含む通常の要因並びに対処しようとする具体的な病状又は症状に応じて、医学又は獣医療専門家（例えば、医師、獣医師）の範囲内である。一部の実施形態では、ウイルスベクターを目的の組織に注射することができる。細胞型特異的遺伝子組換えの場合、遺伝子組換えポリペプチド及び任意選択のガイド核酸の発現は、一部の実施形態では、細胞型特異的プロモータによって駆動することができる。

【０５２０】

一部の実施形態では、ＡＡＶは、免疫応答を活性化し得る細胞粒子の超遠心分離を必要としない精製方法のために、低毒性を可能にする。一部の実施形態では、ＡＡＶは、例えば、それが実質的に宿主ゲノムに組み込まれないことから、挿入突然変異誘発を引き起こす低い可能性を可能にする。

【０５２１】

一部の実施形態では、ＡＡＶは、約４．４、４．５、４．６、４．７、又は４．７５ｋｂのパッケージング限度を有する。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドコー

ド化配列、プロモータ、及び転写終結因子は、単一のウイルスベクターに適合し得る。ＳｐＣａｓ９（４．１ｋｂ）は、いくつかの事例では、ＡＡＶにパッケージングするのが困難であり得る。従って、一部の実施形態では、他の遺伝子組換えポリペプチドコード配列又は塩基編集因子より長さが短い遺伝子組換えポリペプチドコード配列が使用される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドコード化配列は、約４．５ｋｂ、４．４ｋｂ、４．３ｋｂ、４．２ｋｂ、４．１ｋｂ、４ｋｂ、３．９ｋｂ、３．８ｋｂ、３．７ｋｂ、３．６ｋｂ、３．５ｋｂ、３．４ｋｂ、３．３ｋｂ、３．２ｋｂ、３．１ｋｂ、３ｋｂ、２．９ｋｂ、２．８ｋｂ、２．７ｋｂ、２．６ｋｂ、２．５ｋｂ、２ｋｂ、又は１．５ｋｂ未満である。

【０５２２】

ＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５又はそれらの任意の組合せであり得る。一部の実施形態では、ＡＡＶの種類は、ターゲティングしようとする細胞に関して選択され；例えば、脳又はニューロン細胞をターゲティングするためには、ＡＡＶ血清型１、２、５若しくはハイブリッドカプシドＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５又はそれらの任意の組合せを選択することができるか；又は心臓組織をターゲティングするためにＡＡＶ４を選択することができる。一部の実施形態では、肝臓への送達のために、ＡＡＶ８を選択する。これらの細胞に関する例示的なＡＡＶ血清型は、例えば、Ｇｒｉｍｍ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．８２：５８８７－５９１１（２００８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。一部の実施形態では、ＡＡＶは、あらゆる血清型、サブタイプ、及び天然に存在するＡＡＶ並びに組換えＡＡＶを指す。ＡＡＶが用いられるとき、ウイルス自体又はその誘導体を指す場合もある。一部の実施形態では、ＡＡＶとして、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６．２、ＡＡＶ７、ＡＡＶｒｈ．６４Ｒｌ、ＡＡＶｈｕ．３７、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．３２．３３、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ－ＤＪ、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶｒｈｌＯ、ＡＡＶＬＫ０３、ＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ　１２、ｒｈｌＯ、及びそれらのハイブリッド、トリＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ウマＡＡＶ、霊長類ＡＡＶ、非霊長類ＡＡＶ、及びヒツジＡＡＶが挙げられる。ＡＡＶの様々な血清型のゲノム配列並びにネイティブ末端反復（ＴＲ）、Ｒｅｐタンパク質及びカプシドサブユニットの配列は、当技術分野で公知である。こうした配列は、文献又はＧｅｎＢａｎｋなどの公式データベースで見出すことができる。別の例示的なＡＡＶ血清型を表１８に挙げる。

【０５２３】

【表１８】

表 18. 例示的な AAV 血清型。

標的組織	ビヒクル	参照文献
肝臓	AAV (AAV8[1], AAVrh.8[1], AAVhu.37[1], AAV2/8, AAV2/rh10[2], AAV9, AAV2, NP40[3], NP59[2,3], AAV3B[5], AAV-DJ[4], AAV-LK01[4], AAV-LK02[4], AAV-LK03[4], AAV-LK19[4], AAV5[7] アデノウイルス (Ad5, HC-AdV[6])	1. Wang *et al.*, *Mol. Ther.* **18**, 118-25 (2010) 2. Ginn *et al.*, *JHEP Reports*, 100065 (2019) 3. Paulk *et al.*, *Mol. Ther.* **26**, 289-303 (2018). 4. L. Lisowski *et al.*, *Nature*. **506**, 382-6 (2014). 5. L. Wang *et al.*, *Mol. Ther.* **23**, 1877-87 (2015). 6. Hausl *Mol Ther* (2010) 7. Davidoff *et al.*, *Mol. Ther.* 11, 875-88 (2005)
肺	AAV (AAV4, AAV5, AAV6[1], AAV9, H22[2]) アデノウイルス (Ad5, Ad3, Ad21, Ad14)[3]	1. Duncan *et al.*, *Mol Ther Methods Clin Dev* (2018) 2. Cooney *et al.*, Am J Respir Cell Mol Biol (2019) 3. Li *et al.*, *Mol Ther Methods Clin Dev* (2019)
皮膚	AAV (AAV6[1], AAV-LK19[2])	1. Petek et al., *Mol. Ther.* (2010) 2. L. Lisowski *et al.*, *Nature*. **506**, 382-6 (2014).
HSC	アデノウイルス (HDAd5/35^{++})	Wang et al. *Blood Adv* (2019)

【０５２４】

一部の実施形態では、医薬組成物（例えば、本明細書に記載のＡＡＶを含む）は、１０％未満の空のカプシド、８％未満の空のカプシド、７％未満の空のカプシド、５％未満の空のカプシド、３％未満の空のカプシド、又は１％未満の空のカプシドを有する。一部の実施形態では、医薬組成物は、約５％未満の空のカプシドを有する。一部の実施形態では、空のカプシドの数は、検出限界未満である。一部の実施形態では、例えば、空のカプシドは、有害な反応（例えば、免疫応答、炎症性応答、肝臓の反応、及び／又は心臓の反応）を起こす恐れがあり、例えば、実質的な治療利益がほとんど若しくは全くないことから、医薬組成物は少量の空のカプシドを有するのが有利である。

【０５２５】

一部の実施形態では、医薬組成物中の残留宿主細胞タンパク質（ｒＨＣＰ）は、１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり１００ｎｇ／ｍｌ以下のｒＨＣＰ、例えば、１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり４０ｎｇ／ｍｌ以下のｒＨＣＰ又は１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり１～５０ｎｇ／ｍｌのｒＨＣＰである。一部の実施形態では、医薬組成物は、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり１０ｎｇ未満のｒＨＣＰ若しくは１．０×１０^{13}ｖｇ当たり５ｎｇ未満のｒＨＣＰ、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり４ｎｇ未満のｒＨＣＰ若しくは１．０×１０^{13}ｖｇ当たり３ｎｇ未満のｒＨＣＰ、又はこれらの間の任意の濃度を含む。一部の実施形態では、医薬組成物中の残留宿主細胞ＤＮＡ（ｈｃＤＮＡ）は、１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり５×１０^{6}ｐｇ／ｍｌ以下のｈｃＤＮＡ、１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり１．２×１０^{6}ｐｇ／ｍｌ以下のｈｃＤＮＡ、又は１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり１×１０^{5}ｐｇ／ｍｌのｈｃＤＮＡである。一部の実施形態では、前記医薬組成物中の残留宿主細胞ＤＮＡは、１×１０^{13}ｖｇ当たり５．０×１０^{5}ｐｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり２．０×１０^{5}ｐｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり１．１×１０^{5}ｐｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり１．０×１０^{5}ｐｇ未満のｈｃＤＮＡ、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．９×１０^{5}ｐｇ未満のｈｃＤＮＡ、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．８×１０^{5}ｐｇ未満のｈ

ｃＤＮＡ又はこれらの間の任意の濃度である。
【０５２６】
一部の実施形態では、医薬組成物中の残留プラスミドＤＮＡは、１．０×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり１．７×１０^{5}ｐｇ／ｍｌ以下、１×１．０×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり１×１０^{5}ｐｇ／ｍｌ、又は１．０×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり１．７×１０^{6}ｐｇ／ｍｌである。一部の実施形態では、医薬組成物中の残留ＤＮＡプラスミドは、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり１０．０×１０^{5}ｐｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり８．０×１０^{5}ｐｇ未満、又は１．０×１０^{13}ｖｇ当たり６．８×１０^{5}ｐｇ未満である。一部の実施形態では、医薬組成物は、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．５ｎｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．３ｎｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．２２ｎｇ未満若しくは１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．２ｎｇ未満、又は任意の中間濃度のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含む。複数の実施形態では、医薬組成物中のベンゾナーゼは、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．２ｎｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．１ｎｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．０９ｎｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．０８ｎｇ未満、又は任意の中間濃度である。複数の実施形態では、医薬組成物中のポロキサマー１８８は、約１０～１５０ｐｐｍ、約１５～１００ｐｐｍ又は約２０～８０ｐｐｍである。複数の実施形態では、医薬組成物中のセシウムは、５０ｐｇ／ｇ（ｐｐｍ）未満、３０ｐｇ／ｇ（ｐｐｍ）未満若しくは２０ｐｇ／ｇ（ｐｐｍ）未満、又は任意の中間濃度である。
【０５２７】
複数の実施形態では、医薬組成物は、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより測定して、１０％未満、８％未満、７％未満、６％未満、５％未満、４％未満、３％未満、２％未満又はそれらの間の任意のパーセンテージの総不純物を含む。複数の実施形態では、総不純物は、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより測定して、９０％超、９２％超、９３％超、９４％超、９５％超、９６％超、９７％超、９８％超又はそれらの間の任意のパーセンテージである。複数の実施形態では、単一の不特定関連不純物はいずれも、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより測定して、５％超、４％超、３％超若しくは２％超又はそれらの間の任意のパーセンテージである。複数の実施形態では、医薬組成物は、総カプシド（分析用超遠心により測定して、ピーク１＋ピーク２）に対して、８５％超、８６％超、８７％超、８８％超、８９％超、９０％超、９１％超、９１．９％超、９２％超、９３％超のパーセンテージ又はそれらの間の任意のパーセンテージの充填カプシドを含む。医薬組成物の複数の実施形態では、分析用超遠心によりピーク１で測定した充填カプシドのパーセンテージは、２０～８０％、２５～７５％、３０～７５％、３５～７５％、又は３７．４～７０．３％である。医薬組成物の複数の実施形態では、分析用超遠心によりピーク２で測定した充填カプシドのパーセンテージは、２０～８０％、２０～７０％、２２～６５％、２４～６２％、又は２４．９～６０．１％である。
【０５２８】
一実施形態では、医薬組成物は、１．０～５．０×１０^{13}ｖｇ／ｍＬ、１．２～３．０×１０^{13}ｖｇ／ｍＬ、又は１．７～２．３×１０^{13}ｖｇ／ｍｌのゲノム力価を含む。一実施形態では、医薬組成物は、５ＣＦＵ／ｍＬ未満、４ＣＦＵ／ｍＬ未満、３ＣＦＵ／ｍＬ未満、２ＣＦＵ／ｍＬ未満若しくは１ＣＦＵ／ｍＬ未満、又は任意の中間濃度の生物学的負荷を示す。複数の実施形態では、ＵＳＰ、例えば、ＵＳＰ＜８５＞（その全体が参照により組み込まれる）に従うエンドトキシンの量は、１．０ＥＵ／ｍＬ未満、０．８ＥＵ／ｍＬ未満、又は０．７５ＥＵ／ｍＬ未満である。複数の実施形態では、ＵＳＰ、例えば、ＵＳＰ＜７８５＞（その全体が参照により組み込まれる）に従う医薬組成物の浸透圧は、３５０～４５０ｍＯｓｍ／ｋｇ、３７０～４４０ｍＯｓｍ／ｋｇ又は３９０～４３０ｍＯｓｍ／ｋｇである。複数の実施形態では、医薬組成物は、容器当たり１２００個未満の２５μｍ超の粒子、容器当たり１０００個未満の２５μｍ超の粒子、容器当たり５００個未満の２５μｍ超の粒子、又は任意の中間値を含有する。複数の実施形態では、医薬組成物は、容器当たり１０，０００個未満の１０μｍ超の粒子、容器当たり８０００個未満の１０μｍ超の粒子又は容器当たり６００個未満の１０ｐｍ超の粒子を含有する。

【０５２９】
一実施形態では、医薬組成物は、０．５～５．０×１０^{13}ｖｇ／ｍＬ、１．０～４．０×１０^{13}ｖｇ／ｍＬ、１．５～３．０×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ又は１．７～２．３×１０^{13}ｖｇ／ｍｌのゲノム力価を有する。一実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、以下の１つ又は複数を含む：１．０×１０^{13}ｖｇ当たり約０．０９ｎｇ未満のベンゾナーゼ、約３０ｐｇ／ｇ（ｐｐｍ）未満のセシウム、約２０～８０ｐｐｍのポロキサマー１８８、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり約０．２２ｎｇ未満のＢＳＡ、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり約６．８×１０^{5}ｐｇ未満の残留ＤＮＡプラスミド、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり約１．１×１０^{5}ｐｇ未満の残留ｈｃＤＮＡ、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり約４ｎｇ未満のｒＨＣＰ、ｐＨ７．７～８．３、約３９０～４３０ｍＯｓｍ／ｋｇ、容器当たり約６００個未満の粒径＞２５μｍの粒子、容器当たり約６０００個未満の粒径＞１０μｍの粒子、約１．７×１０^{13}～２．３×１０^{13}ｖｇ／ｍＬのゲノム力価、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり約３．９×１０^{8}～８．４×１０^{10}ＩＵの感染力価、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり約１００～３００ｐｇの総タンパク質、約７．５×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ用量のウイルスベクターを用いたＡ７ＳＭＡマウスで＞２４日の平均生存期間、インビトロ細胞アッセイに基づき約７０～１３０％の相対効力及び／又は約５％未満の空のカプシド。様々な実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、本明細書で扱うウイルス粒子のいずれかを含み、参照基準の±２０％、±１５％、±１０％又は±５％の効力を保持する。一部の実施形態では、好適なインビトロ細胞アッセイ又はインビボ動物モデルを用いて、効力を測定する。

【０５３０】
ＡＡＶ粒子の別の調製、特性決定、及び投与方法は、国際公開第２０１９０９４２５３号パンフレット（その全体が、参照により本明細書に組み込まれる）に教示されている。

【０５３１】
本発明と一致して使用することができる別のｒＡＡＶ構築物として、表１を含め、／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３８／ｓ４１５７３－０１９－００１２－９で入手可能なＷａｎｇ　ｅｔ　ａｌ　２０１９（その全体が、参照により組み込まれる）に記載されているものが挙げられる。

【０５３２】
脂質ナノ粒子
本明細書で提供される方法及びシステムは、特定の実施形態では、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を含む任意の好適な担体又は送達方法を含み得る。脂質ナノ粒子は、一部の実施形態において、１つ若しくは複数のイオン脂質、例えば、非カチオン脂質（例えば、中性若しくはアニオン、又は双性イオン脂質）；１つ若しくは複数の共役脂質（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレットの表５に記載される、ＰＥＧ共役脂質又はポリマーと共役した脂質など）；１つ若しくは複数のステロール（例えば、コレステロール）；並びに任意選択で１つ若しくは複数のターゲティング分子（例えば、共役受容体、受容体リガンド、抗体）；又はこれらの組合せを含む。

【０５３３】
ナノ粒子形成（例えば、脂質ナノ粒子）に使用することができる脂質として、例えば、国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の表４に記載されるものが挙げられ、例えば、脂質含有ナノ粒子は、国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレットの表４に示される脂質の１つ又は複数を含み得る。脂質ナノ粒子は、ポリマー、例えば、国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の表５に記載されるポリマーなどの別の要素を含み得る。

【０５３４】
一部の実施形態では、共役脂質は、存在する場合、ＰＥＧ－ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）（例えば、１－（モノメトキシ－ポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ））、ＰＥＧ－ジアルキルオキシプロピル（ＤＡＡ）

、ＰＥＧ－リン脂質、ＰＥＧ－セラミド（Ｃｅｒ）、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）、ＰＥＧ－コハク酸ジアシルグリセロール（ＰＥＧＳ－ＤＡＧ）（例えば、４－０－（２’，３’－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル－１－０－（ｗ－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオエート（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ））、ＰＥＧジアルコキシプロピルカルバム、Ｎ－（カルボニル－１－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ナトリウム塩及び国際公開第２０１９０５１２８９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）並びにこれらの組合せの１つ又は複数を含む。

【０５３５】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子に組み込むことができるステロールは、コレステロール又はこれらのコレステロール誘導体、例えば、国際公開第２００９／１２７０６０号パンフレット又は米国特許出願公開第２０１０／０１３０５８８号明細書（参照により本明細書に組み込まれる）に記載のものなどを含む。別の例示的なステロールとして、フィトステロールが挙げられ、Ｅｙｇｅｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ（２０２０），ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０２１／ａｃｓ．ｎａｎｏｌｅｔｔ．０ｃ０１３８６（参照により本明細書に組み込まれる）に記載のものを含む。

【０５３６】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、イオン化性脂質、非カチオン脂質、粒子の凝集を阻害する共役脂質、及びステロールを含む。これらの成分の量は、独立して、且つ所望の特性を達成するように変動し得る。例えば、一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、総脂質の約２０ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％の量のイオン化性脂質（他の実施形態では、それは、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の２０～７０％（ｍｏｌ）、３０～６０％（ｍｏｌ）若しくは４０～５０％（ｍｏｌ）；約５０ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％であり得る）、総脂質の約５ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％の量の非カチオン脂質、総脂質の約０．５ｍｏｌ％～約２０ｍｏｌ％の量の共役脂質、及び総脂質の約２０ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％の量のステロールを含む。核酸（例えば、遺伝子組換えポリペプチド又は鋳型核酸をコードする）に対する総脂質の比は、要望に応じて変動し得る。例えば、核酸に対する総脂質（質量又は重量）は、約１０：１～約３０：１であり得る。

【０５３７】

一部の実施形態では、イオン化性脂質は、カチオン性脂質、イオン化性カチオン性脂質、例えば、ｐＨに応じて正に帯電した形態又は中性の形態で存在することができるカチオン性脂質、又は容易にプロトン化され得るアミン含有脂質であり得る。一部の実施形態では、カチオン性脂質は、例えば生理学的条件下で、正に荷電することができる脂質である。例示的なカチオン性脂質には、正電荷を保持する１つ又は複数のアミン基が含まれる。一部の実施形態では、脂質粒子は、中性脂質、イオン化性アミン含有脂質、生分解性アルキン脂質、ステロイド、多価不飽和脂質を含むリン脂質、構造脂質（例えば、ステロール）、ＰＥＧ、コレステロール及びポリマー共役脂質の１つ又は複数とともに、製剤中にカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、カチオン性脂質は、イオン化可能なカチオン性脂質であり得る。本明細書に開示される例示的なカチオン性脂質は、６．０を超える有効ｐＫａを有し得る。実施形態では、脂質ナノ粒子は、第１カチオン性脂質と異なる有効ｐＫａ（例えば、第１有効ｐＫａより大きい）を有する第２カチオン性脂質を含み得る。脂質ナノ粒子は、脂質ナノ粒子内に封入されているか、又はそれと会合している、４０～６０モルパーセントのカチオン性脂質、中性脂質、ステロイド、ポリマー共役脂質、及び治療剤、例えば、本明細書に記載の核酸（例えば、ＲＮＡ）（例えば、鋳型核酸又は遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸）を含み得る。一部の実施形態では、核酸はカチオン性脂質と共製剤化される。核酸は、ＬＮＰ、例えば、カチオン性脂質を含むＬＮＰの表面に吸着され得る。一部の実施形態では、核酸は、ＬＮＰ、例えば、カチオン性脂質を含むＬＮＰに封入され得る。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、例えば、ターゲティング剤でコーティングされたターゲティング部分を含み得る。実施形態では、ＬＮＰ製剤は生分解性である。一部の実施形態では、本明細書に記載の１つ又は複数の脂質、例えば

、式（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉ）、（ｖｉｉ）及び／又は（ｉｘ）を含む脂質ナノ粒子は、少なくとも１％、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は１００％のＲＮＡ分子、例えば、鋳型ＲＮＡ及び／又は遺伝子組換えポリペプチドをコードするｍＲＮＡを封入する。

【０５３８】

一部の実施形態では、脂質と核酸の比（質量／質量比；ｗ／ｗ比）は、約１：１～約２５：１、約１０：１～約１４：１、約３：１～約１５：１、約４：１～約１０：１、約５：１～約９：１、又は約６：１～約９：１の範囲であり得る。脂質及び核酸の量は、所望のＮ／Ｐ比、例えば、３、４、５、６、７、８、９、又は１０以上のＮ／Ｐ比を提供するように、調節することができる。一般に、脂質ナノ粒子製剤の総脂質含量は、約５ｍｇ／ｍｌ～約３０ｍｇ／ｍｌであり得る。

【０５３９】

脂質ナノ粒子製剤に使用することができる例示的なイオン化性脂質は、限定されないが、国際公開第２０１９０５１２８９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の表１に列挙されるものを含む。別の例示的な脂質として、限定されないが、以下の式の１つ若しくは複数が挙げられる：米国特許出願公開第２０１６／０３１１７５９号明細書のＸ；米国特許出願公開第２０１５０３７６１１５号又は米国特許第２０１６／０３７６２２４号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１６０１５１２８４号明細書のＩ、ＩＩ又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１７０２１０９６７号明細書のＩ、ＩＡ、ＩＩ、又はＩＩＡ；米国特許出願公開第２０１５０１４００７０号明細書のＩ－ｃ；米国特許出願公開第２０１３／０１７８５４１号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／０３０３５８７号又は米国特許第２０１３／０１２３３３８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１５／０１４１６７８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１５／０２３９９２６号明細書のＩＩ、ＩＩＩ、ＩＶ、又はＶ；米国特許出願公開第２０１７／０１１９９０４号明細書のＩ；国際公開第２０１７／１１７５２８号パンフレットのＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１２／０１４９８９４号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１５／００５７３７３号明細書のＡ；国際公開第２０１３／１１６１２６号パンフレットのＡ；米国特許出願公開第２０１３／００９０３７２号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／０２７４５２３号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／０２７４５０４号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／００５３５７２号明細書のＡ；国際公開第２０１３／０１６０５８号パンフレットのＡ；国際公開第２０１２／１６２２１０号パンフレットのＡ；米国特許出願公開第２００８／０４２９７３号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１２／０１２８７６７０号明細書のＩ、ＩＩ、ＩＩＩ又はＩＶ；米国特許出願公開第２０１４／０２００２５７号明細書のＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１５／０２０３４４６号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１５／０００５３６３号明細書のＩ又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１４／０３０８３０４号明細書のＩ、ＩＡ、ＩＢ、ＩＣ、ＩＤ、ＩＩ、ＩＩＡ、ＩＩＢ、ＩＩＣ、ＩＩＤ、又はＩＩＩ－ＸＸＩＶ；米国特許出願公開第２０１３／０３３８２１０号明細書の；国際公開第２００９／１３２１３１号パンフレットのＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、又はＩＶ；米国特許出願公開第２０１２／０１０１１４７８号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１２／００２７７９６号明細書のＩ又はＸＸＸＶ；米国特許出願公開第２０１２／００５８１４４号明細書のＸＩＶ又はＸＶＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０３２３２６９号明細書の；米国特許出願公開第２０１１／０１１７１２５号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１１／０２５６１７５号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１２／０２０２８７１号明細書のＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、ＩＶ、Ｖ、ＶＩ、ＶＩＩ、ＶＩＩＩ、ＩＸ、Ｘ、ＸＩ、ＸＩＩ；米国特許出願公開第２０１１／００７６３３５号明細書のＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、ＩＶ、Ｖ、ＶＩ、ＶＩＩ、ＶＩＩＩ、Ｘ、ＸＩＩ、ＸＩＩＩ、ＸＩＶ、ＸＶ、又はＸＶＩ；米国特許出願公開第２００６／００８３７８号明細書のＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１

３／０１２３３３８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１５／００６４２４２号明細書のＩ又はＸ－Ａ－Ｙ－Ｚ；米国特許出願公開第２０１３／００２２６４９号明細書のＸＶＩ、ＸＶＩＩ、又はＸＶＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１１６３０７号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１１６３０７号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１０／００６２９６７号明細書のＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１８９３５１号明細書のＩ～Ｘ；米国特許出願公開第２０１４／００３９０３２号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書のＶ；米国特許出願公開第２０１６／０３１７４５８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１９５９２０号明細書のＩ；米国特許第１０，２２１，１２７号明細書の５、６、又は１０；国際公開第２０１８／０８１４８０号パンフレットのＩＩＩ－３；国際公開第２０２０／０８１９３８号パンフレットのＩ－５又はＩ－８；米国特許第９，８６７，８８８号明細書の１８又は２５；米国特許出願公開第２０１９／０１３６２３１号明細書のＡ；国際公開第２０２０／２１９８７６号パンフレットのＩＩ；米国特許出願公開第２０１２／００２７８０３号明細書の１；米国特許出願公開第２０１９／０２４０３４９号明細書のＯＦ－０２；米国特許第１０，０８６，０１３号明細書の２３；Ｍｉａｏ　ｅｔ　ａｌ（２０２０）のｃＫＫ－Ｅ１２／Ａ６；国際公開第２０１０／０５３５７２号パンフレットのＣ１２－２００；Ｄａｈｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ（２０１７）の７Ｃ１；Ｗｈｉｔｅｈｅａｄ　ｅｔ　ａｌの３０４－Ｏ１３又は５０３－Ｏ１３；米国特許第９，７０８，６２８号明細書のＴＳ－Ｐ４Ｃ２；国際公開第２０２０／１０６９４６号パンフレットのＩ；国際公開第２０２０／１０６９４６号パンフレットのＩ。

【０５４０】

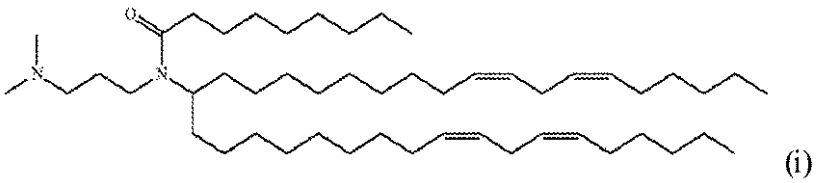
一部の実施形態では、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の実施例９に記載されているように、ＭＣ３（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３　ｌＺ）－ヘプタトリアコンター６，９，２８，３，ｌ－テトラエン－ｌ９－イル－４－（ジメチルペンチルアミノ）ブタノエート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ又はＭＣ３）である。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１０に記載されているように、脂質ＡＴＸ－００２である。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１１に記載されているように、（ｌ３Ｚ，ｌ６Ｚ）－Ａ，Ａ－ジメチル－３－ノニルドコサ－ｌ３、ｌ６－ジエン－１－アミン（化合物３２）である。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１２に記載されているように、化合物６又は化合物２２である。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、例えば、米国特許第９，８６７，８８８号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１に記載されている、ヘプタデカン－９－イル８－（（２－ヒドロキシエチル）（６－オキソ－６－（ウンデシルオキシ）ヘキシル）アミノ）オクタノエート（ＳＭ－１０２）である。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１５／０９５３４０号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１３で合成された、９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエート（ＬＰ０１）である。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、ジ（（Ｚ）－ノン－２－エン－１－イル）９－（（４－ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）であり、例えば、米国特許出願公開第２０１２／００２７８０３号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例７、８、又は９で合成される。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１０／０５３５７２号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１４及び１６で合成された、１，１’－（（２－（４－（２－（（２－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）ピペラジン－１

－イル）エチル）アザンジイル）ビス（ドデカン－２－オール）（Ｃ１２－２００）である。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）脂質（３Ｓ，１０Ｒ，１３Ｒ，１７Ｒ）－１０，１３－ジメチル－１７－（（Ｒ）－６－メチルヘプタン－２－イル）－２，３，４，７，８，９，１０，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－テトラデカヒドロ－１Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－３－イル３－（１Ｈ－イミダゾール－４－イル）プロパノエート、例えば、国際公開第２０２０／１０６９４６号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の構造（Ｉ）である。

【０５４１】

本明細書に記載の組成物、例えば、本明細書に記載の核酸（例えば、ＲＮＡ）（例えば、鋳型核酸又は遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸）、の送達のための脂質ナノ粒子を形成するために（例えば、他の脂質成分と組み合わせて）使用され得る脂質化合物のいくつかの非限定的な例は、

【化１３】



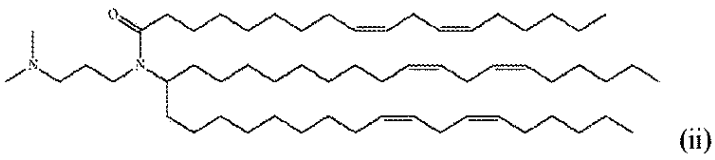
を含む。

【０５４２】

一部の実施形態では、式（ｉ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５４３】

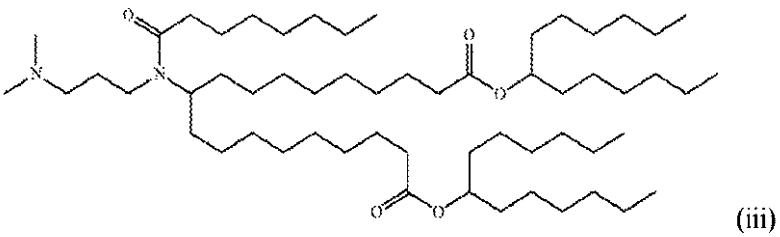
【化１４】



一部の実施形態では、式（ｉｉ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５４４】

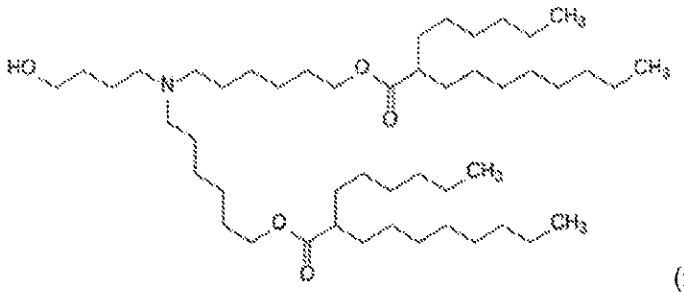
【化１５】



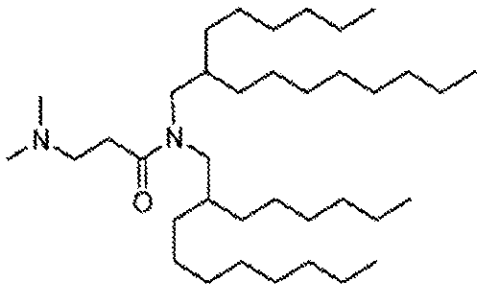
一部の実施形態では、式（ｉｉｉ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５４５】

【化１６】



(iv)

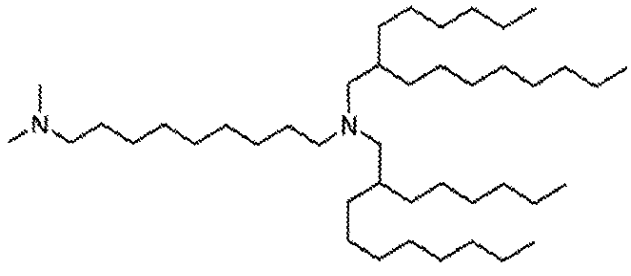


(v)

一部の実施形態では、式（ｖ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５４６】

【化１７】

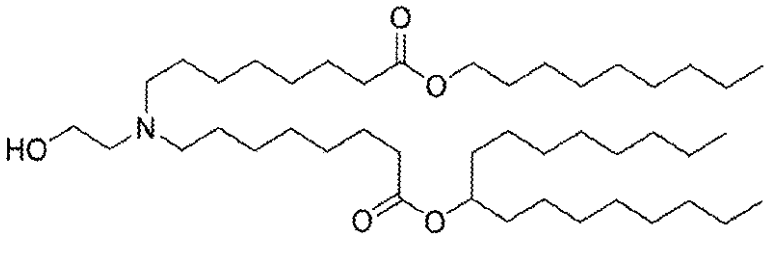


(vi)

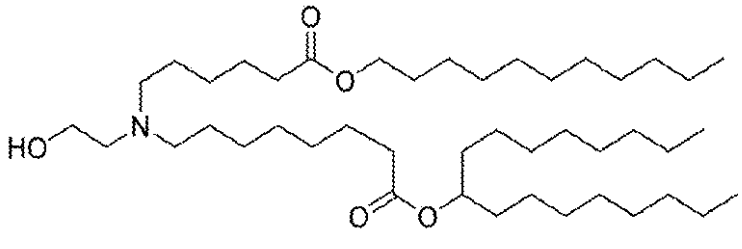
一部の実施形態では、式（ｖｉ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５４７】

【化１８】



(vii)

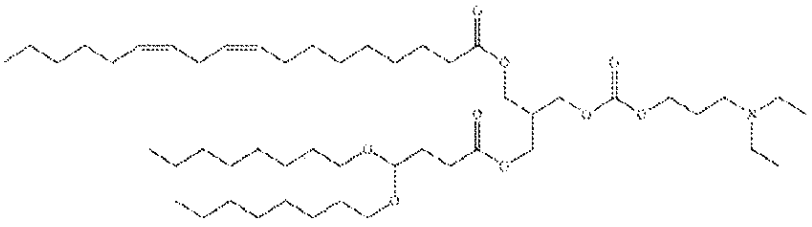


(viii)

一部の実施形態では、式（ｖｉｉｉ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５４８】

【化１９】

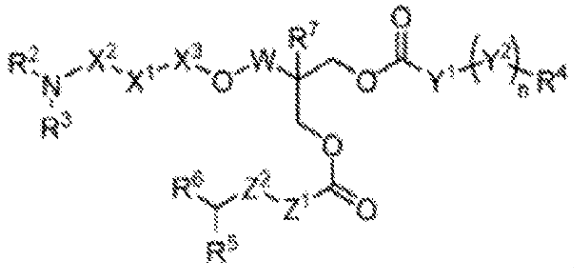


(ix)

一部の実施形態では、式（ｉｘ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５４９】

【化２０】

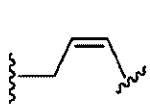


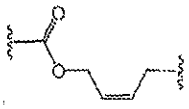
(x)

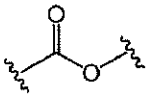
式中、

X^1はＯ、NR^1、又は直接結合であり、X^2はＣ２～５アルキレンであり、X^3はＣ（＝０）又は直接結合であり、R^1はＨ又はＭｅであり、R^3はＣｉ～３アルキルであり、R^2はＣｉ～３アルキルであるか、又はR^2はそれが結合している窒素原子及びX^2の１～３個の炭素原子と一緒になって、４、５、又は６員環を形成するか、又はX^1はNR^1、R^1及びR^2であり、それらが結合している窒素原子と一緒になって、５又は６員環を形成するか、又はR^2はR^3及びそれらが結合している窒素原子と一緒になって、５、６、又は７員環を形成し、Y^1はＣ２～１２アルキレンであり、Y^2は

【化２１】

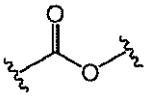

（いずれかの配向）、


（いずれかの配向）、


（いずれかの配向）

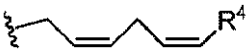
から選択され、ｎは０～３であり、Ｒ^{4}はＣｉ～１５アルキルであり、Ｚ^{1}はＣｉ～６アルキレン又は直接結合であり、Ｚ^{2}は

【化２２】



又は非存在であり、ただし、Ｚ^{1}が直接結合である場合、Ｚ^{2}は非存在であり；
Ｒ^{5}はＣ５～９アルキル又はＣ６～１０アルコキシであり、Ｒ^{6}はＣ５～９アルキル又はＣ６～１０アルコキシであり、Ｗはメチレン又は直接結合であり、Ｒ^{7}はＨ若しくはＭｅ、又はその塩であり、ただし、Ｒ^{3}及びＲ^{2}がＣ２アルキルである場合、Ｘ^{1}はＯであり、Ｘ^{2}は直鎖Ｃ３アルキレンであり、Ｘ^{3}はＣ（＝０）であり、Ｙ^{1}は直鎖Ｃｅアルキレンであり、（Ｙ^{2}）ｎ－Ｒ^{4}は

【化２３】



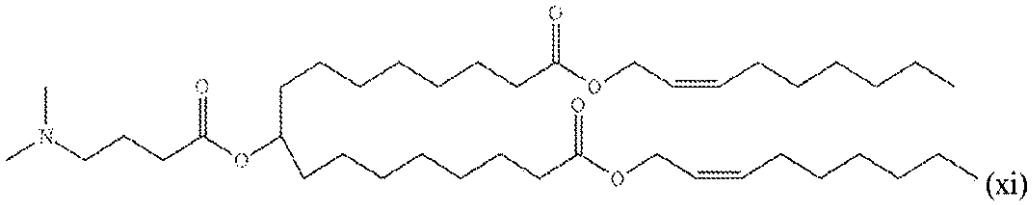
であり、Ｒ^{4}は直鎖Ｃ５アルキルであり、Ｚ^{1}はＣ２アルキレンであり、Ｚ^{2}は非存在であり、Ｗはメチレンであり、Ｒ^{7}はＨであり、Ｒ^{5}及びＲ^{6}はＣｘアルコキシでない。

【０５５０】

一部の実施形態では、式（ｘｉｉ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５５１】

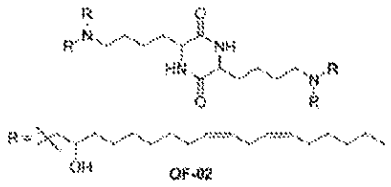
【化２４】

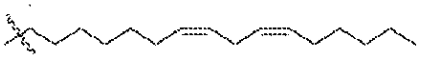

(xi)

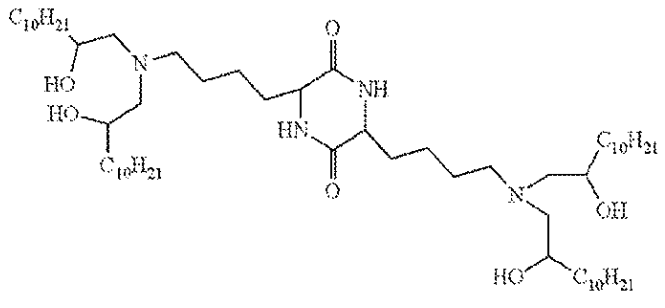
一部の実施形態では、式（ｘｉ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５５２】

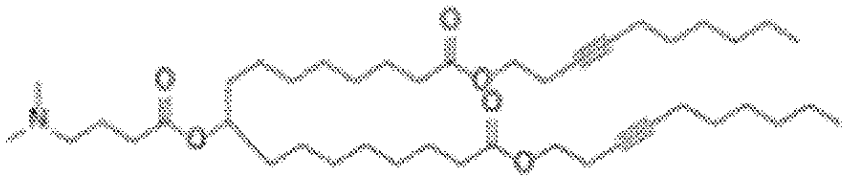
【化２５】



式中 R=  (xii)



(xiii)

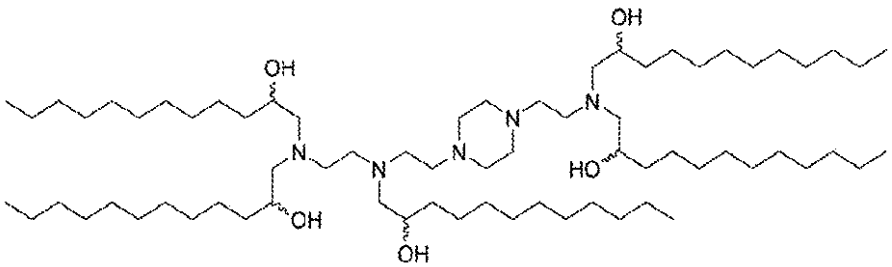


(xiv)

一部の実施形態では、ＬＮＰは、式（ｘｉｉｉ）の化合物及び式（ｘｉｖ）の化合物を含む。

【０５５３】

【化２６】

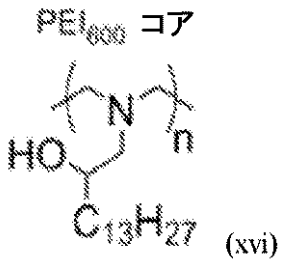


(xv)

一部の実施形態では、式（ｘｖ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５５４】

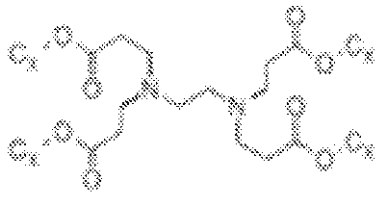
【化２７】



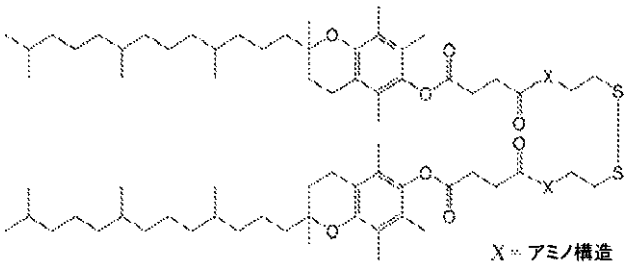
(xvi)

一部の実施形態では、式（ｘｖｉ）の製剤を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肺内皮細胞に送達する。

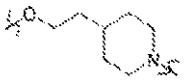
【化２８】



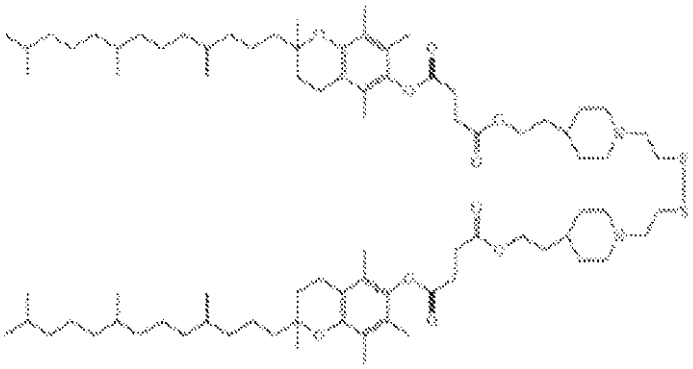
(xvii)



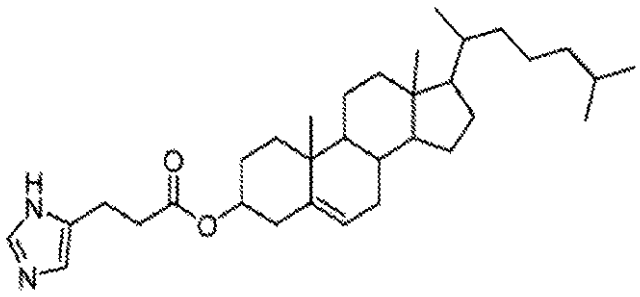
式中 X=



(xviii) (a)



(xviii)(b)

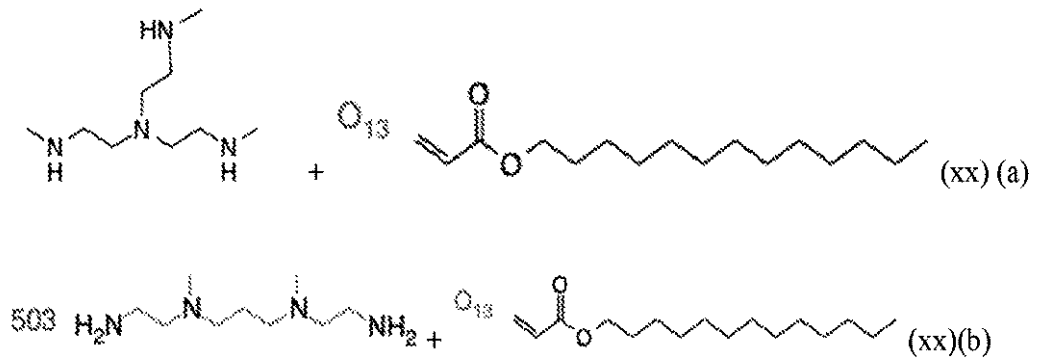


(xix)

【０５５５】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物、例えば、本明細書に記載の核酸（例えば、ＲＮＡ）（例えば、鋳型核酸又は遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸）、の送達のための脂質ナノ粒子を形成するために使用される脂質化合物は、以下の反応の１つによって作製される：

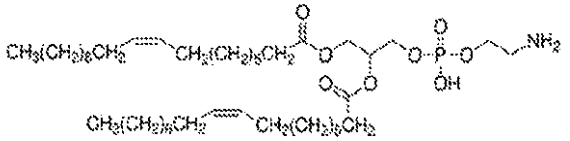
【化２９】



【０５５６】

例示的な非カチオン脂質として、限定されないが、以下のものが挙げられる：ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、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）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボン酸ジオレオイル－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジパルミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジル－エタノールアミン（ＤＳＰＥ）、モノメチル－ホスファチジルエタノールアミン（例えば、１６－Ｏ－モノメチルＰＥ）、ジメチル－ホスファチジルエタノールアミン（例えば、１６－Ｏ－ジメチルＰＥ）、１８－１－トランスＰＥ、１－ステアロイル－２－オレオイル－１－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、水素添加ダイズホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、卵ホスファチジルコリン（ＥＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルセリン（ＤＯＰＳ）、スフィンゴミエリン（ＳＭ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（ＤＭＰＧ）、ジステアロイルホスファチジルグリセロール（ＤＳＰＧ）、ジエルコイルホスファチジルコリン（ＤＥＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール（ＰＯＰＧ）、ジエライドイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リソレシチン、リソホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン（ＥＳＭ）、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、リン酸ジセチル、リソホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン又はそれらの混合物。更に、他のジアセチルホスファチジルコリン及びジアセチルホスファチジルエタノールアミンリン脂質も使用できることが理解される。これらの脂質中のアシル基は、好ましくは、Ｃ１０～２４炭素鎖を有する脂肪酸由来のアシル基、例えば、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、又はオレオイルである。特定の実施形態における別の例示的な脂質として、限定しないが、Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０２１／ａｃｓ．ｎａｎｏｌｅｔｔ．０ｃ０１３８６（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものが挙げられる。こうした脂質には、一部の実施形態では、ｍＲＮＡを用いた肝トランスフェクションを改善することが判明している植物脂質（例えば、ＤＧＴＳ）が含まれる。一部の実施形態では、非カチオン性脂質は、以下の構造を有し得る。

【化３０】



(xxi)

【０５５７】

脂質ナノ粒子での使用に適した非カチオン脂質の他の例として、限定しないが、無リン脂質、例えば、ステアリルアミン、ドデエイルアミン、ヘキサアデシルアミン、パルミチン酸アセチル、リシノール酸グリセロール、ステアリン酸ヘキサデシル、ミリスチン酸イソプロピル、両性アクリルポリマー、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキル－アリール硫酸塩ポリエトキシル化脂肪酸アミド、ジオクタデシルジメチルアンモニウム臭化物、セラミド、スフィンゴミエリンなどが挙げられる。他の非カチオン脂質は、国際公開第２０１７／０９９８２３号パンフレット又は米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書に記載されており、それらの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０５５８】

一部の実施形態では、非カチオン脂質は、米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の式Ｉ、ＩＩ若しくはＩＶのオレイン酸又は化合物である。非カチオン脂質は、例えば、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０～３０％（ｍｏｌ）を占め得る。一部の実施形態では、非カチオン脂質含有率は、例えば、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の５～２０％（ｍｏｌ）又は１０～１５％（ｍｏｌ）である。複数の実施形態では、イオン化性脂質と中性脂質のモル比は、約２：１～約８：１（例えば、約２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、又は８：１）の範囲である。

【０５５９】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、リン脂質を一切含まない。

【０５６０】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、膜完全性を賦与するために、ステロールなどの成分を更に含み得る。脂質ナノ粒子に使用することができるステロールの一例は、コレステロール及びその誘導体である。コレステロール誘導体の非限定的な例として、５ａ－コレスタノール、５３－コプロスタノール、コレステリル－（２－ヒドロキシ）－エチルエーテル、コレステリル－（４’－ヒドロキシ）－ブチルエーテル、及び６－ケトコレスタノールなどの極性類似体；５ａ－コレスタン、コレステノン、５ａ－コレスタノン、５ｐ－コレスタノン、及びデカン酸コレステリルなどの非極性類似体；並びにそれらの混合物が挙げられる。一部の実施形態では、コレステロール誘導体は、極性類似体、例えば、コレステリル－（４’－ヒドロキシ）－ブチルエステルである。例示的なコレステロール誘導体は、国際公開第２００９／１２７０６０号パンフレット及び米国特許出願公開第２０１０／０１３０５８８号明細書（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０５６１】

一部の実施形態では、膜完全性を賦与する成分、例えば、ステロールなどは、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０～５０％（ｍｏｌ）（例えば、０～１０％、１０～２０％、２０～３０％、３０～４０％、又は４０～５０％）を含む。一部の実施形態では、こうした成分は、脂質ナノ粒子の総脂質の２０～５０％（ｍｏｌ）、３０～４０％（ｍｏｌ）である。

【０５６２】

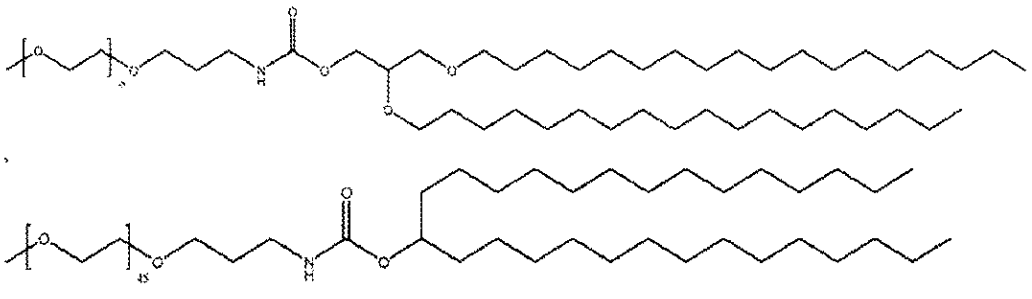
一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）又は共役脂質分子を含み得る。一般に、これらは、脂質ナノ粒子の凝集を阻害し、且つ／又は立体安

定化をもたらす。例示的な共役脂質として、限定されないが、ＰＥＧ－脂質コンジュゲート、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）－脂質コンジュゲート、ポリアミド－脂質コンジュゲート（例えば、ＡＴＴＡ－脂質コンジュゲート）、カチオンポリマー脂質（ＣＰＬ）コンジュゲート、及びそれらの混合物が挙げられる。一部の実施形態では、共役脂質分子は、ＰＥＧ－脂質コンジュゲート、例えば、（メトキシポリエチレングリコール）共役脂質である。

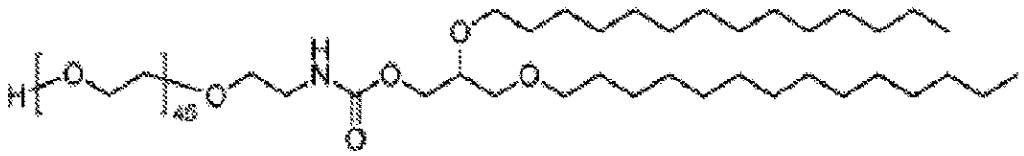
【０５６３】

例示的なＰＥＧ－脂質コンジュゲートとして、限定されないが、ＰＥＧ－ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）（例えば、１－（モノメトキシ－ポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ））、ＰＥＧ－ジアルキルオキシプロピル（ＤＡＡ）、ＰＥＧ－リン脂質、ＰＥＧ－セラミド（Ｃｅｒ）、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ、メトキシポリエチレングリコール（ＤＭＧ－ＰＥＧ－２Ｋ）、ＰＥＧコハク酸ジアシルグリセロール（ＰＥＧＳ－ＤＡＧ）（例えば、４－０－（２’，３’－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル－１－０－（ｗ－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオエート（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ））、ＰＥＧジアルコキシプロピルカルバム、Ｎ－（カルボニル－１－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ナトリウム塩又はそれらの混合物が挙げられる。別の例示的なＰＥＧ－脂質コンジュゲートは、例えば、米国特許第５，８８５，６ｌ３号明細書、米国特許第６，２８７，５９ｌ号明細書、米国特許出願公開第２００３／００７７８２９号明細書、米国特許出願公開第２００３／００７７８２９号明細書、米国特許出願公開第２００５／０１７５６８２号明細書、米国特許出願公開第２００８／００２００５８号明細書、米国特許出願公開第２０１１／０１１７１２５号明細書、米国特許出願公開第２０１０／０１３０５８８号明細書、米国特許出願公開第２０１６／０３７６２２４号明細書、米国特許出願公開第２０１７／０１１９９０４号明細書、及び米国特許出願公開第／０９９８２３号明細書に記載されており、これらは全て、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書（その内容は、全体が参照により本明細書に組み込まれる）の式ＩＩＩ、ＩＩＩ－ａ－Ｉ、ＩＩＩ－ａ－２、ＩＩＩ－ｂ－１、ＩＩＩ－ｂ－２の化合物である。一部の実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、米国特許出願公開第２０１５０３７６１１５号明細書又は米国特許出願公開第２０１６／０３７６２２４号明細書（いずれの内容も、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の式ＩＩのものである。一部の実施形態では、ＰＥＧ－ＤＡＡコンジュゲートは、例えば、ＰＥＧ－ジラウロイルオキシプロピル、ＰＥＧ－ジミリスチルオキシプロピル、ＰＥＧ－ジパルミチルオキシプロピル、又はＰＥＧ－ジステアリルオキシプロピルであり得る。ＰＥＧ－脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ジラウリルグリセロール、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリセロール、ＰＥＧ－ジステリルグリセロール、ＰＥＧ－ジラウリルグリカミド、ＰＥＧ－ジミリスチルグリカミド、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリカミド、ＰＥＧ－ジステリルグリカミド、ＰＥＧ－コレステロール（ｌ－［８’－（コレスト－５－エン－３［β］－オキシ）カルボキサミド－３’，６’－ジオキサオクタニル］カルバモイル－［ω］－メチル－ポリ（エチレングリコール）、ＰＥＧ－ＤＭＢ（３，４－ジテトラデコキシルベンジル－［ω］－メチル－ポリ（エチレングリコール）エーテル）、及び１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］の１つ若しくは複数であり得る。一部の実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧ、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］を含む。一部の実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、

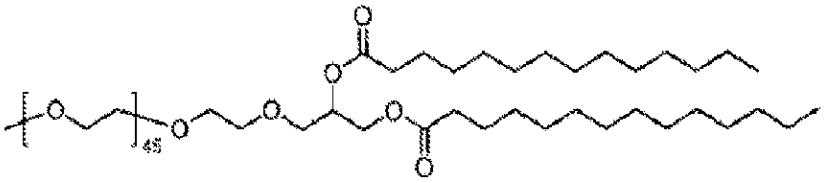
【化３１】



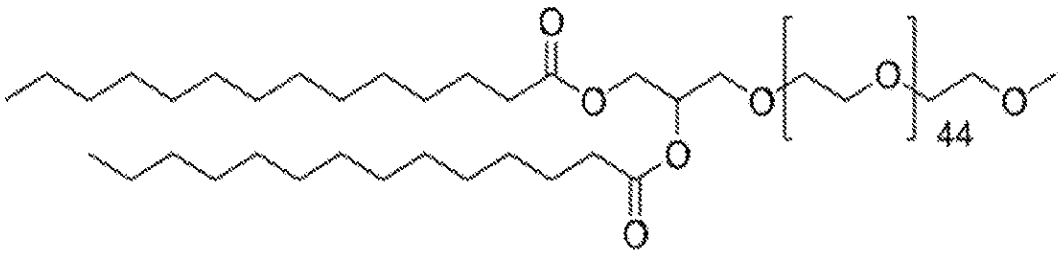
(xxii),



(xxiii),



(xxiv), 及び



(xxv)

から選択される構造を含む。

【０５６４】

一部の実施形態では、ＰＥＧ－脂質の代わりに、ＰＥＧ以外の分子と共役した脂質を使用することもできる。例えば、ＰＥＧ－脂質の代わりに、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）－脂質コンジュゲート、ポリアミド－脂質コンジュゲート（例えば、ＡＴＴＡ－脂質コンジュゲート）、及びカチオンポリマー脂質（ＧＰＬ）コンジュゲートを使用することができる。

【０５６５】

例示的な共役脂質、すなわちＰＥＧ－脂質、（ＰＯＺ）－脂質コンジュゲート、ＡＴＴＡ－脂質コンジュゲート、及びカチオンポリマー脂質は、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレットの表２及び国際公開第２０２０１０６９４６Ａ１号パンフレットに列挙されるＰＣＴ及びＬＩＳ特許出願に記載されており、これらの内容は全て、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０５６６】

一部の実施形態では、ＬＮＰは、式（ｘｉｘ）の化合物、式（ｘｘｉ）の化合物及び式（ｘｘｖ）の化合物を含む。一部の実施形態では、式（ｘｉｘ）、式（ｘｘｉ）及び式（ｘｘｖ）の製剤を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肺又は肺細胞に送達する。

【０５６７】
一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、式（ｉ）、式（ｉｉ）、式（ｉｉｉ）、式（ｖｉｉ）、及び式（ｉｘ）から選択される１つ又は複数のカチオン性脂質を含み得る。一部の実施形態では、ＬＮＰは、１つ又は複数の中性脂質、例えばＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＭＰＣ、ＤＯＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＯＰＥ、ＳＭ、ステロイド、例えばコレステロール及び／又は１つ又は複数のポリマーと共役した脂質、例えばＰＥＧ化脂質、例えばＰＥＧ－ＤＡＧ、ＰＥＧ－ＰＥ、ＰＥＧ－Ｓ－ＤＡＧ、ＰＥＧ－ｃｅｒ又はＰＥＧジアルコキシプロピルカルバメートを更に含む。
【０５６８】
一部の実施形態では、ＰＥＧ又は共役脂質は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０～２０％（ｍｏｌ）を占め得る。一部の実施形態では、ＰＥＧ又は共役脂質の含有率は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０．５～１０％又は２～５％（ｍｏｌ）である。イオン化性脂質、非カチオン脂質、ステロール、及びＰＥＧ／共役脂質のモル比は、必要に応じて変動し得る。例えば、脂質粒子は、組成物のモル又は総重量当たり３０～７０％のイオン化性脂質と、組成物のモル又は総重量当たり０～６０％のコレステロールと、組成物のモル又は総重量当たり０～３０％の非カチオン脂質と、組成物のモル又は総重量当たり１～１０％の共役脂質とを含み得る。好ましくは、組成物は、組成物のモル又は総重量当たり３０～４０％のイオン化性脂質と、組成物のモル又は総重量当たり４０～５０％のコレステロールと、組成物のモル又は総重量当たり１０～２０％の非カチオン脂質とを含む。一部の実施形態では、組成物は、組成物のモル又は総重量当たり５０～７５％のイオン化性脂質と、組成物のモル又は総重量当たり２０～４０％のコレステロールと、組成物のモル又は総重量当たり５～１０％の非カチオン脂質と、組成物のモル又は総重量当たり１～１０％の共役脂質である。組成物は、組成物のモル又は総重量当たり６０～７０％のイオン化性脂質と、組成物のモル又は総重量当たり２５～３５％のコレステロールと、組成物のモル又は総重量当たり５～１０％の非カチオン脂質とを含み得る。組成物はまた、組成物のモル又は総重量当たり最大９０％のイオン化性脂質と、組成物のモル又は総重量当たり２～１５％の非カチオン脂質とを含み得る。製剤は、例えば、組成物のモル若しくは総重量当たり８～３０％のイオン化性脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり５～３０％の非カチオン脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり０～２０％のコレステロールと；組成物のモル若しくは総重量当たり４～２５％のイオン化性脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり４～２５％の非カチオン脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり２～２５％のコレステロールと、組成物のモル若しくは総重量当たり１０～３５％の共役脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり５％のコレステロール；又は組成物のモル若しくは総重量当たり２～３０％のイオン化性脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり２～３０％の非カチオン脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり１～１５％のコレステロールと、組成物のモル若しくは総重量当たり２～３５％の共役脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり１～２０％のコレステロール；或いはまた組成物のモル若しくは総重量当たり最大９０％のイオン化性脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり２～１０％の非カチオン脂質と、又は組成物のモル若しくは総重量当たり１００％のカチオン脂質でもあり得る。一部の実施形態では、脂質粒子製剤は、５０：１０：３８．５：１．５のモル比で、イオン化性脂質、リン脂質、コレステロール及びＰＥＧ化脂質を含む。一部の他の実施形態では、脂質粒子製剤は、６０：３８．５：１．５のモル比で、イオン化性脂質、コレステロール及びＰＥＧ化脂質を含む。
【０５６９】
一部の実施形態では、脂質粒子は、イオン化性脂質、非カチオン脂質（例えば、リン脂質）、ステロール（例えば、コレステロール）及びＰＥＧ化脂質を含み、ここで、脂質のモル比は、イオン化性脂質の場合、２０～７０モル％の範囲で、目標は４０～６０であり、非カチオン脂質のモルパーセントは、０～３０の範囲で、目標は０～１５、ステロールのモルパーセントは、２０～７０の範囲で、目標は３０～５０、ＰＥＧ化脂質のモルパーセントは、１～６の範囲で、目標は２～５である。

【０５７０】
一部の実施形態では、脂質粒子は、５０：１０：３８．５：１．５のモル比で、イオン化性脂質／非カチオン脂質／ステロール／共役脂質を含む。
【０５７１】
一態様では、本開示は、リン脂質、レシチン、ホスファチジルコリン及びホスファチジルエタノールアミンを含む脂質ナノ粒子製剤を提供する。
【０５７２】
一部の実施形態では、１つ又は複数の別の化合物を含有させることができる。そうした化合物は個別に投与することもできるし、又は追加的化合物を本発明の脂質ナノ粒子に含有させることもできる。言い換えれば、脂質ナノ粒子は、核酸又は最初の核酸と異なる少なくとも１つの第２の核酸に加えて、他の化合物を含有することができる。限定はしないが、他の追加的化合物は、小若しくは大有機又は無機分子、単糖、二糖、三糖、オリゴ糖、多糖、ペプチド、タンパク質、ペプチド類似体及びその誘導体、ペプチド模倣物、核酸、核酸類似体及びその誘導体、生体材料から調製された抽出物、又はそれらの任意の組合せから選択することができる。
【０５７３】
一部の実施形態では、脂質ナノ粒子（又は脂質ナノ粒子を含む製剤）は、反応性不純物（例えば、アルデヒド又はケトン）を欠いているか、又は予め選択されたレベル未満の反応性不純物（例えば、アルデヒド又はケトン）を含む。特定の理論に束縛されることを意図しないが、一部の実施形態では、脂質試薬を使用して脂質ナノ粒子製剤を作製し、脂質試薬は、混入反応性不純物（例えば、アルデヒド又はケトン）を含み得る。脂質試薬は、予め選択されたレベル未満の反応性不純物（例えば、アルデヒド又はケトン）を有することに基づいて、製造のために選択され得る。特定の理論に束縛されることを意図しないが、一部の実施形態では、アルデヒドは、ＲＮＡの修飾及び損傷、例えば、塩基間の架橋及び／又は脂質のＲＮＡへの共有結合（例えば、脂質－ＲＮＡ付加物の形成）を引き起こし得る。これは、いくつかの事例では、逆転写酵素反応の失敗及び／又は不適切な塩基の組込み（例えば、損傷部位で）、例えば、新しく合成された標的ＤＮＡの変異につながる可能性がある。
【０５７４】
一部の実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の総反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量を含む脂質試薬を使用して産生される。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の任意の単一反応性不純物（例えば、アルデヒド）種を含む脂質試薬を使用して産生される。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、（ｉ）５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の総反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量；及び（ｉｉ）５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の任意の単一反応性不純物（例えば、アルデヒド）種を含む、脂質試薬を使用して産生される。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、複数の脂質試薬を使用して産生され、複数の脂質試薬は各々独立して、この段落に記載された１つ又は複数の基準を満たす。一部の実施形態では、複数の各脂質試薬は、同じ基準、例えば、本段落の基準を満たす。
【０５７５】
一部の実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の総反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量を含む。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の任意の単一反

応性不純物（例えば、アルデヒド）種を含む。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、（ｉ）５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の総反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量；及び（ｉｉ）５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の任意の単一反応性不純物（例えば、アルデヒド）種を含む。

【０５７６】

一部の実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子又はその製剤に使用される脂質試薬の１つ以上、又は任意選択で全ては、５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の総反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子又はその製剤に使用される脂質試薬の１つ以上、又は任意選択で全ては、５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の任意の単一反応性不純物（例えば、アルデヒド）種を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子又はその製剤に使用される脂質試薬の１つ以上、又は任意選択で全ては、（ｉ）５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の総反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量；及び（ｉｉ）５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の任意の単一反応性不純物（例えば、アルデヒド）種を含む。

【０５７７】

一部の実施形態では、総アルデヒド含有量及び／又は任意の単一反応性不純物（例えば、アルデヒド）種の量は、例えばタンデム質量分析（ＭＳ／ＭＳ）と組み合わせた、液体クロマトグラフィー（ＬＣ）により、例えばＰＣＴ／ＵＳ２１／２０９４８号明細書の実施例４０に記載の方法に従って決定される。一部の実施形態では、反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量及び／又は反応性不純物（例えば、アルデヒド）種の量は、例えば脂質試薬中の、反応性不純物（例えば、アルデヒド）の存在に関連した、核酸分子（例えば、ＲＮＡ分子、例えば、本明細書に記載されるもの）の１つ又は複数の化学修飾を検出することによって決定される。一部の実施形態では、反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量及び／又は反応性不純物（例えば、アルデヒド）種の量は、例えば、ＰＣＴ／ＵＳ２１／２０９４８号明細書の実施例４１に記載される方法に従い、例えば脂質試薬中の反応性不純物（例えば、アルデヒド）の存在に関連した、ヌクレオチド又はヌクレオシド（例えば、リボヌクレオチド又はリボヌクレオシド、例えば鋳型核酸に含まれるか、又は鋳型核酸から単離されたもの、例えば本明細書に記載されるもの）の１つ又は複数の化学修飾を検出することによって決定される。複数の実施形態では、核酸分子、ヌクレオチド、又はヌクレオシドの化学修飾は、例えば、ＰＣＴ／ＵＳ２１／２０９４８号明細書の実施例４１に記載される方法に従って、例えば、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析を用いて、１つ又は複数の修飾ヌクレオチド又はヌクレオシドの存在を決定することによって検出される。

【０５７８】

一部の実施形態では、本明細書に記載の核酸（例えば、ＲＮＡ）（例えば、鋳型核酸又は遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸）は、アルデヒド修飾を含まないか、又は予め選択された量未満のアルデヒド修飾を含む。一部の実施形態では、平均して、核酸は、１０００ヌクレオチドあたり５０、２０、１０、５、２、又は１未満のアルデヒド修飾を有し、例えば、２つのヌクレオチドの単一の架橋は単一のアルデヒド修飾である。一部の実施形態では、アルデヒド修飾はＲＮＡ付加（例えば、脂質ＲＮＡ付加）である。一部の実施形態では、アルデヒド修飾ヌクレオチドは、塩基間で架橋している。一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸（例えば、ＲＮＡ）は、ヌクレオチド間に５０、２０、１０、５、２、又は１未満の架橋を含む。

【０５７９】

一部の実施形態では、ターゲティングドメインの付加により、ＬＮＰを特定の組織に指向させる。例えば、生物学的リガンドをＬＮＰの表面に展示して、同種受容体を展示する細胞との相互作用を増強し、それにより上記受容体との結合並びに細胞が受容体を発現する組織へのカーゴ送達を駆動することができる。一部の実施形態では、生物学的リガンドは、肝臓への送達を駆動するリガンドであり得、例えば、ＧａｌＮＡｃを展示するＬＮＰは、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）を展示する肝細胞に対する核酸カーゴの送達を達成する。Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ １８（７）：１３５７－１３６４ ２０１０）の論文は、観察可能なＬＮＰカーゴ効果（例えば、その中の図６を参照）についてＡＳＧＰＲに依存的なＬＮＰを取得するためのＰＥＧ－脂質に対する三価ＧａｌＮＡｃリガンド（ＧａｌＮＡｃ－ＰＥＧ－ＤＳＧ）の共役を教示している。例えば、葉酸塩、トランスフェリン、又は抗体を含む他のリガンド展示ＬＮＰ製剤は、国際公開第２０１７２２３１３５号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）、更には、そこで使用される参照文献、すなわちＫｏｌｈａｔｋａｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ Ｔｅｃｈｎｏｌ．２０１１ ８：１９７－２０６；Ｍｕｓａｃｃｈｉｏ ａｎｄ Ｔｏｒｃｈｉｌｉｎ，Ｆｒｏｎｔ Ｂｉｏｓｃｉ．２０１１ １６：１３８８－１４１２；Ｙｕ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｍｅｍｂｒ Ｂｉｏｌ．２０１０ ２７：２８６－２９８；Ｐａｔｉｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｔｈｅｒ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔ．２００８ ２５：１－６１；Ｂｅｎｏｉｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ．２０１１ １２：２７０８－２７１４；Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．２００８ ５：３０９－３１９；Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１０ １８：１３５７－１３６４；Ｓｒｉｎｉｖａｓａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１２ ８２０：１０５－１１６；Ｂｅｎ－Ａｒｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１２ ７５７：４９７－５０７；Ｐｅｅｒ ２０１０ Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ．２０：６３－６８； Ｐｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２００７ １０４：４０９５－４１００；Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１１ ７２１：３３９－３５３；Ｓｕｂｒａｍａｎｙａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１０ １８：２０２８－２０３７；Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５ ２３：７０９－７１７；Ｐｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００８ ３１９：６２７－６３０；及びＰｅｅｒ ａｎｄ Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１１ １８：１１２７－１１３３で論じられている。

【０５８０】

一部の実施形態では、イオン化性脂質、両性リン脂質、コレステロール及びポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）脂質などの伝統的成分を含む製剤に対するＳｅｌｅｃｔｉｖｅ ＯＲｇａｎ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ（ＳＯＲＴ）分子の添加により、組織特異的活性についてＬＮＰを選択する。Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌ １５（４）：３１３－３２０（２０２０）の教示は、補足的「ＳＯＲＴ」成分の添加により、インビボＲＮＡ送達プロファイルを厳密に改変し、ＳＯＲＴ分子のパーセンテージ及び生物物理学的特性に応じて組織特異的（例えば、肺、肝臓、脾臓）遺伝子送達を媒介することを実証している。

【０５８１】

一部の実施形態では、ＬＮＰは、生分解性、イオン化性脂質を含む。一部の実施形態では、ＬＮＰは、オクタデカ－９，１２－ジエン酸（９Ｚ，ｌ２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルを含み、これは、（９Ｚ，ｌ２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン酸）３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルとも呼ばれる。例えば、国際公開第２０１９／０６７９９２号パンフレット、国際公開第２０１７／１７３０５４号パンフレット、国際公開第２０１５／０９５３４０号

パンフレット及び国際公開第２０１４／１３６０８６号パンフレット並びにそこに記載される参照文献に記載の脂質を参照されたい。一部の実施形態では、ＬＮＰ脂質に関して、カチオン（性）及びイオン化性という用語は互換可能であり、例えば、イオン化性脂質は、ｐＨによってはカチオン性である。

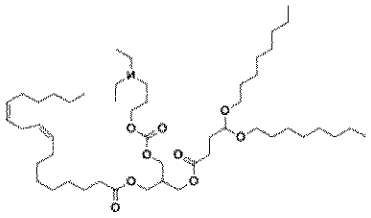
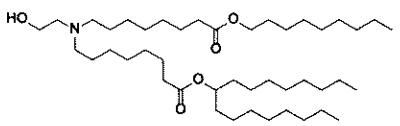
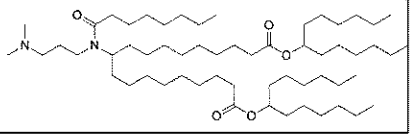
【０５８２】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるＬＮＰは、表１９に記載される脂質を含む。

【０５８３】

【表１９】

表 19 例示的な脂質

脂質ID	化学名	分子量	構造
LIPIDV003	(9Z,12Z)-3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-((((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエート	852.29	
LIPIDV004	ヘプタデカン-9-イル8-((2-ヒドロキシエチル)(8-(ノニルオキシ)-8-オキソオクチル)アミノ)オクタノエート	710.18	
LIPIDV005		919.56	

【０５８４】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムの複数の構成要素を単一のＬＮＰ製剤として調製し得、例えば、ＬＮＰ製剤は、遺伝子組換えポリペプチドコードするｍＲＮＡ及びＲＮＡ鋳型を含む。核酸成分の比は、治療薬の特性を最大にするために変動させ得る。一部の実施形態では、ＲＮＡ鋳型と、遺伝子組換えポリペプチドコードするｍＲＮＡの比は、モル比で約１：１～１００：１、例えば、約１：１～２０：１、約２０：１～４０：１、約４０：１～６０：１、約６０：１～８０：１、又は約８０：１～１００：１である。他の実施形態では、複数の核酸のシステムは、個別の製剤、例えば、鋳型ＲＮＡを含む１つのＬＮＰ製剤と、遺伝子組換えポリペプチドコードするｍＲＮＡを含む第２のＬＮＰ製剤により調製され得る。一部の実施形態では、システムは、ＬＮＰに製剤化された３つ以上の核酸成分を含み得る。一部の実施形態では、システムは、少なくとも１つのＬＮＰに製剤化された、タンパク質、例えば、遺伝子組換えシステム、及び鋳型ＲＮＡを含み得る。

【０５８５】

一部の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ径は、例えば、動的光散乱法（ＤＬＳ）により測定して、数１０ｎｍ～数１００ｎｍであり得る。一部の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ径は、約４０ｎｍ～約１５０ｎｍ、例えば、約４０ｎｍ、４５ｎｍ、５０ｎｍ、５５ｎｍ、６０ｎｍ、６５ｎｍ、７０ｎｍ、７５ｎｍ、８０ｎｍ、８５ｎｍ、９０ｎｍ、９５ｎｍ、１００ｎｍ、１０５ｎｍ、１１０ｎｍ、１１５ｎｍ、１２０ｎｍ、１２５ｎｍ、１３０ｎｍ、１３５ｎｍ、１４０ｎｍ、１４５ｎｍ又は１５０ｎｍであり得る。一部の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ径は、約５０ｎｍ～約１００ｎｍ、約５０ｎｍ～約９０ｎｍ、約５０ｎｍ～約８０ｎｍ、約５０ｎｍ～約７０ｎｍ、約５０ｎｍ～約６０ｎｍ、約６０ｎｍ～約１００ｎｍ、約６０ｎｍ～約９０ｎｍ、約６０ｎｍ～約８０ｎ

ｍ、約６０ｎｍ～約７０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１００ｎｍ、約７０ｎｍ～約９０ｎｍ、約７０ｎｍ～約８０ｎｍ、約８０ｎｍ～約１００ｎｍ、約８０ｎｍ～約９０ｎｍ又は約９０ｎｍ～約１００ｎｍであり得る。一部の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ径は、約７０ｎｍ～約１００ｎｍであり得る。一部の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ径は、約８０ｎｍであり得る。一部の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ径は、約１００ｎｍであり得る。一部の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ径は、約１ｍｍ～約５００ｍｍ、約５ｍｍ～約２００ｍｍ、約１０ｍｍ～約１００ｍｍ、約２０ｍｍ～約８０ｍｍ、約２５ｍｍ～約６０ｍｍ、約３０ｍｍ～約５５ｍｍ、約３５ｍｍ～約５０ｍｍ、又は約３８ｍｍ～約４２ｍｍの範囲である。

【０５８６】

ＬＮＰは、いくつかの事例では、比較的均質であり得る。多分散指数を用いて、ＬＮＰの均質性、例えば、脂質ナノ粒子の粒度分布を示すことができる。低い（例えば、０．３未満の）多分散指数は、概して、狭い粒度分布を示す。ＬＮＰは、約０～約０．２５、例えば、０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１０、０．１１、０．１２、０．１３、０．１４、０．１５、０．１６、０．１７、０．１８、０．１９、０．２０、０．２１、０．２２、０．２３、０．２４、又は０．２５の多分散指数を有し得る。一部の実施形態では、ＬＮＰの多分散指数は、約０．１０～約０．２０であり得る。

【０５８７】

ＬＮＰのゼータ電位を用いて、組成物の界面動電位を示すことができる。一部の実施形態では、ゼータ電位は、ＬＮＰの表面電荷を表し得る。高度に荷電された種は、身体内の細胞、組織、及び他の要素と不必要に相互作用する可能性があるため、正又は負の比較的低い電荷を持つ脂質ナノ粒子が一般的に望ましい。一部の実施形態では、ＬＮＰのゼータ電位は、約－１０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約－５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－５ｍＶ～約０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約＋５ｍＶ～約２０ｍＶ、約＋５ｍＶ～約１５ｍＶ又は約＋５ｍＶ～約１０ｍＶであり得る。

【０５８８】

タンパク質及び／又は核酸、例えば、遺伝子組換えポリペプチド若しくはポリペプチドをコードするｍＲＮＡの封入の効率は、提供される初期量と比較して、封入されるか若しくは調製後にＬＮＰと結合されるタンパク質及び／又は核酸の量を表す。封入効率は、高い（例えば、１００％近く）のが望ましい。封入効率は、例えば、１若しくは複数種の溶媒又はデタージェントで脂質ナノ粒子を分解する前と後で、脂質ナノ粒子を含有する溶液中のタンパク質又は核酸の量を比較することにより、測定することができる。アニオン交換樹脂を用いて、溶液中の遊離タンパク質又は核酸（例えば、ＲＮＡ）の量を測定することができる。蛍光を用いて、溶液中の遊離タンパク質又は核酸（例えば、ＲＮＡ）の量を測定することができる。本明細書に記載の脂質ナノ粒子の場合、タンパク質及び／又は核酸の封入効率は、少なくとも５０％、例えば、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％であり得る。一部の実施形態では、封入効率は、少なくとも８０％であり得る。一部の実施形態では、封入効率は、少なくとも９０％であり得る。一部の実施形態では、封入効率は、少なくとも９５％であり得る。

【０５８９】

ＬＮＰは、任意選択で、１つ又は複数のコーティングを含み得る。一部の実施形態では、ＬＮＰは、コーティングを有するカプセル、フィルム又は錠剤に製剤化され得る。本明細書に記載の組成物を含むカプセル、フィルム又は錠剤は、任意の有用なサイズ、引張強度、硬度若しくは密度を有し得る。

【０５９０】

ＬＮＰの更に別の例示的な脂質、製剤、方法、及び特性決定は、国際公開第２０２００６１４５７号パンフレットに教示されており、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０５９１】

一部の実施形態では、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）又はＴｒａｎｓＩＴ－ｍＲＮＡ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｍｉｒｕｓ Ｂｉｏ）を用いて、インビトロ又はエクスビボ細胞リポフェクションを実施する。特定の実施形態では、ＧｅｎＶｏｙ＿ＩＬＭ ｉｏｎｉｚａｂｌｅ ｌｉｐｉｄ ｍｉｘ（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ ＮａｎｏＳｙｓｔｅｍｓ）を用いて、ＬＮＰを製剤化する。特定の実施形態では、ＬＮＰは、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）又はジリノレイルメチル－４－ジメチルアミノ酪酸塩（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ若しくはＭＣ３）を用いて、ＬＮＰを製剤化するが、その製剤及びインビボでの使用については、Ｊａｙａｒａｍａｎ ｅｔ ａｌ．Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ Ｉｎｔ Ｅｄ Ｅｎｇｌ ５１（３４）：８５２９－８５３３（２０１２）に教示されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０５９２】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム、例えば、Ｃａｓ９－ｇＲＮＡ ＲＮＰ、ｇＲＮＡ、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡの送達のために最適化されたＬＮＰ製剤は、国際公開第２０１９０６７９９２号パンフレット及び国際公開第２０１９０６７９１０号パンフレットに記載されており、そのいずれも参照により本明細書に組み込まれる。

【０５９３】

核酸の送達に有用な別の具体的なＬＮＰ製剤は、米国特許第８１５８６０１号明細書及び米国特許第８１６８７７５号明細書（そのいずれも参照により本明細書に組み込まれる）に記載されており、これは、ＯＮＰＡＴＴＲＯの名称で販売されているパチシランに使用される製剤を含む。

【０５９４】

遺伝子組換えＬＮＰの例示的な用量としては、約０．１、０．２５、０．３、０．５、１、２、３、４、５、６、８、１０、又は１００ ｍｇ／ｋｇ（ＲＮＡ）を挙げることができる。システムの１つ若しくは複数の成分をコードする核酸を含むＡＡＶの例示的な用量としては、約10^{11}、10^{12}、10^{13}、及び10^{14}ｖｇ／ｋｇのＭＯＩを挙げることができる。

【０５９５】

キット、製品、及び医薬組成物

一態様では、本開示は、例えば、本明細書に記載される、遺伝子組換えポリペプチド又は遺伝子組換えシステムを含むキットを提供する。一部の実施形態では、キットは、遺伝子組換えポリペプチド（又はポリペプチドをコードする核酸）及び鋳型ＲＮＡ（又は鋳型ＲＮＡをコードするＤＮＡ）を含む。一部の実施形態では、キットは、細胞にシステムを導入するための試薬、例えば、トランスフェクション試薬、ＬＮＰなどを更に含む。一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載される方法のいずれかに好適である。一部の実施形態では、キットは、例えば、製品内に配置されるような、１つ若しくは複数のエレメント、組成物（例えば、医薬組成物）、遺伝子組換えポリペプチド、及び／又は遺伝子組換えシステム又はその機能的フラグメント若しくは成分を含む。一部の実施形態では、キットは、その使用説明書を含む。

【０５９６】

一態様では、本開示は、製品、例えば、その中に本明細書に記載されるキット、又はその要素が配置される製品を提供する。

【０５９７】

一態様では、本開示は、例えば、本明細書に記載される、遺伝子組換えポリペプチド又は遺伝子組換えシステムを含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態では、医薬組成物

は、薬学的に許容される担体又は賦形剤を更に含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、鋳型ＲＮＡ及び／又はポリペプチドをコードするＲＮＡを含む。複数の実施形態では、医薬組成物は、以下の特徴の１つ又は複数（例えば、１、２、３若しくは４つ）を有する：

（ａ）例えば、モル基準で、鋳型ＲＮＡ及び／又はポリペプチドをコードするＲＮＡに対して、１％未満（例えば、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％若しくは０．１％未満）のＤＮＡ鋳型；

（ｂ）例えば、モル基準で、鋳型ＲＮＡ及び／又はポリペプチドをコードするＲＮＡに対して、１％未満（例えば、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％若しくは０．１％未満）の非キャップＲＮＡ；

（ｃ）例えば、モル基準で、鋳型ＲＮＡ及び／又はポリペプチドをコードするＲＮＡに対して、１％未満（例えば、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％若しくは０．１％未満）の部分長ＲＮＡ；

（ｄ）未反応キャップジヌクレオチドを実質的に含まない。

【０５９８】

化学、製造、及び制御（ＣＭＣ）

タンパク質治療薬の精製は、例えば、Ｆｒａｎｋｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ，Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｓｔａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２０１３）；及びＣｕｔｌｅｒ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ），Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２０１０）に記載されている。

【０５９９】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステム、ポリペプチド、及び／又は鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、特定の品質基準を満たす。一部の実施形態では、本明細書に記載される方法により生産された遺伝子組換えシステム、ポリペプチド、及び／又は鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、特定の品質基準を満たす。従って、本開示は、いくつかの態様では、例えば、前記品質基準が検定される、特定の品質基準を満たす遺伝子組換えシステム、ポリペプチド、及び／又は鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）を製造する方法に関する。本開示は、いくつかの態様では、遺伝子組換えシステム、ポリペプチド、及び／又は鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）で前記品質基準を検定する方法にも関する。一部の実施形態では、品質基準として、限定はしないが、以下の１つ又は複数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２）が挙げられる：

（ｉ）鋳型ＲＮＡの長さ、例えば、鋳型ＲＮＡが、標準長さを超えるか、又は標準長さ範囲内の長さを有するか否か、例えば、存在する鋳型ＲＮＡの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、１００、１２５、１５０、１７５若しくは２００ヌクレオチド長を超えるか否か；

（ｉｉ）鋳型ＲＮＡ上のポリＡテールの存在、非存在、及び／又は長さ、例えば、存在する鋳型ＲＮＡの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、ポリＡテール（例えば、少なくとも５、１０、２０、３０、５０、７０、１００ヌクレオチド長のポリＡテール）を含むか否か；

（ｉｉｉ）鋳型ＲＮＡ上の５’キャップの存在、非存在、及び／又は種類、例えば、存在する鋳型ＲＮＡの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、５’キャップを含むか否か、例えば、上記キャップが、７－メチルグアノシンキャップ、例えば、Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇキャップであるか否か；

（ｉｖ）鋳型ＲＮＡ中の１つ若しくは複数の修飾ヌクレオチド（例えば、プソイドウリジン、ジヒドロウリジン、イノシン、７－メチルグアノシン、１－Ｎ－メチルプソイドウリジン（１－Ｍｅ－Ψ）、５－メトキシウリジン（５－ＭＯ－Ｕ）、５－メチルシチジン（５ｍＣ）、又はロックドヌクレオチドから選択される）の存在、非存在、及び／又は種類、例えば、存在する鋳型ＲＮＡの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％

、９７％、９８％若しくは９９％が、１つ又は複数の修飾ヌクレオチドを含むか否か；
（ｖ）鋳型ＲＮＡの安定性（例えば、時間経過による及び／若しくは予め選択した条件下で）、例えば、鋳型ＲＮＡの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、安定性試験の後、インタクトなままである（例えば、１００、１２５、１５０、１７５、又は２００ヌクレオチド長を超える）か否か；
（ｖｉ）ＤＮＡを修飾するためのシステム中の鋳型ＲＮＡの効力、例えば、鋳型ＲＮＡを含むシステムを効力について検定した後に、標的部位の少なくとも１％が修飾されているか否か；
（ｖｉｉ）ポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドの長さ、例えば、ポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドが、標準長さを超えるか、又は標準長さ範囲内の長さを有するか否か、例えば、存在するポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１０５０、１１００、１１５０、１２００、１２５０、１３００、１３５０、１４００、１４５０、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００若しくは２０００アミノ酸長を超える（且つ任意選択で、２５００、２０００、１５００、１４００、１３００、１２００、１１００、１０００、９００、８００、７００若しくは６００アミノ酸長以下である）か否か；
（ｖｉｉｉ）ポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドに対する翻訳後修飾の存在、非存在、及び／又は種類、例えば、ポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドの少なくとも８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８若しくは９９％が、リン酸化、メチル化、アセチル化、ミリストイル化、パルミトイル化、イソプレニル化、グリピヤチヨン若しくはリポイル化又はそれらの任意の組合せを含むか否か；
（ｉｘ）ポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチド中の１つ若しくは複数の人工、合成、又は非標準アミノ酸（例えば、オルニチン、β－アラニン、ＧＡＢＡ、δ－アミノレブリン酸、ＰＡＢＡ、Ｄ－アミノ酸（例えば、Ｄ－アラニン若しくはＤ－グルタミン酸）、アミノイソ酪酸、デヒドロアラニン、シスタチオニン、ランチオニン、ジェンコル酸、ジアミノピメリン酸、ホモアラニン、ノルバリン、ノルロイシン、ホモノルロイシン、ホモセリン、Ｏ－メチル－ホモセリン及びＯ－エチル－ホモセリン、エチオニン、セレノシステイン、セレノホモシステイン、セレノメチオニン、セレノエチオニン、テルロシステイン若しくはテルロメチオニンから選択される）の存在、非存在、及び／又は種類、例えば、存在するポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、１つ又は複数の人工、合成、又は非標準アミノ酸を含むか否か；
（ｘ）ポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドの安定性（例えば、時間経過による及び／若しくは予め選択した条件下で）、例えば、ｗｈｅｔｈｅｒポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、安定性試験の後に、インタクトなままである（例えば、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１０５０、１１００、１１５０、１２００、１２５０、１３００、１３５０、１４００、１４５０、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００若しくは２０００アミノ酸長を超える（且つ任意選択で、２５００、２０００、１５００、１４００、１３００、１２００、１１００、１０００、９００、８００、７００若しくは６００アミノ酸長以下である））か否か；
（ｘｉ）ＤＮＡを修飾するためのシステム中のポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドの効力、例えば、ポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドを含むシステムを効力について検定した後に、標的部位の少なくとも１％が修飾されているか否か；又は
（ｘｉｉ）パイロジェン、ウイルス、真菌、細菌性病原体、又は宿主細胞タンパク質の

１つ又は複数の存在、非存在、及び／若しくはレベル、例えば、システムが、パイロジェン、ウイルス、真菌、細菌性病原体、又は宿主細胞タンパク質混入を含まないか若しくは実質的に含まないか否か。

【０６００】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステム又は医薬組成物は、エンドトキシンを含まない。

【０６０１】

一部の実施形態では、パイロジェン、ウイルス、真菌、細菌性病原体、及び／又は宿主細胞タンパク質の１つ又は複数の存在、非存在、及び／若しくはレベルが決定される。複数の実施形態では、システムが、パイロジェン、ウイルス、真菌、細菌性病原体、及び／又は宿主細胞タンパク質混入を含まないか若しくは実質的に含まないか否かが決定される。

【０６０２】

一部の実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物又はシステムは、以下の特徴１つ又は複数（例えば、１、２、３若しくは４つ）を有する：

（ａ）例えば、モル基準で、鋳型ＲＮＡ及び／又はポリペプチドをコードするＲＮＡに対して、１％未満（例えば、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％若しくは０．１％未満）のＤＮＡ鋳型；

（ｂ）例えば、モル基準で、鋳型ＲＮＡ及び／又はポリペプチドをコードするＲＮＡに対して、１％未満（例えば、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％若しくは０．１％未満）の非キャップＲＮＡ；

（ｃ）例えば、モル基準で、鋳型ＲＮＡ及び／又はポリペプチドをコードするＲＮＡに対して、１％未満（例えば、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％若しくは０．１％未満）の部分長ＲＮＡ；

（ｄ）未反応キャップジヌクレオチドを実質的に含まない。

【実施例】

【０６０３】

本発明を以下の実施例により更に説明する。これらの実施例は、説明の目的で提供されるものであるに過ぎず、本発明の範囲又は内容を限定するものとして決して解釈すべきではない。

【０６０４】

実施例１：ヒト細胞での正確な編集を可能にするための、様々なＰｏｌドメインとのＣａｓ－Ｐｏｌ融合を含む遺伝子組換えシステム

この実施例は、Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合が、ヒト細胞内のゲノムＤＮＡに突然変異をプログラム可能にインストールする能力を説明する。より具体的には、Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合のポリメラーゼドメイン、例えば、本出願に記載されるポリメラーゼドメイン、例えば、ヒトＤＮＡ　Ｐｏｌθを変化させて、新規なポリメラーゼ組合せを使用するＣａｓ－Ｐｏｌ融合のゲノム編集能力を決定する。鋳型核酸は、Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合の標的編集活性を決定するために、ヒト細胞内のＣａｓ－Ｐｏｌ発現プラスミドと共に同時送達される。

【０６０５】

ゲノム改変ポリペプチドのドメインライブラリーを生成するために、Ｃａｓエフェクタータンパク質が選択される；表３及び表４を参照されたい。本明細書に記載されるゲノム改変ポリペプチドで使用するために、更なるＣａｓ９ドメインを更に選択し、標的配列のＰＡＭ要件、ニッカーゼ活性を付与するための予測突然変異（例えば、ＳｐＣａｓ９についてＤ１０Ａ、Ｈ８４０Ａ又はＮ８６３Ａ）、及び単一ガイド組成物を含むｇＲＮＡ特徴、例えば、コグネイトＣａｓ酵素に対するポリペプチド結合を付与するための特定のスペーサーパラメータ及びｇＲＮＡスカフォールド配列を含む特徴を決定することができる（表８）。融合タンパク質を最適化するために、長さ、柔軟性、及び組成の多様性の検索に基づいて、Ｃａｓ及びＰｏｌドメインを接続するためのリンカー配列を収集する（表６）。ポリメラーゼドメインは、本出願に記載されるように、文献及びポリメラーゼタンパク

質ドメインシグネチャーを使用して、多様な供給源から利用する。これは、ＲＮＡ及び／又はＤＮＡ依存性ＤＮＡ重合活性の能力を有する野生型ポリメラーゼ、改善された特性（例えば、熱安定性、処理能力、忠実度）を有する誘導されたポリメラーゼ、不活性化又は再活性化機能ドメインを有する誘導されたポリメラーゼ（例えば、５’－３’若しくは３’－５’エキソヌクレアーゼ活性、プルーフリーディング活性、ヘリカーゼ活性若しくはＲＮａｓｅ活性を付与する不活性化又は再活性化ドメイン）並びに合成的に進化したＲＮＡ依存性及び／又はＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性を有するポリメラーゼ（例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれるＥｌｌｅｆｓｏｎ ｅｔ ａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ ３５２（６２９３）：１５９０－１５９３（２０１６）に記載される、サーモコッカス・コダカレンシス（Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ ｋｏｄａｋａｒｅｎｓｉｓ）（ＫＯＤ）のＰｏｌＢに由来するＲＴＸポリメラーゼ）を含む。

【０６０６】

具体的には、遺伝子組換えポリペプチドとの関連で新規なＰｏｌドメインを使用して、ゲノムの編集に成功することを評価するために、Ｃａｓ９（Ｎ８６３Ａ）ニッカーゼへの融合について例示的なＰｏｌドメインのサブセットを選択する。簡潔に述べると、単量体ヒトポリメラーゼのタンパク質配列が、ＵｎｉＰｒｏｔ（Ｔｈｅ ＵｎｉＰｒｏｔ Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４９（Ｄ１）：Ｄ４８０－Ｄ４８９（２０２１））を用いて決定され、機能ドメインが、ＩｎｔｅｒＰｒｏ（Ｂｌｕｍ ｅｔ ａｌ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４９（Ｄ１）：Ｄ３４４－Ｄ３５４（２０２１））及びＩｎｔｅｒＰｒｏＳｃａｎ（Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ３０（９）：１２３６－１２４０（２０１４））（その中の表Ｘ）を用いて更に予測され、注釈を付けられる。そのような例に限定されることは意図しないが、単一のサブユニットを含む、ポリメラーゼファミリーＹ、Ｘ、及びＡからのタンパク質が記載されている（例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｈｏｉｔｓｍａ ｅｔ ａｌ Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ ７７（１）：３５－５９（２０２０）を参照）。

【０６０７】

ゲノム改変システムＣａｓ－Ｐｏｌ融合を使用して正確な編集を生成するために、鋳型核酸を構築して、Ｐｏｌドメインによるゲノム標的部位への編集の重合を鋳型化する。鋳型核酸は、（ｉ）Ｃａｓ－Ｐｏｌを標的領域にガイドするためのｇＲＮＡスペーサー配列、例えば、ＨＥＫ３遺伝子座の２０ヌクレオチド配列に相補的な配列；（ｉｉ）標的プライミング重合のためのニックＤＮＡの一本鎖と相補的な塩基対形成が可能なプライマー結合配列（ＰＢＳ）；（ｉｉｉ）意図された最終標的配列を更に含む重合のための鋳型を提供する異種目的配列；及び（ｉｖ）Ｃａｓ９－Ｐｏｌポリペプチド融合のＣａｓ９ドメインに関連するｇＲＮＡスカフォールド配列を含むように設計される。ここで採用された構築物は、具体的には５’から３’の配向（ｉ）、（ｉｖ）、（ｉｉｉ）、（ｉｉ）に従う。一部の実施形態では、（ｉｉｉ）は、ＲＮＡ及び／又はＤＮＡヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、（ｉｉ）は、ＲＮＡ及び／又はＤＮＡヌクレオチドを含み得る。例に限定されることは意図しないが、（ｉ）及び（ｉｖ）は、これらの実験においてＲＮＡヌクレオチドを含む。鋳型組成物が、表２１（鋳型Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３）に記載され、ここで、（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）はそれぞれ、ＲＮＡ又はＤＮＡヌクレオチドのいずれかとして含まれ得る。鋳型分子は、任意選択で、５’キャップ及び３’ポリＡテールを更に含む。

【０６０８】

【表２０】

表20: 実施例1において使用される鋳型核酸及び第2ニックgRNA

名称	記述	スペーサー (i)	スカフォールド (iv)	Pol鋳型 (iii)	PBS (ii)	完全な鋳型分子
鋳型P1	HEK3_8PBS_10RT(CTTat1)	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	TCTGCCATCAAAG	CGTGCTCA	GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCA
鋳型P2	HEK3_13PBS_10RT(CTTat1)	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	TCTGCCATCAAAG	CGTGCTCAGTCTG	GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTG
鋳型P3	HEK3_17PBS_10RT(CTTat1)	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	TCTGCCATCAAAG	CGTGCTCAGTCTGGGCC	GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTGGGCC
鋳型P4	HBB_13PBS_10RT(TtoAat4)	GCATGGTGCACCTGACTCCTG	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	AGACTTCTCCACAG	GAGTCAGGTGCAC	GCATGGTGCACCTGACTCCTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCAGACTTCTCCACAGGAGTCAGGTGCAC
2gRNA P5	HEK3_+90	GTCAACCAGTATCCCGGTGC	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	NA	NA	NA
2gRNA P6	HBB_+72	GCCTTGATACCAACCTGCCCA	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	NA	NA	NA

【０６０９】

ＵＯＳ又はＨＥＫ２９３Ｔ細胞は、約８００ｎｇのＣａｓ９－Ｐｏｌ融合（例えば、ｐｏｌθ融合）発現プラスミド、２００ｎｇの化学的に合成された鋳型核酸分子、及び任意選択で８３ｎｇの更なる第２のニックｇＲＮＡ（鋳型Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３について２ｇＲＮＡ　Ｐ５又は鋳型Ｐ４について２ｇＲＮＡ　Ｐ６）（表２１）で、２５０，０００個の細胞／ウェルのエレクトロポレーションによってトランスフェクトされる。Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合のゲノム編集能力を評価するために、トランスフェクション後３日目にゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）を収集する。標的遺伝子座（鋳型Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３についてＨＥＫ３又は鋳型Ｐ４についてＨＢＢ）での意図した編集（設計どおりの正確で傷のない編集）と意図しない編集（標的配列への意図しない変更）の頻度を、アンプリコン配列決定によって分析する。本明細書で使用される場合、標的部位のアンプリコン配列決定は、標的部位のＰＣＲ増幅における部位特異的プライマーの使用、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑでのアンプリコンの配列決定並びにＣＲＩＳＰＲｅｓｓｏ２パイプラインを使用した編集事象の検出及び特性決定を含む（Ｃｌｅｍｅｎｔ　ｅｔ　ａｌ　Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　３７（３）：２２４－２２６（２０１９））。一部の実施形態では、活性なＣａｓ－Ｐｏｌ融合は、検出可能なレベルの編集をもたらし、例えば、少なくとも０．１％のシーケンシングリードが、標的部位編集を実証する。一部の実施形態では、望ましいＣａｓ－Ｐｏｌ融合は、意図しない編集に対してより高い意図した編集の頻度、例えば、意図しない編

集に対して少なくとも２倍高い意図した編集の頻度を実証する。

【０６１０】

実施例２：リンカーの選択によるＣａｓ－Ｐｏｌ融合の発現の改善

この実施例は、哺乳動物細胞におけるタンパク質発現を改善するためのＣａｓ－Ｐｏｌ融合の最適化を示す。上記の実施例１に記載されるように、新しい機能ドメインの置換による新規なＣａｓ－Ｐｏｌ融合の構築は、ゲノム改変ポリペプチドの低又は中程度の発現を生じ得る。従って、融合の改変された構成が、異なるドメインの状況において有利である可能性があると考えられる。例に限定されることは意図しないが、新しい融合の発現及び安定性を改善するためのそのようなアプローチの１つは、リンカーライブラリーの使用によるものである。ここでは、Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合のＣａｓドメインとＰｏｌドメインの間のペプチドリンカー配列は、リンカー配列のライブラリーを使用して変更される。より具体的には、以下の表２１からのリンカーを使用して、Ｃａｓ９融合構築物の新しい変異体を生成し、ヒト細胞に送達して、改善されたＣａｓ－Ｐｏｌタンパク質発現についてスクリーニングする。

【０６１１】

長さ、柔軟性、疎水性、及び二次構造の程度が異なる２２個のペプチドリンカーのセット（表２１）を最初に使用して、元のリンカーの置換によりＣａｓ－Ｐｏｌ融合タンパク質の変異体を生成する（上記に言及される実施例３０を参照）。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞は、２００ｎｇのシングルガイドＲＮＡプラスミドと共に、約８００ｎｇの各Ｃａｓ９－Ｐｏｌ融合プラスミドで、２５０，０００個の細胞／ウェルのエレクトロポレーションによってトランスフェクトされる。Ｃａｓ９－Ｐｏｌ融合の発現レベルを評価するために、トランスフェクション後２日目に細胞溶解物を収集し、Ｃａｓ９に対する一次抗体を使用してウェスタンブロットによって分析する。

【０６１２】

【表２１】

表21. Cas-Pol融合を含むゲノム改変ポリペプチドにおけるCas及びPolドメインの間のリンカーとしての使用のためのペプチド配列

#	リンカー配列	注記
1	GGS	短い
2	GGGGS	柔軟、短い
3	(GGGGS)2	柔軟
4	(GGGGS)3	柔軟、長い
5	(GGGGS)4	柔軟、非常に長い
6	(G)6	柔軟
7	(G)8	柔軟
8	GSACSAAGSGEF	柔軟
9	(GSSGSS)	中
10	(GSSGSS)2	中、柔軟
11	(GSSGSS)3	中
12	SGSETPGTSESATPES	XTEN
13	(EAAAK)	剛直ヘリックス、短い
14	(EAAAK)2	剛直ヘリックス、中
15	(EAAAK)3	剛直ヘリックス、長い
16	PAP	剛直、短い
17	PAPAP	剛直、短い
18	PAPAPAPAP	剛直、中
19	A(EAAAK)4ALEA(EAAAK)4A	剛直、らせんを有し非常に長い
20	GGGGS(EAAAK)GGGGS	柔軟-ヘリックス-柔軟
21	(EAAAK)GGGGS(EAAAK)	ヘリックス-柔軟-ヘリックス
22	SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	柔軟-XTEN-柔軟

【０６１３】

実施例３：ＨＥＫ２９３Ｔ及びＵ２ＯＳ細胞におけるプールスクリーニングによる遺伝子組換えポリペプチド選択

この実施例は、ヒトゲノムにおけるコード配列の標的化編集のためのＲＮＡ遺伝子組換えシステムの使用を説明する。より具体的には、この実施例は、例えば、プールスクリーニング手法により、ヒト細胞内の活性を編集するための新規な遺伝子組換えポリペプチドを評価する手段としての、遺伝子組換え候補のライブラリーによるＨＥＫ２９３Ｔ及びＵ２ＯＳ細胞の感染、続いて、細胞内のインビトロ遺伝子組換えのための鋳型ガイドＲＮＡ（ｔｇＲＮＡ）のトランスフェクションを説明する。

【０６１４】

本明細書においてアッセイされる遺伝子組換えポリペプチドライブラリー候補は、それぞれ以下を含む：１）１つのエンドヌクレアーゼ活性部位を不活性化するＮ８６３Ａ突然変異を含有する化膿性レンサ球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）（Ｓｐｙ）Ｃａｓ９ニッカーゼ；２）表６に示される１２２のペプチドリンカーの１つ；及び３）レトロウイルス由来の表２からの逆転写酵素（ＲＴ）ドメイン。用いられる特定のレトロウイルスＲＴドメインは、それらがモノマーとして機能することが予想される場合に選択された。各選択されたＲＴドメインについて、野生型配列及び一次野生型配列に導入された点突然変異を有する形態が試験された。特に、野生型であるか又は様々な突然変異を含む１４３のＲＴドメインが試験された。合計で、１７，４４６のＣａｓ－リンカー－ＲＴ遺伝子組換えポリペプチドが試験された。

【０６１５】

本明細書に記載されるシステムは、１）レンチウイルスカセット内のヒトコドン最適化遺伝子組換えポリペプチドライブラリー候補をコードする発現プラスミド、及び２）Ｃａｓによって認識され、それを目的のゲノム遺伝子座に局在化し、またＵ６プロモータによって駆動されるＲＴドメインによって所望の編集の逆転写をゲノムに鋳型化するノンコーディングｔｇＲＮＡ配列を発現するｔｇＲＮＡ発現プラスミドを含む２成分システムである。レンチウイルスカセットは、（ｉ）哺乳動物細胞内の発現のためのＣＭＶプロモータ；（ｉｉ）示されるような遺伝子組換えポリペプチドライブラリー候補；（ｉｉｉ）自己切断Ｔ２Ａポリペプチド；（ｉｖ）哺乳動物細胞における選択を可能にするピューロマイシン耐性遺伝子；及び（ｖ）ポリＡテール終結シグナルを含む。

【０６１６】

遺伝子組換えポリペプチドライブラリー候補を発現する細胞のプールを調製するために、ＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞に、遺伝子組換え候補プラスミドライブラリーのプールされたレンチウイルス調製物を形質導入した。ＨＥＫ２９３　Ｌｅｎｔｉ－Ｘ細胞を、レンチウイルスプラスミドトランスフェクションの前に、１５ｃｍプレートに播種した（12×10^{6}個の細胞）。Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ　Ｐａｃｋａｇｉｎｇ　Ｍｉｘ（Ｂｉｏｓｅｔｔｉａ、２７ｕｇ）及び遺伝子組換え候補ライブラリーのためのプラスミドＤＮＡ（２７ｕｇ）を用いたレンチウイルスプラスミドトランスフェクションを、製造業者のプロトコルに従って、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００及びＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地を用いて、翌日に行った。細胞外ＤＮＡを、翌日、完全な培地交換によって除去し、ウイルス含有培地を、４８時間後に収集した。レンチウイルス培地を、Ｌｅｎｔｉ－Ｘ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ（ＴａＫａＲａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて濃縮し、５ｍＬのレンチウイルスアリコートを作製し、－８０℃で貯蔵した。レンチウイルス力価測定を、ピューロマイシン選択後にコロニー形成単位を計数することによって行った。ＢＦＰ発現ゲノムランディングパッドを担持するＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞を、培養プレート中6×10^{7}個の細胞で播種し、細胞当たりの多重感染を最小限に抑えるために０．３感染多重度（ＭＯＩ）で形質導入した。ピューロマイシン（２．５ｕｇ／ｍＬ）を、感染細胞の選択を可能にするために、感染の４８時間後に加えた。細胞を、少なくとも７日間にわたってピューロマイシン選択下に置き、次に、ｔｇＲＮＡエレクトロポレーションのためにスケールアップした。

【０６１７】

アッセイにおける遺伝子組換えライブラリー候補のゲノム編集能力を決定するために、次に、感染されたＢＦＰ発現ＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞を、ライブラリー候補につ

き＞１０００×カバレージのために十分な細胞数で、ＢＦＰをＧＦＰに変換するように設計された２００ｎｇのｔｇＲＮＡ（ｇ４又はｇ１０のいずれか）プラスミドによる、２５０，０００個の細胞／ウェルのエレクトロポレーションによってトランスフェクトした。

【０６１８】

ｇ４　ｔｇＲＮＡ（５’－３’）は、以下のとおりである：２０ヌクレオチドスペーサー領域（ＧＣＣＧＡＡＧＣＡＣＴＧＣＡＣＧＣＣＧＴ）、スカフォールド領域（ＧＴＴＴＴＡＧＡＧＣＴＡＧＡＡＡＴＡＧＣＡＡＧＴＴＡＡＡＡＴＡＡＧＧＣＴＡＧＴＣＣＧＴＴＡＴＣＡＡＣＴＴＧＡＡＡＡＡＧＴＧＧＣＡＣＣＧＡＧＴＣＧＧＴＧＣ）、ＢＦＰをＧＦＰに変化させる単一の塩基対置換（太字）及び機能遺伝子組換え反応の完了時に遺伝子組換えポリペプチドの再エンゲージメントを防ぐＳｐｙＣａｓ９　ＰＡＭ（ＮＧＧからＮＣＧ）における同義点突然変異を導入するＰＡＭ不活性化（下線）をコードする鋳型領域（

【化３２】

(ACCCTGAC<u>G</u>TACG)

）、及び１３ヌクレオチドＰＢＳ（ＧＣＧＴＧＣＡＧＴＧＣＴＴ）。

【０６１９】

同様に、ｇ１０　ｔｇＲＮＡ（５’－３’）は、以下のとおりである：２０ヌクレオチドスペーサー領域（ＡＧＡＡＧＴＣＧＴＧＣＴＧＣＴＴＣＡＴＧ）、スカフォールド領域（ＧＴＴＴＴＡＧＡＧＣＴＡＧＡＡＡＴＡＧＣＡＡＧＴＴＡＡＡＡＴＡＡＧＧＣＴＡＧＴＣＣＧＴＴＡＴＣＡＡＣＴＴＧＡＡＡＡＡＧＴＧＧＣＡＣＣＧＡＧＴＣＧＧＴＧＣ）、ＢＦＰをＧＦＰに変化させる単一の塩基対置換（太字）及び機能遺伝子組換え反応の完了時に遺伝子組換えポリペプチドの再エンゲージメントを防ぐＳｐｙＣａｓ９　ＰＡＭ（ＮＧＧからＮＧＡ）における同義点突然変異を導入するＰＡＭ不活性化（下線）をコードする鋳型領域（

【化３３】

(ACCCTGACC<u>T</u>ACGGCGTGCAGTGCTTCGGCCGCTACCCCGATCACAT)

）、及び１３ヌクレオチドＰＢＳ（ＧＡＡＧＣＡＧＣＡＣＧＡＣ）。

【０６２０】

アッセイにおいて様々な構築物のゲノム編集能力を評価するために、細胞を、エレクトロポレーションの６～７日後に、ＧＦＰ発現のために蛍光活性化細胞ソーティング（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ－Ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｏｒｔｉｎｇ）（ＦＡＣＳ）によってソートした。細胞をソートし、非編集（ＢＦＰ＋）細胞、編集（ＧＦＰ＋）細胞及び不完全な編集（ＢＦＰ－、ＧＦＰ－）細胞の異なる集団として収集した。非ソート細胞のサンプルも、分析中の富化を決定するために、入力集団として収集した。

【０６２１】

どの遺伝子組換えライブラリー候補が、このアッセイにおいてゲノム編集能力を有するかを決定するために、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）を、ソート及び非ソート細胞集団から収集し、各集団における遺伝子組換えライブラリー候補をシーケンシングすることによって分析した。簡潔に述べると、遺伝子組換え配列を、レンチウイルスカセットに特異的なプライマーを用いてゲノムから増幅し、ゲノムＤＮＡを希釈するために第２回のＰＣＲにおいて増幅し、次に、製造業者のプロトコルに従って、Ｏｘｆｏｒｄ　Ｎａｎｏｐｏｒｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙを用いてシーケンシングした。

【０６２２】

シーケンシングリードの品質管理の後、少なくとも１５００且つ３２００ヌクレオチド以下のリードを、遺伝子組換えポリペプチドライブラリー配列にマップし、ライブラリー配列との最小で８０％の一致を含むものが、所与の候補と問題なく整列されたと見なされた。アッセイにおいて遺伝子編集を行うことが可能な遺伝子組換え候補を同定するために、編集された集団における各ライブラリー候補のリードカウントを、最初の非ソート集団

におけるそのリードカウントと比較した。このプールされたスクリーンのために、ゲノム編集能力を有する遺伝子組換え候補を、非ソート（入力）細胞と比べて変換された（ＧＦＰ＋）集団において富化された候補として選択し、富化は、参照（エレメントＩＤ番号：１７３８０）の富化レベルであるか又はそれを超えると決定された。

【０６２３】

多数の遺伝子組換えポリペプチド候補が、ＧＦＰ＋細胞集団において富化されていることが決定された。例えば、試験された１７，４４６の候補のうち、３，３００超が（非ソートと比べて）ＧＦＰ＋ソート集団において富化を示し、これは、表Ｄに示される、同様の実験条件（ｇ４　ｔｇＲＮＡを用いたＨＥＫ２９３Ｔ；ｇ１０　ｔｇＲＮＡを用いたＨＥＫ２９３Ｔ細胞；又はｇ４　ｔｇＲＮＡを用いたＵ２ＯＳ細胞）下の参照のものと少なくとも同等であった。１７，４４６の候補は、ｇ１０　ｔｇＲＮＡを用いたＵ２ＯＳ細胞でも試験されたが、プールされたスクリーンでは、その実験条件下における非ソート（入力）細胞と比べて、変換された（ＧＦＰ＋）集団において富化された候補を得られず；これらの結果を説明するために、更なる調査が必要とされる。

【０６２４】

【表Ｄ１－１】

表D. スクリーニングされるリンカー及びRT配列の組合せ。この表中の各RTのアミノ酸配列は、表6に示される。

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
PAPEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKPAPGGG	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGGEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKPAPGGS	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	MLVFF_P26809_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	XMRV6_A1Z651_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
PAPEAAAKGSS	MLVFF_P26809_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	AVIRE_P03360_3mutA
PAPAPAPAPAP	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAPAPAPAP	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGGSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAP	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGGGSS	WMSV_P03359_3mutA
SGSETPGTSESATPES	MLVFF_P26809_3mutA
PAPEAAAKGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGS	MLVFF_P26809_3mutA
GGGPAPGSS	MLVAV_P03356_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVCB_P08361_3mutA
GSSPAP	AVIRE_P03360_3mutA

【０６２５】

【表Ｄ１－２】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKGSSPAP	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGGGEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPAPAPAP	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGSPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGGSEAAAK	AVIRE_P03360_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	WMSV_P03359_3mutA
GSS	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GSSPAPEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSPAPEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
GGGEAAAKGGS	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGPAP	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAPAPAPAPAP	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	MLVCB_P08361_3mutA
PAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPAPAPAPAPAP	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKPAPGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSEAAAKGGGGS	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKPAPGSS	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGSPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGGPAP	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
PAP	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGSSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAKGGG	MLVAV_P03356_3mutA
GGGEAAAKGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA

【０６２６】

【表Ｄ１－３】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGGSGGGGSGGGGS	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	AVIRE_P03360_3mutA
SGSETPGTSESATPES	AVIRE_P03360_3mutA
GGGEAAAKPAP	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGSSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	WMSV_P03359_3mut
GGSGGSGGSGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSEAAAKPAP	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGSSGGG	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGS	MLVFF_P26809_3mutA
GGGEAAAKGSS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPAPAPAPAPAP	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVCB_P08361_3mutA
GGGEAAAKGSS	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGSGSS	MLVFF_P26809_3mutA
GSAGSAAGSGEF	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGGGGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSS	XMRV6_A1Z651_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSSGSS	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGGGGSS	MLVCB_P08361_3mutA
GGGEAAAKGGS	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGGEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGGSPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGSSPAP	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
GGSGGSGGSGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGPAPGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKPAPGGS	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSS	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	FLV_P10273_3mutA
GSS	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPEAAAKGGG	MLVAV_P03356_3mutA

【０６２７】

【表Ｄ１－４】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGSGSSEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2
GSSEAAAKPAP	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGG	MLVFF_P26809_3mutA
GSSPAPGGG	MLVCB_P08361_3mutA
GGGPAPGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPAPAPAP	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGS	MLVCB_P08361_3mutA
PAPEAAAKGGS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGPAP	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	FLV_P10273_3mutA
GGSEAAAKGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGPAPGGS	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAPAPAPAPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGSSGGG	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGSSGGG	MLVCB_P08361_3mutA
GGGEAAAKGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
GGSPAPGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPAPAPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGGSGSS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGSSPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPAPAPAPAPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGSSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGGPAP	MLVCB_P08361_3mutA

【０６２８】

【表Ｄ１－５】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGGGGG	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	MLVCB_P08361_3mutA
GGGPAPGGS	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGGSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGGGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPAPAPAPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKGGS	MLVMS_P03355_PLV919
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	MLVMS_P03355_3mut
GSAGSAAGSGEF	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGGSGSS	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGGG	MLVFF_P26809_3mutA
GGGPAPGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPEAAAKGGS	AVIRE_P03360_3mutA
PAPGGGEAAAK	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSSEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGGGEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	MLVFF_P26809_3mutA
GSSPAPGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGGGPAP	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAK	AVIRE_P03360_3mutA
GSS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGGSGGS	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	AVIRE_P03360_3mut
PAPEAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGSSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSEAAAKPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGSEAAAK	WMSV_P03359_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVFF_P26809_3mut
GGGEAAAKGGS	AVIRE_P03360_3mutA
GGSPAPGGG	AVIRE_P03360_3mutA
GSAGSAAGSGEF	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKPAPGSS	WMSV_P03359_3mutA

【０６２９】

【表Ｄ１－６】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSEAAAKPAP	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAPAPAPAPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSPAPGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSEAAAKGGG	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGSGGSGGS	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
GGG	AVIRE_P03360_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGSGGSGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGGPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSEAAAKPAP	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVCB_P08361_3mut
GGGGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGSSGGG	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGGGEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPAPAPAPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKGGSGGG	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGEAAAKPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGGPAP	BAEVM_P10272_3mutA
PAPGSSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGGPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGSSGGG	MLVFF_P26809_3mutA
GSSEAAAKGGS	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGSSEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGSSPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGSSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGSSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGGGS	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
PAPAPAPAPAPAP	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGS	MLVCB_P08361_3mutA

【０６３０】

【表Ｄ１－７】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPGGSEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGSSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPEAAAKGSS	AVIRE_P03360_3mutA
GGSPAPGSS	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGG	MLVFF_P26809_3mutA
GGSEAAAKGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAPAPAPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSEAAAKGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GSSPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKPAP	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKPAPGGS	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGGGPAP	MLVAV_P03356_3mutA
PAPGGSEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
PAPGGSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGGSGSS	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGGGPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSSPAP	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGGGPAP	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGG	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGGGGGS	MLVMS_P03355_PLV919
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGGSGSS	KORV_Q9TTC1_3mut
GGGEAAAKGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGGG	BAEVM_P10272_3mutA
PAPAPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	SFV3L_P27401_2mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGSEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
PAP	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS

【０６３１】

【表Ｄ１－８】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPAP	AVIRE_P03360_3mutA
PAP	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGGG	MLVMS_P03355_3mut
GSSPAPGGS	MLVFF_P26809_3mutA
PAPAPAPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPEAAAKGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGGS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGG	MLVCB_P08361_3mutA
GSSEAAAKPAP	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGS	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGGS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	FLV_P10273_3mutA
PAPGGSEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
GSS	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSSGSS	AVIRE_P03360_3mutA
GSSGSSGSS	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
GGSPAPEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGSS	MLVCB_P08361_3mutA
GSSPAPGGG	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGSSPAP	FLV_P10273_3mutA
GGGGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSPAPGSS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPEAAAKGGG	FLV_P10273_3mutA
EAAAKPAPGGS	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPAP	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GSSPAPGGG	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGPAP	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGGEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGSSGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS

【０６３２】

【表Ｄ１－９】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKGGGGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGS	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGSSPAP	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPAPAPAPAP	BAEVM_P10272_3mutA
PAPAPAPAPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGGSGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKPAPGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPEAAAKGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGPAPGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGGSS	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	MLVFF_P26809_3mut
SGSETPGTSESATPES	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAKGGG	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	AVIRE_P03360_3mutA
PAPAPAPAPAP	AVIRE_P03360_3mut
GGSGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGSSEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
GGSPAPEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGGGS	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGGSGGSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAKGGG	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGSGGG	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSPAPGGG	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPEAAAKGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSEAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGSEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSPAPEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGPAP	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGSSGGG	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGSSGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS

【０６３３】

【表Ｄ１－１０】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGEAAAKGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSEAAAKGGS	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGSGSS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
PAPAPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGG	MLVAV_P03356_3mutA
GSSPAPEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGGSGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGPAPGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGPAPEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGGG	AVIRE_P03360_3mutA
SGSETPGTSESATPES	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGSSPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSGGSGGG	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	WMSV_P03359_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGGGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
SGSETPGTSESATPES	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSPAPEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSEAAAKGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSEAAAK	WMSV_P03359_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	AVIRE_P03360_3mutA
GSS	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGSEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKPAPGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKPAPGSS	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGGG	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKPAPGGS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGGEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	AVIRE_P03360_3mutA
GSSEAAAKPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGGSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGSS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKPAP	MLVCB_P08361_3mutA

【０６３４】

【表Ｄ１－１１】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPEAAAKGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSPAPGGG	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGSGSS	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGGPAP	MLVMS_P03355_PLV919
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	MLVMS_P03355
PAPEAAAKGSS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSEAAAKGGGS	FLV_P10273_3mutA
GGSEAAAKGGG	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGSEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKPAPGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGSGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSEAAAKPAP	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGSSPAP	MLVAV_P03356_3mutA
GGGPAPGGS	WMSV_P03359_3mutA
GGSPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSEAAAKGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGGGG	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSPAPGGG	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGGG	AVIRE_P03360_3mutA
GSSGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSPAPGSS	MLVFF_P26809_3mutA
PAPEAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGGPAP	MLVFF_P26809_3mutA
GGGEAAAKGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGSSPAP	MLVFF_P26809_3mutA
SGSETPGTSESATPES	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAKGSS	MLVAV_P03356_3mutA

【０６３５】

【表Ｄ１－１２】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPAPAPAPAPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGGSEAAAK	PERV_Q4VFZ2
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGGSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGSSEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
GSAGSAAGSGEF	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGGGSEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
GGSPAPGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSEAAAKGGG	AVIRE_P03360_3mutA
GGGEAAAKPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGPAP	AVIRE_P03360_3mutA
GGSEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKPAPGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGGGGG	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSAGSAAGSGEF	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGGGEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSSGGS	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGSEAAAK	BAEVM_P10272_3mut
PAPGGGEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSEAAAKPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPAP	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAP	MLVFF_P26809_3mutA
GGSPAP	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGSSGGS	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGSSGGS	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPAPAP	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGGSGSS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSSEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSEAAAKPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	WMSV_P03359_3mut
GGSGGGEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA

【０６３６】

【表Ｄ１－１３】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGS	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGGGGGS	MLVMS_P03355_3mut
PAPGGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGSPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
SGSETPGTSESATPES	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPAPAPAPAP	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSEAAAKPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGSSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSPAPGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	SFV1_P23074_2mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GSAGSAAGSGEF	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSEAAAKPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGSGGS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGSGSS	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	FLV_P10273_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGSSPAP	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGSS	WMSV_P03359_3mutA
PAPEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKPAP	BAEVM_P10272_3mutA
GSSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGGSEAAAK	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSPAP	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGSSEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA

【０６３７】

【表Ｄ１－１４】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPGSSGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGGG	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGGSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGSGGSGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GSSPAP	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAPAPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGG	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSEAAAKGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGSEAAAK	FLV_P10273_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSPAPEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSSGSSGSSGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKPAPGGS	MLVMS_P03355_3mut
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	FLV_P10273_3mut
GGSPAPEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKGGSGGG	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
GSSPAP	WMSV_P03359_3mutA
PAPAPAPAP	MLVAV_P03356_3mutA
PAPGGSEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mut
GGSGSSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGG	MLVCB_P08361_3mutA
GGGEAAAKGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGSGGG	MLVFF_P26809_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	FFV_O93209
PAPGGGGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGS	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGSGGS	WMSV_P03359_3mutA
PAPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGSSEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGSSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS

【０６３８】

【表Ｄ１－１５】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGGGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGS	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGSSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAKPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GGSPAPGSS	BAEVM_P10272_3mutA
GSAGSAAGSGEF	MLVCB_P08361_3mut
GGSPAPGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	MLVCB_P08361_3mutA
GGSEAAAKGSS	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGGGEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGSS	MLVCB_P08361_3mut
PAPAPAPAPAPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSPAPGGG	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	GALV_P21414_3mut
PAPAPAPAPAPAP	WMSV_P03359_3mutA
GGGEAAAKGGS	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGGGPAP	KORV_Q9TTC1_3mut
PAPEAAAKGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPEAAAKGSS	FLV_P10273_3mutA
PAPGGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GSSPAPGGG	BAEVM_P10272_3mutA
GGGEAAAKPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKGSS	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGGGGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGGGGG	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSSGGS	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	BAEVM_P10272_3mutA
PAP	MLVMS_P03355_3mut

【０６３９】

【表Ｄ１－１６】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKGSSPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPEAAAKGGS	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGGGEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
PAPAPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSEAAAKGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGS	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSEAAAKGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGSSGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSSEAAAK	BAEVM_P10272_3mut
GGSGGSGGSGGS	AVIRE_P03360_3mutA
PAPGSSGGS	MLVFF_P26809_3mutA
GSSPAPGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSSEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
PAPEAAAKGGG	AVIRE_P03360_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
GGGGGSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSSGSSGSSGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGSPAP	FLV_P10273_3mut
GGGEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGS	FLV_P10273_3mutA
GGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGSPAPEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKEAAAK	FLV_P10273_3mutA
GGGEAAAKPAP	BAEVM_P10272_3mutA
GGGEAAAKGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGGPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS

【０６４０】

【表Ｄ１－１７】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPEAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSS	MLVCB_P08361_3mutA
GGSEAAAKGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	BAEVM_P10272_3mut
GGGGSSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAKPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGSSEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPEAAAKGSS	WMSV_P03359_3mutA
PAPAPAPAPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSGGGEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GSSPAPGGG	MLVFF_P26809_3mutA
GGSPAPEAAAK	MLVFF_P26809_3mut
PAPGGSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSS	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGSSGGG	BAEVM_P10272_3mutA
GSSGGGEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGPAPGGS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKPAP	MLVAV_P03356_3mutA
SGSETPGTSESATPES	FLV_P10273_3mutA
PAPAPAPAPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	BAEVM_P10272_3mutA
PAPGSSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSSPAP	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGGGPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSSPAP	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGG	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSGSSGSSGSS	WMSV_P03359_3mutA
PAPEAAAKGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAK	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGGSGSS	AVIRE_P03360_3mutA
GSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut

【０６４１】

【表Ｄ１－１８】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGSGSSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GGSEAAAKGGG	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVAV_P03356_3mutA
PAPAPAPAPAPAP	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKPAPGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPGSSEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGSSPAP	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGEAAAKGGS	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSSGGG	MLVMS_P03355_3mut
GGGPAPGGS	MLVAV_P03356_3mutA
PAPGGGGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGPAPGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGGG	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGGGGSS	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGGG	FLV_P10273_3mutA
GGSEAAAKGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSPAPGGG	BAEVM_P10272_3mutA
GGSPAPGSS	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGGSGGSGGS	KORV_Q9TTC1_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPGSSGGS	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKGGGGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGSS	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKGSS	MLVFF_P26809_3mutA
GGGPAP	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGGS	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGGSPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	WMSV_P03359_3mutA
GSSPAPGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGEAAAKGSS	AVIRE_P03360_3mutA
GGGGSSEAAAK	AVIRE_P03360_3mutA
GGGGGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGSSEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKGSS	MLVFF_P26809_3mut
GSSEAAAKGGG	MLVCB_P08361_3mutA
GGSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS

【０６４２】

【表Ｄ１－１９】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GSSEAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGSGGG	WMSV_P03359_3mutA
GSSGGSGGG	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGSSGGG	FLV_P10273_3mutA
GSSEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGGGEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSGGGGS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGSPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GGGPAPGGS	AVIRE_P03360_3mutA
GSSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
SGSETPGTSESATPES	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGSSPAP	MLVMS_P03355_3mut
GGGGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSPAPGGG	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKPAPGSS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGG	MLVMS_P03355_3mut
GSSEAAAKPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGSSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSS	BAEVM_P10272_3mutA
PAPAP	MLVFF_P26809_3mut
PAPEAAAKGGG	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKGGS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPAPAPAPAPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
PAPGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSS	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGS	MLVAV_P03356_3mutA
GSSPAPEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSSGGS	MLVFF_P26809_3mutA
PAPEAAAKGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGG	MLVAV_P03356_3mutA
PAPGSSEAAAK	FLV_P10273_3mutA
EAAAKGSSGGG	MLVCB_P08361_3mutA

【０６４３】

【表Ｄ１－２０】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSPAPEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	MLVAV_P03356_3mutA
GSSEAAAKPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGGEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPGGSGGG	AVIRE_P03360_3mutA
PAPGGSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPAPAPAPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GSSGGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGS	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGSSGGG	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
SGSETPGTSESATPES	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGSSGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPEAAAKGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPEAAAK	AVIRE_P03360_3mutA
GSSEAAAKGGG	BAEVM_P10272_3mutA
GSSPAP	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVFF_P26809_3mut
PAPGGSGSS	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGSEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGGS	MLVFF_P26809_3mutA
GGSPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGSS	MLVMS_P03355_PLV919
SGSETPGTSESATPES	WMSV_P03359_3mut
GGGGGGG	WMSV_P03359_3mut
GGSPAPGSS	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGSSGGS	WMSV_P03359_3mut
PAPGGS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSSGGS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVFF_P26809_3mut
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGSGGSGGSGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GSSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut

【０６４４】

【表Ｄ１－２１】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGS	MLVMS_P03355_3mut
PAPAPAPAPAP	MLVMS_P03355_3mut
GGSPAPEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAK	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGSSGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGGGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGEAAAKPAP	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGSGGG	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGGSEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGGGG	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGGG	MLVMS_P03355_3mut
GGGGGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	AVIRE_P03360
PAPGSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGS	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	FLV_P10273_3mut
EAAAKGSSPAP	MLVMS_P03355_3mut
SGSETPGTSESATPES	BAEVM_P10272_3mutA
GGSPAPEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSSGSSGSS	MLVAV_P03356_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	MLVMS_P03355_3mut
GGSPAP	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGG	MLVFF_P26809_3mutA
GSSEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
GGS	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGGSPAP	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAPAPAP	FLV_P10273_3mutA
PAPGGGEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGG	MLVMS_P03355_3mut
PAPEAAAKGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGGPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut

【０６４５】

【表Ｄ１－２２】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GSSGGSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGS	WMSV_P03359_3mutA
GGGGGSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGSS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGSSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSSEAAAK	MLVFF_P26809_3mut
PAPAPAP	MLVMS_P03355_3mut
GSSGGSEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPEAAAKGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGSSPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSSPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPGGGEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
GSSGGSEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	FLV_P10273_3mut
GSSEAAAKPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKPAPGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGSPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSEAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAKGGS	WMSV_P03359_3mutA
GSSEAAAKGGG	MLVFF_P26809_3mut
PAPAPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGGSPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGGSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGSSGGG	KORV_Q9TTC1_3mut
EAAAKGGGPAP	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGSS	BAEVM_P10272_3mutA
GGSPAPGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGSEAAAKGGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGEAAAKGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGGGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGPAP	MLVFF_P26809_3mut
GSSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGS	MLVMS_P03355_3mut

【０６４６】

【表Ｄ１－２３】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGSSPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSSGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGGG	MLVAV_P03356_3mutA
GSSPAPEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
GGGPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGGGGS	AVIRE_P03360_3mutA
SGSETPGTSESATPES	MLVMS_P03355_PLV919
GGGPAP	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGGGGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSSPAP	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	MLVMS_P03355_3mut
GSSPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGSSEAAAK	FLV_P10273_3mutA
SGSETPGTSESATPES	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGGG	AVIRE_P03360_3mutA
GGGEAAAKPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSPAPGGG	MLVAV_P03356_3mutA
PAPGGSGSS	BAEVM_P10272_3mutA
GSSGGSPAP	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGSSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGGGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSSGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_3mut
GGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	XMRV6_A1Z651
GGGGG	FLV_P10273_3mutA
PAPEAAAKGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGG	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGG	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mut
GGSGSS	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKPAP	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKEAAAKEAAAK	FLV_P10273_3mutA

【０６４７】

【表Ｄ１－２４】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGG	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSPAPGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GSSGGGGGS	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSSGGS	MLVAV_P03356_3mutA
GGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGG	WMSV_P03359_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	FLV_P10273_3mutA
PAPGGGGSS	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGGGGG	BAEVM_P10272_3mutA
SGSETPGTSESATPES	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGG	BAEVM_P10272_3mutA
GSSGSSGSS	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGGSEAAAK	WMSV_P03359_3mutA
GGGGGGGG	FLV_P10273_3mutA
GSSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPEAAAKGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKGSSPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSSEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
PAPGGSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGGEAAAK	MLVFF_P26809_3mut
PAPEAAAKGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGPAPGSS	AVIRE_P03360_3mut
PAPGGSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGS	MLVMS_P03355_3mut
GGGGGSGSS	MLVCB_P08361_3mut
GGGPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKPAPGGG	MLVCB_P08361_3mut
GSSGGSPAP	MLVCB_P08361_3mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	MLVMS_P03355_3mut
PAPAPAPAP	MLVMS_P03355_3mut
GSSGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSEAAAKGGG	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSSPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS

【０６４８】

【表Ｄ１－２５】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GSSEAAAKGGS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	BAEVM_P10272_3mut
PAPGGGGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	FFV_O93209_2mut
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGGG	MLVMS_P03355_PLV919
PAPEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGSSEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
GGG	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGG	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGGSGGSGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSEAAAKPAP	FLV_P10273_3mutA
GGGEAAAKPAP	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPAPAPAP	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGG	MLVMS_P03355_PLV919
PAPAPAPAPAPAP	FLV_P10273_3mutA
EAAAKGGSGSS	MLVMS_P03355_3mut
GGGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGG	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGGSGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSGGSGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKPAPGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	XMRV6_A1Z651
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	FLV_P10273_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGPAPGSS	AVIRE_P03360_3mutA
GGGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGSPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGSSPAP	AVIRE_P03360_3mutA
PAPGGSGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSS	WMSV_P03359_3mut
GGGPAPGSS	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKPAP	MLVMS_P03355_3mut

【０６４９】

【表Ｄ１－２６】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GSSPAPEAAAK	FLV_P10273_3mutA
GGSPAPGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGGSEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPEAAAKGGG	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSPAPEAAAK	WMSV_P03359_3mutA
GGSGGGGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGGGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGSPAP	AVIRE_P03360_3mut
GGSGGGGSS	WMSV_P03359_3mutA
PAPGSSEAAAK	MLVFF_P26809_3mut
GSSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GSAGSAAGSGEF	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGGSGSS	MLVMS_P03355_3mut
GGSEAAAKPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGSSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGSSPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPAPAP	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKPAPGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGPAPGSS	BAEVM_P10272_3mutA
PAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGGSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPAPAPAP	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSPAPGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSPAPGGG	MLVMS_P03355_3mut
PAPGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKGSS	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPEAAAKGGG	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGSSGGG	MLVFF_P26809_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	PERV_Q4VFZ2
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGGSGGG	MLVFF_P26809_3mut
GSSGSSGSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSPAPGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GSS	BAEVM_P10272_3mut

【０６５０】

【表Ｄ１－２７】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGPAPGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSGGSGGG	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	FLV_P10273_3mutA
PAPGGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPAPAPAPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGG	MLVCB_P08361_3mut
GGSEAAAKGGG	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGGSGSS	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGSSPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGSGGS	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKPAPGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGPAPEAAAK	FLV_P10273_3mutA
GGSPAPEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGS	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGGSGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPAPAPAP	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKPAP	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGGG	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGSS	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVFF_P26809_3mut
GGGPAPGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGSGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSS	PERV_Q4VFZ2
PAPEAAAKGGS	MLVCB_P08361_3mut
GSS	MLVMS_P03355_3mut
GSAGSAAGSGEF	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGGSGGGGS	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGGPAPGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_PLV919

【０６５１】

【表Ｄ１－２８】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGEAAAKPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKPAPGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSAGSAAGSGEF	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGGGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGGEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
GSS	AVIRE_P03360_3mutA
GSSGSSGSSGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPEAAAKGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGGPAPEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGGGGS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSPAP	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	PERV_Q4VFZ2
GSSPAPEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSPAPEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGGG	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGSSGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGPAPEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
GGGPAPGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGSGGGGS	WMSV_P03359_3mut
GGGPAPEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGSSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPAP	WMSV_P03359_3mutA
GGSPAPGSS	MLVAV_P03356_3mutA
GGSGGGPAP	MLVMS_P03355_3mut
GGSPAP	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSPAPGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSAGSAAGSGEF	MLVMS_P03355_3mut
GGSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut

【０６５２】

【表Ｄ１－２９】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGPAPGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	FOAMV_P14350
PAPGSSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGSEAAAKPAP	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGGS	MLVCB_P08361_3mutA
PAPEAAAKGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
GGSEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
GSSPAPEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGGG	WMSV_P03359_3mut
EAAAKPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSSGSSGSSGSS	WMSV_P03359_3mut
PAPGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGGEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
PAPGGS	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGSGGSGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAKGGG	WMSV_P03359_3mutA
GGGPAP	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSPAPGSS	KORV_Q9TTC1_3mut
GGGPAPGSS	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSSGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGGEAAAKGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSPAPGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGSPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGGGGSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSEAAAKGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPAPAPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSEAAAKPAP	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGS	FLV_P10273_3mutA
EAAAKGGGPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGSSGGG	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGGSGSS	BAEVM_P10272_3mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	MLVCB_P08361_3mutA
GSSEAAAKGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGG	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SFV3L_P27401_2mutA

【０６５３】

【表Ｄ１－３０】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGEAAAKGSS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGSEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGGG	AVIRE_P03360_3mut
GGSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGSSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	KORV_Q9TTC1_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPAPAPAPAP	FLV_P10273_3mutA
GGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGGSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAP	MLVFF_P26809_3mut
GSSPAPEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGGGGSS	MLVMS_P03355_3mut
GGGEAAAKGGS	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSGGGPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSAGSAAGSGEF	BAEVM_P10272_3mutA
GSSEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
PAPGSS	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKEAAAKEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
GSAGSAAGSGEF	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSGSSGSSGSS	BAEVM_P10272_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGGSSEAAAK	WMSV_P03359_3mut
GSSGGGEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKPAP	MLVFF_P26809_3mutA
GGSPAPGGG	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPEAAAK	FLV_P10273_3mutA
GSSGSSGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	FLV_P10273_3mutA
GGSPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSAGSAAGSGEF	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGGSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GGSPAPEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGGSPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGSSPAP	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGGPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA

【０６５４】

【表Ｄ１－３１】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGSGSSGGG	BAEVM_P10272_3mut
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	FFV_O93209-Pro_2mut
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	WMSV_P03359_3mutA
GGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGPAP	FLV_P10273_3mutA
PAPGGSGGG	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKGSSGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGSEAAAK	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPAPAPAPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGGG	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGEAAAKGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGEAAAKGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSPAP	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVFF_P26809_3mut
GGGGGGG	MLVFF_P26809_3mut
PAPAPAPAPAPAP	AVIRE_P03360_3mutA
GSSPAPGGG	FLV_P10273_3mutA
GGGGGSPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	KORV_Q9TTC1_3mut
GSSEAAAKGGS	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAKPAP	MLVMS_P03355_3mut
GSSGGSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGGPAP	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGGSGSS	MLVMS_P03355_PLV919
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	BAEVM_P10272_3mut
PAPEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	FLV_P10273_3mutA
GGSGSSGGG	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSSPAP	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGGSGSS	WMSV_P03359_3mutA

【０６５５】

【表Ｄ１－３２】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPAPAPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGSSEAAAK	MLVFF_P26809_3mut
PAPEAAAKGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGGS	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSPAPEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSPAP	MLVMS_P03355_3mut
GGSEAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGS	FLV_P10273_3mutA
GGGEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SFV3L_P27401_2mut
GGSEAAAKPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGGEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGGSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSSPAP	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	SFV3L_P27401_2mut
GSSGSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGS	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSGGGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGPAPEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGS	MLVFF_P26809_3mut
GSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGSEAAAK	AVIRE_P03360_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGPAPEAAAK	AVIRE_P03360_3mutA
GGGEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
GGG	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKPAPGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA

【０６５６】

【表Ｄ１－３３】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGSGSSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGSS	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSSEAAAK	BAEVM_P10272_3mut
GGSGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGCPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GGSPAPGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGSSGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPAP	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSPAPGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSEAAAKGGG	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSSGSSGSSGSS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGGS	MLVCB_P08361_3mut
GSSGGSEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKPAPGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGS	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGSSGGG	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGGGG	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGSSEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGS	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPAPAPAPAP	WMSV_P03359_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGSGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGGGGSS	BAEVM_P10272_3mutA
GSSEAAAKGGS	MLVCB_P08361_3mut
GSSGGGPAP	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGGSEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
GSSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	MLVFF_P26809_3mut
PAP	FLV_P10273_3mutA
GGGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS

【０６５７】

【表Ｄ１－３４】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSS	FLV_P10273_3mutA
PAPAPAPAPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGGGGSEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPGGSGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGGPAP	WMSV_P03359_3mutA
GGGGSSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGGGGSS	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSPAPGGS	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSS	MLVFF_P26809_3mut
PAPGGGGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAKGGGGSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSPAPEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKPAP	BAEVM_P10272_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGGGSS	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
GSSEAAAKGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	BAEVM_P10272_3mut
PAPEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GSSGGSPAP	PERV_Q4VFZ2
GGGPAPGGS	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKPAPGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGS	PERV_Q4VFZ2
GGGEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAKGGGGS	FLV_P10273_3mutA
GGSPAPGSS	MLVMS_P03355_3mut
GSSPAPEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSAGSAAGSGEF	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKGGGGSS	BAEVM_P10272_3mutA
GGG	WMSV_P03359_3mut
GGSGSSPAP	BAEVM_P10272_3mut

【０６５８】

【表Ｄ１－３５】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGSEAAAKPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	MLVCB_P08361_3mut
PAPGSS	MLVAV_P03356_3mutA
PAPEAAAKGGG	MLVCB_P08361_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	FOAMV_P14350-Pro_2mut
GSSGSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGG	MLVMS_P03355_3mut
PAPGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	WMSV_P03359_3mut
PAP	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGSSPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	AVIRE_P03360
GGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSSGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGSGSSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSPAPEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGSGGGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGGGGS	MLVAV_P03356_3mutA
GSAGSAAGSGEF	WMSV_P03359_3mutA
GGGEAAAKGSS	BAEVM_P10272_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	FFV_O93209-Pro_2mut
PAPGGSGGG	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SFV3L_P27401_2mut
GGSGSSPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSSPAP	MLVFF_P26809_3mut
GGGPAPGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	SFV3L_P27401
PAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGSEAAAK	WMSV_P03359_3mutA
GGSGSSEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2
GGSGGGEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA

【０６５９】

【表Ｄ１－３６】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GSSGGGGGS	WMSV_P03359_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGSS	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGPAP	PERV_Q4VFZ2
GGSEAAAKGGG	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSPAPEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSSGSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGGGGG	MLVMS_P03355_3mut
GSSGGG	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGSEAAAKGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGSSGGG	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGSSEAAAK	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGSGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGGPAPGSS	WMSV_P03359_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	AVIRE_P03360_3mut
GGGEAAAKPAP	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSGGG	MLVFF_P26809_3mutA
GGSPAPGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGS	MLVCB_P08361_3mut
PAPAPAPAP	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSGGS	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGGSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGG	WMSV_P03359_3mut
PAPGGGGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGSPAP	BAEVM_P10272_3mutA
GGG	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGSEAAAKGGG	FLV_P10273_3mutA

【０６６０】

【表Ｄ１－３７】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGSEAAAKPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGSSPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSEAAAKPAP	MLVMS_P03355_3mut
PAPGSSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPEAAAKGGS	AVIRE_P03360_3mut
GGGGSSPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSS	MLVFF_P26809_3mut
GGSPAPGSS	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGSSGGS	FLV_P10273_3mutA
GSS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGSGGSGGS	MLVMS_P03355_3mut
PAPEAAAKGGS	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGSSGGG	BAEVM_P10272_3mutA
GSSEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSAGSAAGSGEF	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGGGSEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
GGGG	WMSV_P03359_3mut
GGGGSSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGG	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGSGGG	MLVAV_P03356_3mutA
GGGPAPGGS	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGSSGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSPAPGGS	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGGSPAP	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGSSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGEAAAKGSS	AVIRE_P03360_3mut
GSSEAAAK	FLV_P10273_3mutA
EAAAK	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGSGSS	WMSV_P03359_3mut
GSSEAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGSSGGG	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKGGGGGS	MLVMS_P03355_3mut

【０６６１】

【表Ｄ１－３８】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGSEAAAKPAP	AVIRE_P03360_3mut
GGGPAPGGS	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGS	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAKPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAKPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGSS	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKPAPGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSPAPEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSEAAAKGGG	AVIRE_P03360_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGGEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGGGPAP	WMSV_P03359_3mut
GSSPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	SFV3L_P27401-Pro
GGSEAAAKGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGSEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSEAAAKGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGGG	AVIRE_P03360_3mutA
GSSGGSEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPGSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
PAPEAAAK	WMSV_P03359_3mut
PAPGGSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGSS	BAEVM_P10272_3mut
PAPGGGGGS	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKPAPGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSPAPGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGGGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSPAPGSS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPAPAPAPAP	MLVCB_P08361_3mut
GGSGSSPAP	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSGGGEAAAK	WMSV_P03359_3mutA

【０６６２】

【表Ｄ１－３９】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GSSGGSEAAAK	FLV_P10273_3mutA
GGGGGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGSEAAAK	FLV_P10273_3mutA
GGGGSSPAP	BAEVM_P10272_3mutA
PAPAPAPAP	WMSV_P03359_3mut
GGSEAAAKPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGSGGG	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGGPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGPAPEAAAK	MLVFF_P26809_3mut
GGGGGSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSS	MLVCB_P08361_3mut
GGGGGSPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GGSPAP	MLVAV_P03356_3mutA
GGGPAPGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGSSGGG	FLV_P10273_3mutA
PAPGSSGGG	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGEAAAKGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSEAAAKGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGGSEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
GGSEAAAKGGG	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGGGGSS	WMSV_P03359_3mut
GGGEAAAKPAP	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPEAAAKGSS	MLVFF_P26809_3mut
GSAGSAAGSGEF	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGGGS	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGSSPAP	WMSV_P03359_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSEAAAKPAP	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGS	BAEVM_P10272_3mut
PAP	AVIRE_P03360_3mut
PAPAPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSGGGGSS	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSSGGS	AVIRE_P03360_3mutA

【０６６３】

【表Ｄ１－４０】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GSSPAPGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSEAAAKPAP	MLVMS_P03355_PLV919
PAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGGGPAP	FLV_P10273_3mutA
GSSEAAAKGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
GGSEAAAKPAP	MLVCB_P08361_3mut
PAPAPAPAPAP	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKPAPGSS	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSSGSSGSSGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPEAAAKGSS	MLVAV_P03356_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	AVIRE_P03360_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGGGSS	MLVFF_P26809_3mutA
PAPEAAAKGSS	MLVCB_P08361_3mut
GGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGGEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGGGSS	WMSV_P03359_3mut
GSSPAPGGG	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGSSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGGEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKPAPGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSPAP	MLVFF_P26809_3mut
GGGEAAAKPAP	AVIRE_P03360_3mut
GSSGGSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKPAPGGS	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGG	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGSSPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GSSPAPEAAAK	MLVFF_P26809_3mut
GGSGGGEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGSSGSS	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGS	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKPAPGGS	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKPAPGGS	BAEVM_P10272_3mutA

【０６６４】

【表Ｄ１－４１】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GSSGGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGGGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSSGSS	WMSV_P03359_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	WMSV_P03359_3mut
GGS	AVIRE_P03360_3mut
EAAAKPAPGSS	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGGG	KORV_Q9TTC1_3mut
PAPGSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
PAPGSSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GSSPAPEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	WMSV_P03359_3mutA
GGGGS	BAEVM_P10272_3mut
GSSPAP	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGGGSEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKEAAAK	WMSV_P03359_3mutA
GGGGSSGGS	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGSEAAAK	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGGSPAP	MLVFF_P26809_3mut
GSSGGSGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPAP	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGSSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKPAPGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKGGGGSS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKPAPGSS	BAEVM_P10272_3mutA
GGSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGS	BAEVM_P10272_3mutA
PAPEAAAKGSS	KORV_Q9TTC1_3mut
PAPGSS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPAPAPAPAP	MLVAV_P03356_3mutA
GGG	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSPAPEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAP	BAEVM_P10272_3mutA
GGSPAP	BAEVM_P10272_3mutA
PAPEAAAKGGS	MLVMS_P03355_PLV919

【０６６５】

【表Ｄ１－４２】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPGSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPAPAPAPAPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGSGGSGGSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKPAPGGS	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGGG	KORV_Q9TTC1_3mut
GGSGGGEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPEAAAKGGG	AVIRE_P03360
PAPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGSSGGG	MLVAV_P03356_3mutA
GGSPAPGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPEAAAK	MLVAV_P03356_3mut
EAAAKGGSPAP	BAEVM_P10272_3mutA
PAPAPAPAP	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGSGGSGGS	WMSV_P03359_3mut
GGGGGSGSS	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPGGSGGG	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGS	MLVMS_P03355_3mut
EAAAK	WMSV_P03359_3mut
GGGEAAAKGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSPAPGSS	MLVCB_P08361_3mut
GGSEAAAKPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGSS	BAEVM_P10272_3mutA
GGGEAAAKGSS	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGSPAP	WMSV_P03359_3mut
GSSPAPEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGSGGSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GSSPAPEAAAK	WMSV_P03359_3mut
GSSGSSGSSGSS	PERV_Q4VFZ2
GGSGSSEAAAK	WMSV_P03359_3mutA
GGSGGG	MLVFF_P26809_3mut
GGSPAPGGG	MLVFF_P26809_3mut
GGSGGSGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mut

【０６６６】

【表Ｄ１－４３】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGSPAPGSS	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKPAPGSS	AVIRE_P03360_3mut
GGGGSSGGS	FLV_P10273_3mutA
GGSPAPEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAKGSS	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGSSGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGGS	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGGGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGSSPAP	MLVCB_P08361_3mut
PAPGSSGGG	KORV_Q9TTC1
PAPGGSGGG	MLVMS_P03355_3mut
GGGG	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGSPAP	MLVCB_P08361_3mut
GSSGSS	FLV_P10273_3mutA
GGSEAAAKPAP	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKGSSGGS	MLVAV_P03356_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGGSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGG	MLVCB_P08361_3mut
GGGEAAAK	BAEVM_P10272_3mut
GGSGGSGGSGGS	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2
PAPAPAPAPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSGGSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGSEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGGGPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGGSGSS	PERV_Q4VFZ2
SGSETPGTSESATPES	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGS	FLV_P10273_3mut
GGSPAPGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	FFV_O93209_2mut
GSSGGSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGSSEAAAK	WMSV_P03359_3mut

【０６６７】

【表Ｄ１－４４】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPAPAPAPAP	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGGSS	BAEVM_P10272_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	AVIRE_P03360_3mut
GSSPAPEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPEAAAKGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKEAAAK	WMSV_P03359_3mut
EAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSGGSGGG	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGEAAAKPAP	WMSV_P03359_3mutA
GGSGGS	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	FOAMV_P14350_2mutA
GGGGG	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGGSEAAAK	BAEVM_P10272_3mut
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	SFV1_P23074
GGSGGGPAP	MLVCB_P08361_3mut
GGSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
SGSETPGTSESATPES	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGGSPAP	MLVMS_P03355_3mut
PAPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGGGS	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKEAAAK	AVIRE_P03360_3mut
GSSGGSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAK	WMSV_P03359_3mut
GSSGGGEAAAK	AVIRE_P03360_3mutA
GGG	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	BAEVM_P10272_3mut
GGGG	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGGGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSPAPGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSPAPEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGS	WMSV_P03359_3mut
GGSGGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSSEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPAPAPAPAP	MLVAV_P03356_3mut
EAAAKGSSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	FFV_O93209_2mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut

【０６６８】

【表Ｄ１－４５】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGSPAPGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGEAAAKGGS	MLVMS_P03355_3mut
GGGEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPEAAAKGGG	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	BAEVM_P10272_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	GALV_P21414_3mutA
EAAAKGGSPAP	FFV_O93209-Pro
EAAAKEAAAK	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGS	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SFV3L_P27401_2mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	BAEVM_P10272_3mut
GGGGS	MLVMS_P03355_PLV919
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	SFV1_P23074
GGGGSGGGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSPAPGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGGSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSPAPEAAAK	FOAMV_P14350_2mutA
GGGPAPGGS	SFV3L_P27401_2mut
PAPGSSGGG	MLVCB_P08361_3mut
GSSGGGEAAAK	AVIRE_P03360_3mut
GSSGGG	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGGG	MLVAV_P03356_3mutA
PAPGGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
PAPGGG	FLV_P10273_3mutA
GGGGSGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGS	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKGGSGSS	FLV_P10273_3mutA
GSSEAAAKGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGSSEAAAK	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGSGGGGS	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
PAPGSSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGSSEAAAK	PERV_Q4VFZ2
GGSPAPGGG	AVIRE_P03360_3mut

【０６６９】

【表Ｄ１－４６】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPAPAPAP	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGGS	WMSV_P03359_3mutA
GGGPAPGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGSGGSGGSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAK	SFV3L_P27401_2mut
PAPGSS	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSEAAAK	MLVFF_P26809_3mut
GGSPAPGGG	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGG	WMSV_P03359_3mutA
GSSEAAAKGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGSPAP	FFV_O93209
GGGGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GSSGGG	MLVCB_P08361_3mut
GSSGSS	MLVCB_P08361_3mutA
GGSEAAAKPAP	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGGGGSS	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKPAPGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GSS	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
PAPAP	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKPAP	BAEVM_P10272
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGS	MLVMS_P03355_3mut
GSSGGG	FLV_P10273_3mutA
PAPAPAPAPAP	FLV_P10273_3mut
EAAAKEAAAKEAAAK	WMSV_P03359_3mutA
GSSGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKPAPGGG	MLVMS_P03355_3mut
GSSPAPGGS	WMSV_P03359_3mut
PAPGSSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGG	AVIRE_P03360_3mutA
PAPGGSGSS	MLVFF_P26809_3mut
PAPGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGSGSS	WMSV_P03359_3mutA

【０６７０】

【表Ｄ１－４７】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKGGGGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGGGG	BAEVM_P10272_3mut
PAPEAAAKGSS	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGGEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGGS	MLVCB_P08361_3mut
PAPGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGG	FLV_P10273_3mutA
EAAAKGGSGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGSSGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGGGG	WMSV_P03359_3mut
GGSGSSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAKGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKPAPGSS	MLVCB_P08361_3mut
GGSPAPGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPGSSGGG	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKPAPGSS	WMSV_P03359_3mut
GGSPAPEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSPAP	FLV_P10273_3mutA
GSS	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKPAPGGS	FLV_P10273_3mutA
GGSGSSPAP	FLV_P10273_3mutA
PAPGSSGGS	MLVMS_P03355_3mut
GSAGSAAGSGEF	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGSEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGGSEAAAK	SFV3L_P27401_2mut
GSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSPAPEAAAK	FLV_P10273_3mut
GGSEAAAKGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSPAPEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGSSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGG	AVIRE_P03360_3mutA
GGSEAAAKPAP	WMSV_P03359_3mut
GSSGGSPAP	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
PAPEAAAKGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	MLVMS_P03355_PLV919

【０６７１】

【表Ｄ１－４８】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GSSEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGG	AVIRE_P03360
GGSEAAAKGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSEAAAKGSS	MLVMS_P03355_3mut
GGSPAPEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGGEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
GGSEAAAKPAP	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGEAAAKGGS	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGGGGSEAAAK	FLV_P10273_3mutA
GGSPAP	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSSGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAP	MLVCB_P08361_3mut
GGS	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_3mut
GGGEAAAKGGS	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSS	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGSGGG	FLV_P10273_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGS	FLV_P10273_3mut
GGSGSSGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGGSGGS	GALV_P21414_3mutA
GGGEAAAKGGS	WMSV_P03359_3mut
SGSETPGTSESATPES	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGGGGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAKGSSPAP	BAEVM_P10272_3mut
GGGG	MLVCB_P08361_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSSGGSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGSS	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGGS	AVIRE_P03360_3mutA
GSSEAAAKGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKPAPGGG	WMSV_P03359_3mut
PAPGSSGGG	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGSSEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSEAAAKPAP	BAEVM_P10272_3mutA
PAPGGGEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGGEAAAK	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	FFV_O93209

【０６７２】

【表Ｄ１－４９】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKGGGGS	GALV_P21414_3mutA
GGSPAPGGG	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSSGSS	FLV_P10273_3mutA
EAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGGSSGGS	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	BAEVM_P10272_3mut
GGGPAPGSS	MLVMS_P03355_3mut
GSSPAPGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPAP	FLV_P10273_3mutA
PAPAPAPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGSEAAAK	GALV_P21414_3mutA
GGGGGSGSS	BAEVM_P10272_3mutA
GGGEAAAKGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGGGSPAP	AVIRE_P03360_3mut
GGGGGSEAAAK	SFV3L_P27401_2mutA
GGS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
SGSETPGTSESATPES	SFV3L_P27401_2mutA
EAAAKGGSGGG	MLVMS_P03355_3mut
GGGGS	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGSSGGG	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKPAPGGS	MLVF5_P26810_3mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	SFV3L_P27401_2mutA
GGSPAPGGG	WMSV_P03359_3mutA
GSAGSAAGSGEF	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSSGGS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGGG	MLVCB_P08361_3mut
GSSEAAAK	WMSV_P03359_3mut
PAPGSS	FLV_P10273_3mutA
GSSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGG	MLVFF_P26809_3mut
GGGGGSPAP	MLVMS_P03355_3mut
GGSEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGSGGSGGS	MLVMS_P03355_3mut
PAPAP	AVIRE_P03360_3mut
GGSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGG	BAEVM_P10272_3mutA

【０６７３】

【表Ｄ１－５０】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKGGGGSS	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	GALV_P21414_3mutA
PAPGGGEAAAK	KORV_Q9TTC1
EAAAKGGSPAP	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGSPAPEAAAK	FLV_P10273_3mutA
GGGGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SFV1_P23074_2mutA
EAAAKGSSGGS	MLVMS_P03355_3mut
GSSEAAAKPAP	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSS	FLV_P10273_3mutA
EAAAKGGSGGG	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSPAP	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPEAAAKGGS	FLV_P10273_3mutA
GSSGGSEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGGSGGG	MLVMS_P03355
GGSGGGPAP	MLVMS_P03355_3mut
GGS	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSEAAAKPAP	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSSGSS	WMSV_P03359_3mut
GGSGSSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSPAPGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSEAAAKGGG	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKPAPGGS	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGGEAAAK	PERV_Q4VFZ2
GGSGSS	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGGEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	FLV_P10273_3mut
PAPEAAAKGSS	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGSSGGS	WMSV_P03359_3mutA
GGSGSSEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
GGSGSSEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSGGSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGSGGG	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSGGS	AVIRE_P03360_3mutA
GSAGSAAGSGEF	MLVMS_P03355_PLV919

【０６７４】

【表Ｄ１－５１】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGSGSS	GALV_P21414_3mutA
GGGG	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	WMSV_P03359_3mut
SGSETPGTSESATPES	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	FOAMV_P14350_2mutA
GGGEAAAKGGS	FLV_P10273_3mutA
GSSGGSEAAAK	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGGGGSS	MLVAV_P03356_3mut
PAPGGSEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAK	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGG	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSS	WMSV_P03359_3mutA
GSSGGSPAP	AVIRE_P03360_3mut
GGSGGSGGS	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGGGPAP	FLV_P10273_3mutA
GGGGSGGGGS	MLVCB_P08361_3mut
GGSEAAAKGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SFV3L_P27401_2mutA
GGSGSSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSEAAAKGGS	FLV_P10273_3mutA
GGSGSS	PERV_Q4VFZ2
GGSGSSEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSGSSGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGSSPAP	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKPAP	FLV_P10273_3mutA
GGSGSSEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGGGGG	FLV_P10273_3mut
EAAAKGSS	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGGPAP	MLVCB_P08361_3mut
GSSGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGGGGGS	MLVFF_P26809_3mut
GGSGGGEAAAK	FLV_P10273_3mutA
PAPGSS	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGSS	BAEVM_P10272_3mutA
GGSPAPGSS	AVIRE_P03360_3mut
GGGGSSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut

【０６７５】

【表Ｄ１－５２】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GSSGGGGGS	FFV_O93209-Pro
EAAAKGSSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSPAPGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGG	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGGGGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGSEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSS	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGSSGGG	MLVMS_P03355_PLV919
GGSEAAAKPAP	AVIRE_P03360_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	WMSV_P03359_3mutA
GGGEAAAKPAP	FLV_P10273_3mutA
PAPGSSGGG	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSGSS	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPEAAAK	BAEVM_P10272_3mut
GGGPAPGSS	PERV_Q4VFZ2
GSSGGSPAP	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSS	SFV3L_P27401_2mut
PAPEAAAKGSS	SFV3L_P27401_2mut
GGSGGGPAP	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGGS	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKGGGGGS	AVIRE_P03360_3mut
GSSGGSPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGGGGS	WMSV_P03359_3mut
GGGEAAAKGGS	AVIRE_P03360_3mut
GGGEAAAKGSS	BAEVM_P10272_3mut
PAPEAAAKGSS	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	MLVCB_P08361_3mut
GGSPAPGSS	FLV_P10273_3mutA
EAAAKGSSPAP	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2
GGGGSSEAAAK	FLV_P10273_3mutA
GGGGSSPAP	FFV_O93209
GSSGGSPAP	MLVMS_P03355_3mut
GGGPAPGSS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGSPAP	MLVFF_P26809_3mut
SGSETPGTSESATPES	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSPAPGGG	WMSV_P03359_3mut

【０６７６】

【表Ｄ１－５３】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPAPAPAPAP	SFV3L_P27401_2mutA
GGGPAPGGS	MLVMS_P03355_3mut
PAPGGSEAAAK	WMSV_P03359_3mut
GGGGSSEAAAK	FFV_O93209-Pro
GGSPAPGGG	FLV_P10273_3mutA
GSSPAPEAAAK	AVIRE_P03360_3mut
GGGEAAAK	FLV_P10273_3mutA
PAPEAAAKGGG	MLVCB_P08361_3mut
GGSPAPGGG	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGGGSS	BAEVM_P10272_3mutA
GSSPAPEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
GGSPAPGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGGSGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
SGSETPGTSESATPES	MLVMS_P03355
GSSGSSGSS	MLVAV_P03356_3mutA
PAPGSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPEAAAKGGG	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSGGSGGS	BAEVM_P10272_3mut
PAPGGS	MLVFF_P26809_3mut
GSSGGSPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGGGGS	FLV_P10273_3mutA
GGGGGSPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAKPAPGSS	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKGGSPAP	KORV_Q9TTC1-Pro
GGGPAPEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GGSEAAAKGSS	MLVMS_P03355
PAPEAAAKGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPEAAAKGGS	WMSV_P03359_3mutA
GSSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGGGSS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGSPAP	AVIRE_P03360_3mutA
GGGGSSGGS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPEAAAKGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGGGGS	BAEVM_P10272_3mut
GSSGGGGGS	MLVMS_P03355_3mut
PAPAPAPAP	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGGSGGSGGS	MLVAV_P03356_3mut
PAPAPAPAP	SFV3L_P27401_2mut

【０６７７】

【表Ｄ１－５４】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GSSEAAAKPAP	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGGEAAAK	SFV3L_P27401_2mutA
GSSGGSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGSPAP	MLVCB_P08361_3mutA
GGGEAAAKGSS	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSSPAP	BAEVM_P10272_3mut
GGSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGGGGS	PERV_Q4VFZ2
EAAAKGSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAK	MLVAV_P03356_3mut
GSSGGGEAAAK	MLVAV_P03356_3mut
GSSPAPGGG	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGGSGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPEAAAK	BLVJ_P03361
GSSGGG	FFV_O93209-Pro
GGSGGGEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAK	FLV_P10273_3mutA
GGGGSSPAP	MLVMS_P03355_3mut
GSS	SFV3L_P27401-Pro_2mut
PAPEAAAKGSS	BAEVM_P10272_3mut
GGGGGSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSSGSS	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SFV1_P23074_2mut
GGGGSSEAAAK	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	FOAMV_P14350-Pro_2mut
PAPGSSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGGSGSS	MLVFF_P26809_3mutA
GGSEAAAKGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPGSSGGG	PERV_Q4VFZ2
GGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	FLV_P10273_3mut
GGGEAAAK	WMSV_P03359_3mutA
GGSEAAAKPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mut
SGSETPGTSESATPES	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
EAAAKPAPGGS	AVIRE_P03360_3mut
EAAAKGGGGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA

【０６７８】

【表Ｄ１－５５】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAKGSS	MLVFF_P26809_3mutA
GGSEAAAKGGG	AVIRE_P03360
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	SFV3L_P27401_2mut
GGSEAAAKGSS	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGEAAAKPAP	MLVCB_P08361_3mut
GGSEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GGSPAPGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSPAPEAAAK	WMSV_P03359_3mutA
GGSGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGGGGGS	AVIRE_P03360_3mut
PAPEAAAKGSS	FFV_O93209-Pro
GGSGGGEAAAK	WMSV_P03359_3mut
PAPGGG	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGG	FLV_P10273_3mutA
GSSGSSGSSGSS	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGGSGGG	FFV_O93209
GSSPAPGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSPAPGGS	MLVCB_P08361_3mut
GGGPAP	WMSV_P03359_3mutA
GGGPAP	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSPAPGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPAP	MLVMS_P03355_3mut
GGGGGGG	MLVMS_P03355_3mut
GGGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GSAGSAAGSGEF	FOAMV_P14350_2mutA
PAPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSEAAAKGGG	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
PAPAP	WMSV_P03359_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	SFV3L_P27401_2mut
PAPGGS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGEAAAKPAP	FLV_P10273_3mut
GGGGGS	MLVAV_P03356_3mutA
GSSEAAAKGGG	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGGGSS	GALV_P21414_3mutA
GSSGGS	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPAPAP	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGG	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKPAPGGS	MLVFF_P26809_3mut

【０６７９】

【表Ｄ１－５６】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGGSGGGGS	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKGGG	MLVCB_P08361_3mut
GGGGSSPAP	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSEAAAKGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGGG	BLVJ_P03361_2mutB
GGGEAAAKGSS	FFV_O93209-Pro
GSSGSSGSS	BAEVM_P10272_3mut
GSSGGSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGS	KORV_Q9TTC1_3mut
GGSPAPEAAAK	AVIRE_P03360_3mut
GGSEAAAK	WMSV_P03359_3mut
GSSGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGPAPEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPGSS	WMSV_P03359_3mutA
GGSEAAAKGSS	FLV_P10273_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SFV3L_P27401
GSSEAAAKGGG	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGGSGGS	WMSV_P03359_3mut
GGGGGSGSS	KORV_Q9TTC1-Pro
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2
GGSEAAAKGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GSSGGSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSAGSAAGSGEF	PERV_Q4VFZ2
PAPEAAAKGSS	BAEVM_P10272_3mutA
GSSPAPGGG	MLVCB_P08361_3mut
GGGGSSPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGGSGGG	MLVFF_P26809_3mut
GSSPAP	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPGSS	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGSGGGGSS	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGS	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGGGS	PERV_Q4VFZ2
GGGGG	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGSS	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	FLV_P10273_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GSAGSAAGSGEF	SFV3L_P27401_2mutA

【０６８０】

【表Ｄ１－５７】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGPAPGGS	FLV_P10273_3mutA
GGSEAAAKGGG	MLVCB_P08361_3mut
PAPGGGEAAAK	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKPAPGSS	FOAMV_P14350_2mut
GGSEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGSS	AVIRE_P03360
GGSPAPEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGS	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSPAPGGG	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKPAPGGS	PERV_Q4VFZ2
GSSPAP	BAEVM_P10272_3mut
GGSGSSGGG	FLV_P10273_3mutA
PAPGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGGPAPGGS	MLVFF_P26809_3mut
GSAGSAAGSGEF	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKPAPGGS	SFVCP_Q87040
PAPGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSPAPEAAAK	MLVBM_Q7SVK7
PAPEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPGGGGGS	AVIRE_P03360_3mutA
GGSEAAAKPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKGSS	WMSV_P03359_3mutA
GGGEAAAK	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
PAPEAAAKGGG	BAEVM_P10272_3mut
PAPAPAP	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKPAPGGS	BAEVM_P10272_3mut
GGGGSGGGGS	FLV_P10273_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	KORV_Q9TTC1_3mut
EAAAK	FLV_P10273_3mut
PAPAPAP	WMSV_P03359_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	FFV_O93209-Pro
GGSPAPEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSSGGG	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSPAPGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKGGGPAP	BAEVM_P10272_3mutA
GSSGGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS

【０６８１】

【表Ｄ１－５８】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
SGSETPGTSESATPES	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGSSGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSPAPGGG	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSGGGEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGGGGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	MLVCB_P08361_3mut
GSSEAAAKGGG	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGGGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGSSPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSPAP	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSSEAAAK	AVIRE_P03360
GGS	WMSV_P03359_3mut
EAAAKEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPAPAPAP	MLVAV_P03356_3mut
GGSEAAAKGGG	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPGGG	MLVAV_P03356_3mut
EAAAKGSS	BAEVM_P10272_3mut
GGGGSGGGGS	WMSV_P03359_3mutA
GGSGGSGGS	SFV3L_P27401_2mut
EAAAK	MLVCB_P08361_3mut
GGGGSSGGS	WMSV_P03359_3mutA
GGGPAPEAAAK	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	FFV_O93209
GSSEAAAKGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGPAPGGS	FLV_P10273_3mut
GGSEAAAKGGG	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGGGGS	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGSGGG	FLV_P10273_3mutA
GGSEAAAKGGG	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGS	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSS	MLVAV_P03356_3mutA
GGSPAPGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGGGGS	MLVF5_P26810_3mut
PAPAPAPAP	MLVCB_P08361_3mut
PAPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGSSGGS	KORV_Q9TTC1_3mut
PAPGSSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAK	MLVMS_P03355_PLV919

【０６８２】

【表Ｄ１－５９】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGSGGSGGSGGSGGS	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSGGG	FLV_P10273_3mut
PAPEAAAKGGG	MLVFF_P26809_3mut
PAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGSGSS	FFV_O93209_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	FFV_O93209-Pro_2mut
GSSGSSGSSGSS	FFV_O93209-Pro
GSSGSSGSSGSSGSS	FLV_P10273_3mutA
GGGEAAAKPAP	PERV_Q4VFZ2
PAPGSSGGG	SFV3L_P27401_2mut
PAPGGSGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPAPAPAPAP	GALV_P21414_3mutA
GGSGGGEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSPAP	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKPAP	MLVF5_P26810_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSGGG	WMSV_P03359_3mut
GGSGGSGGS	KORV_Q9TTC1_3mut
GGGGGGGG	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSS	MLVAV_P03356_3mut
GSSGGGGGS	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	GALV_P21414_3mutA
GSSGSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSPAPGGS	MLVFF_P26809_3mut
PAPAPAP	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	WMSV_P03359_3mutA
PAPAPAPAP	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGSS	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	SFV3L_P27401_2mutA
PAPGGS	WMSV_P03359_3mutA
GSSEAAAKGGG	PERV_Q4VFZ2
GSSGGSPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	SFV3L_P27401_2mutA
GGSGSSGGG	MLVCB_P08361_3mut
GGGPAPGSS	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSEAAAKGGS	WMSV_P03359_3mut
GSSEAAAKGGG	MLVAV_P03356_3mut
GGSGGGPAP	FFV_O93209-Pro
GSSGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGGGGS	GALV_P21414_3mutA

【０６８３】

【表Ｄ１－６０】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKPAPGGS	MLVAV_P03356_3mut
GSSGSS	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKPAPGGS	FFV_O93209-Pro
GGGPAPEAAAK	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSEAAAKGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGEAAAKGGS	BAEVM_P10272_3mut
GSSGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	SFV1_P23074
PAPGSSGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPAPAPAPAP	MLVMS_P03355
GSSEAAAK	SFV3L_P27401_2mut
PAP	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAKGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSGGGPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGSS	MLVMS_P03355_3mut
GGSEAAAK	MLVMS_P03355
GSSEAAAKGGS	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGGGGS	MLVFF_P26809_3mut
GSSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGG	BAEVM_P10272_3mut
PAPGSSGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSEAAAK	SFV3L_P27401_2mut
GSSPAPEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GSSGGSPAP	BAEVM_P10272_3mut
GGSPAPGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2
GGSGGGPAP	FLV_P10273_3mut
GGGPAPEAAAK	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGS	FLV_P10273_3mutA
GSSGGSGGG	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKGGGGSS	PERV_Q4VFZ2
GGSGSSGGG	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSGGSGGS	MLVFF_P26809_3mut
GGGPAPEAAAK	FLV_P10273_3mut
GSSGGGEAAAK	MLVMS_P03355_3mut
GGG	SFV3L_P27401_2mut
GSAGSAAGSGEF	WMSV_P03359_3mut
GSSGGGPAP	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut

【０６８４】

【表Ｄ１－６１】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGGSSEAAAK	KORV_Q9TTC1
PAPGGSGGG	SFV3L_P27401_2mut
GSSGSSGSSGSSGSS	FFV_O93209
GSSGGSPAP	MLVMS_P03355_3mut
GGSEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGGSGGGGS	BAEVM_P10272_3mut
GSSEAAAKGGG	AVIRE_P03360_3mut
EAAAKPAPGGG	FLV_P10273_3mut
EAAAKGGSPAP	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSEAAAKPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGPAPGGS	MLVCB_P08361_3mut
GGG	SFV3L_P27401_2mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	SFV3L_P27401_2mutA
GGSGSSGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSAGSAAGSGEF	BAEVM_P10272_3mut
GGGEAAAK	FOAMV_P14350_2mutA
PAPEAAAKGGS	WMSV_P03359_3mut
PAPAPAPAPAP	MLVF5_P26810_3mutA
GGSGGGGSS	FLV_P10273_3mutA
PAPGSSGGS	BAEVM_P10272_3mut
PAPEAAAK	WMSV_P03359_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	FFV_O93209-Pro_2mut
GGGGGSGSS	FFV_O93209-Pro
GGGGGGGG	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGGGG	FLV_P10273_3mut
GSSGGSGGG	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGSS	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSGGGPAP	FOAMV_P14350_2mut
GSSGSS	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKEAAAK	BAEVM_P10272_3mut
GSSPAPEAAAK	GALV_P21414_3mutA
GGSEAAAKPAP	SFV3L_P27401_2mutA
GGSGGGEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKGSSPAP	FOAMV_P14350_2mut
GGSGSSEAAAK	SFV3L_P27401_2mut
GGG	PERV_Q4VFZ2
GGGGGSGSS	FOAMV_P14350_2mut
GGSGGGEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GSSGGSGGG	AVIRE_P03360_3mutA

【０６８５】

【表Ｄ１－６２】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKPAPGGG	SFV3L_P27401_2mutA
PAPGGSGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPAPAP	WMSV_P03359_3mutA
GSSEAAAKPAP	SFV1_P23074
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	SRV2_P51517
GSSGGSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	FFV_O93209
GSSGGGPAP	WMSV_P03359_3mut
PAPAPAPAPAPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGGGSPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPEAAAKGGS	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGGGSSPAP	MLVMS_P03355_3mut
GGSEAAAK	FFV_O93209-Pro
EAAAKPAPGGS	AVIRE_P03360_3mutA
PAPGSS	WMSV_P03359_3mut
PAPGSSGGG	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	SFV3L_P27401_2mut
GGS	MLVRD_P11227_3mut
GGGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGSGGGGSS	KORV_Q9TTC1
GGSGGG	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGEAAAKPAP	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	FLV_P10273
PAPGGSGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	HTL1L_P0C211
GGGEAAAKPAP	WMSV_P03359
GSSGGSPAP	FFV_O93209-Pro
PAPAPAPAPAP	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSGGSEAAAK	SFV3L_P27401_2mutA
GGSPAPGSS	SFV3L_P27401_2mut
GGSGGSGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPEAAAKGSS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAKGGS	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGGGSSPAP	FFV_O93209-Pro
EAAAK	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKGGGGSS	BAEVM_P10272_3mut
GGGGGSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGG	PERV_Q4VFZ2

【０６８６】

【表Ｄ１－６３】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGGGSEAAAK	FLV_P10273_3mut
EAAAKGGGPAP	KORV_Q9TTC1-Pro
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	FFV_O93209_2mutA
GSSGGSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	GALV_P21414_3mutA
GGSGGGEAAAK	AVIRE_P03360_3mutA
PAPEAAAKGGG	SFV3L_P27401_2mut
GGGGSGGGGS	AVIRE_P03360
GSSGGGEAAAK	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGG	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGSS	KORV_Q9TTC1_3mut
PAPAPAPAPAP	FOAMV_P14350_2mut
GGSEAAAKPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGGGEAAAK	MLVBM_Q7SVK7
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	MLVAV_P03356
GGSPAPGSS	BAEVM_P10272_3mut
GGGGSSPAP	BAEVM_P10272
GGGGSEAAAKGGGGS	SFV3L_P27401_2mut
GGGGGGGG	GALV_P21414_3mutA
PAPAP	MLVAV_P03356_3mut
GGGEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSPAPGGG	FFV_O93209_2mut
GGSGGSGGSGGSGGS	BAEVM_P10272
GGGGGS	MLVF5_P26810_3mutA
PAPGGGGSS	FLV_P10273_3mutA
GGGEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPEAAAKGGG	WMSV_P03359_3mut
GSSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKEAAAK	AVIRE_P03360
EAAAKGGGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGEAAAKGGS	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
PAPAPAPAPAP	MLVF5_P26810_3mut
PAPGSSEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	BAEVM_P10272_3mutA
GGSPAPGSS	MLVMS_P03355
PAPGSSGGS	FLV_P10273_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	FOAMV_P14350-Pro_2mut
EAAAKGGG	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGGSGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mut

【０６８７】

【表Ｄ１－６４】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGGSGGG	WMSV_P03359_3mut
GGGPAPGGS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSS	FFV_O93209
GGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGS	GALV_P21414_3mutA
GGGG	MLVF5_P26810_3mut
GGSEAAAKPAP	FFV_O93209-Pro_2mut
PAPAPAPAP	FFV_O93209-Pro
PAP	MLVF5_P26810_3mut
EAAAKEAAAKEAAAK	FFV_O93209_2mut
EAAAKGSS	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPEAAAKGGG	FFV_O93209_2mut
GSSGGGEAAAK	SFV1_P23074-Pro_2mut
PAPGGGEAAAK	GALV_P21414_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
GSSGGG	FOAMV_P14350_2mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SFV3L_P27401_2mutA
GGSGSS	AVIRE_P03360_3mut
GGSGSSEAAAK	MMTVB_P03365_WS
PAPAPAP	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGGSPAP	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGSPAP	AVIRE_P03360
GGSGGGPAP	FFV_O93209
GSSEAAAK	PERV_Q4VFZ2
GSSGGGPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGSSEAAAK	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSEAAAKPAP	SFVCP_Q87040
GGSGGGPAP	FOAMV_P14350_2mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	BLVJ_P03361_2mutB
GGGGSSPAP	SFV3L_P27401_2mutA
EAAAKGGS	MLVF5_P26810_3mut
GGSEAAAKGSS	MLVCB_P08361_3mut
GGGGSSEAAAK	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKGGSGGG	FOAMV_P14350_2mut
GGSGGS	FLV_P10273_3mut
EAAAKGGG	FFV_O93209-Pro
GSSGSSGSSGSSGSS	SFV3L_P27401
GSSGGGPAP	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS

【０６８８】

【表Ｄ１－６５】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPGGSEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSPAP	KORV_Q9TTC1
EAAAKPAPGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
SGSETPGTSESATPES	SFV1_P23074
GSSPAP	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSPAPGGG	SFV3L_P27401_2mut
GGGEAAAKGSS	SFV1_P23074_2mut
GGGPAPGGS	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGGG	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGG	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGSPAPEAAAK	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGSSPAP	FFV_O93209
EAAAKGGGGSEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	SFV1_P23074_2mut
EAAAKGGSPAP	FOAMV_P14350_2mut
GGSGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGSSGGS	GALV_P21414
GSSGGGPAP	MLVAV_P03356
PAPEAAAKGGS	FOAMV_P14350_2mut
EAAAKPAPGGG	AVIRE_P03360_3mut
GGSPAP	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGSGGGGS	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGSS	AVIRE_P03360_3mutA
GGSPAPGGG	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKPAPGSS	SFV3L_P27401
EAAAKPAP	FOAMV_P14350-Pro_2mut
PAPEAAAKGSS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	SFV3L_P27401_2mutA
GGGEAAAKGSS	GALV_P21414_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGSGSS	FFV_O93209-Pro_2mutA
GGSEAAAKPAP	GALV_P21414_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGS	FFV_O93209-Pro
GSSGGSEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGS	GALV_P21414_3mutA
PAPGGSEAAAK	MLVMS_P03355
PAPEAAAKGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGSSPAP	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSPAP	WMSV_P03359_3mut
GGGEAAAK	MMTVB_P03365

【０６８９】

【表Ｄ１－６６】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGGSS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSPAPGSS	SFV3L_P27401-Pro_2mut
PAPGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKGSSPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGGSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPAPAPAPAPAP	SFV1_P23074
GGSEAAAKGGG	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGSGGS	SFV1_P23074_2mut
GSSGGGGGS	MLVF5_P26810_3mutA
EAAAKGGGPAP	SFV3L_P27401
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
GGGPAPGSS	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MMTVB_P03365_WS
PAPGSSGGS	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGSSEAAAK	FOAMV_P14350-Pro_2mut
GSSPAPEAAAK	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGGGGSEAAAK	FFV_O93209-Pro
GGSPAP	PERV_Q4VFZ2
GGSGSSEAAAK	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSEAAAKGGG	GALV_P21414_3mutA
PAPGGGGSS	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGGSGGSGGS	PERV_Q4VFZ2
GGGGSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	BAEVM_P10272_3mutA
GGGPAP	MLVAV_P03356_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	FFV_O93209_2mut
GSSEAAAK	FFV_O93209
GGSPAPEAAAK	FOAMV_P14350_2mut
GGGGGSEAAAK	FOAMV_P14350_2mut
GSSPAPGGS	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSS	SFVCP_Q87040_2mut
EAAAKPAP	FOAMV_P14350-Pro
EAAAKGGG	SFV3L_P27401_2mut
GGGEAAAK	AVIRE_P03360_3mutA
PAPGSSGGG	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGSPAP	SFV3L_P27401
GSSGGSGGG	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSGGGEAAAK	GALV_P21414_3mutA
GGGPAPGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS

【０６９０】

【表Ｄ１－６７】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPGGGEAAAK	FFV_O93209-Pro_2mut
GSSGSSGSSGSS	SFV1_P23074_2mut
GGSEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGEAAAKPAP	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKGGGPAP	SFV3L_P27401_2mut
GGGGSSPAP	FLV_P10273_3mut
EAAAKPAPGSS	FFV_O93209_2mut
GGGGSSPAP	SFV3L_P27401_2mut
GSSGSS	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	BLVJ_P03361_2mut
GGGGSSGGS	GALV_P21414_3mutA
EAAAKGGSGSS	FFV_O93209-Pro
EAAAKPAP	PERV_Q4VFZ2
GSSGGGEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPGGSGGG	BAEVM_P10272
EAAAKGGGPAP	MLVF5_P26810
GSSGSSGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSSGGS	AVIRE_P03360_3mutA
GGSEAAAKGGG	FOAMV_P14350_2mut
EAAAKGGS	MLVF5_P26810_3mutA
GGSGSSGGG	WMSV_P03359_3mut
EAAAK	SFV1_P23074_2mut
GSSGGSPAP	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGGSSGGS	KORV_Q9TTC1_3mut
PAPGGSGGG	FFV_O93209-Pro_2mut
GGGPAPGGS	SFV3L_P27401_2mutA
GSSPAPEAAAK	FLV_P10273_3mut
GGSGSSPAP	SFV3L_P27401_2mut
GSSEAAAKGGS	SFV3L_P27401_2mut
PAPGGG	SFV3L_P27401_2mutA
SGSETPGTSESATPES	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGGS	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GSSGGGEAAAK	WMSV_P03359
EAAAKGGGGSEAAAK	MLVF5_P26810_3mutA
GSSEAAAKPAP	FFV_O93209
GGGGGG	SFV1_P23074_2mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKPAPGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSGSSEAAAK	SFV3L_P27401_2mutA
GGSEAAAK	MLVMS_P03355_3mut

【０６９１】

【表Ｄ１－６８】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGSPAPEAAAK	SFV3L_P27401_2mut
GGGPAPGSS	SFV1_P23074
GGGGGSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKPAPGSS	KORV_Q9TTC1-Pro
GSSGSSGSSGSS	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKPAP	SFV3L_P27401_2mut
GGGEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGS	SFV3L_P27401_2mutA
EAAAKGSSGGS	MMTVB_P03365
SGSETPGTSESATPES	SFV3L_P27401
EAAAKGSSGGG	PERV_Q4VFZ2
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MMTVB_P03365
GGSGGGPAP	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPAPAPAP	SFV3L_P27401
GGGEAAAKGGS	SFV1_P23074_2mut
GSSGGSGGG	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPEAAAKGGS	FOAMV_P14350_2mutA
GGGEAAAKGSS	SFV3L_P27401_2mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVBM_Q7SVK7
PAPGSSGGG	FLV_P10273
GGSGSSGGG	FFV_O93209
EAAAKPAPGSS	MLVBM_Q7SVK7
GSSEAAAKGGG	SFV3L_P27401_2mutA
GGSGGSGGSGGSGGS	MLVF5_P26810
GGSEAAAKPAP	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKGGSPAP	SFV3L_P27401_2mutA
EAAAKGGGGS	SFV3L_P27401_2mut
GSSPAPEAAAK	SFV3L_P27401_2mutA
PAPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPGGSEAAAK	KORV_Q9TTC1-Pro
GGSGSS	MLVF5_P26810_3mutA
GGSEAAAKPAP	FFV_O93209_2mut
GSS	MLVMS_P03355
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	SFV3L_P27401-Pro
PAPGGGEAAAK	SFV3L_P27401_2mut
PAPGGGGGS	SFV3L_P27401-Pro_2mut
PAPGGSGSS	BAEVM_P10272_3mut
GSSGGGEAAAK	FFV_O93209
GGSEAAAKPAP	SFV1_P23074_2mut
GGGGG	FLV_P10273_3mut

【０６９２】

【表Ｄ１－６９】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGEAAAKGSS	SFV3L_P27401
GSSGSSGSSGSSGSS	SFV1_P23074-Pro
SGSETPGTSESATPES	AVIRE_P03360
PAPGSSGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGGSSPAP	HTL3P_Q4U0X6_2mut
GGGEAAAK	SFV1_P23074
GGSGGG	AVIRE_P03360
EAAAKGSSGGG	SFV3L_P27401_2mutA
GSSPAPEAAAK	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
GGGPAPGSS	WMSV_P03359
EAAAKGSSGGG	MLVMS_P03355
GGGGGSEAAAK	MLVMS_P03355
EAAAKPAPGGS	SFV3L_P27401
EAAAKGSSPAP	SFV3L_P27401
GGGGGGG	FOAMV_P14350_2mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	SFV3L_P27401
GSSPAPGGS	FFV_O93209_2mutA
GGGGSSEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSEAAAKGSS	GALV_P21414_3mutA
GGSEAAAKGSS	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKPAPGGG	MLVCB_P08361
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	SFV1_P23074-Pro
GGGGSEAAAKGGGGS	FOAMV_P14350_2mut
GSSPAPGGS	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGS	FFV_O93209-Pro
GSSGGSPAP	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGGS	GALV_P21414_3mutA
PAPGSSEAAAK	WMSV_P03359
PAPGGGGSS	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGSGGGGS	FFV_O93209_2mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	XMRV6_A1Z651
GGSGSSEAAAK	SFV1_P23074_2mut
GGSGGGGSS	GALV_P21414_3mutA
GGSEAAAKPAP	MLVBM_Q7SVK7
EAAAKGGSPAP	SFV1_P23074_2mutA
PAPAPAPAP	FFV_O93209
GSSGGSPAP	MMTVB_P03365-Pro
GGGGGSPAP	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGGGPAP	PERV_Q4VFZ2

【０６９３】

【表Ｄ１－７０】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GSSGGSPAP	BAEVM_P10272
GGGGG	FFV_O93209
GGGGGS	FLV_P10273_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	FOAMV_P14350
PAPGGG	MLVCB_P08361_3mut
GSSGGSEAAAK	FOAMV_P14350_2mutA
GGSPAPGGG	FLV_P10273_3mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GGSPAPEAAAK	SFV3L_P27401
PAPGGGGSS	HTL3P_Q4U0X6_2mutB
GGGGSSEAAAK	MMTVB_P03365_2mut_WS
PAPGGS	MLVRD_P11227_3mut
GGSGGSGGSGGSGGS	MMTVB_P03365
GSAGSAAGSGEF	AVIRE_P03360
GSSGGS	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGGGGSS	MMTVB_P03365
GGSGGGGSS	WMSV_P03359
PAPEAAAKGSS	SFV1_P23074
GSSGSSGSSGSS	SFV1_P23074-Pro_2mutA
PAPAPAPAPAP	SFV3L_P27401
PAPGSSGGG	FLV_P10273_3mut
GGSGSSPAP	MLVMS_P03355
GGSGGGPAP	FOAMV_P14350
PAPGGGGGS	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGSSPAP	GALV_P21414_3mutA
GGSGSSPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKGSS	SFV3L_P27401_2mut
GGGGGSEAAAK	WMSV_P03359
GGGGGGGG	SFV1_P23074-Pro
EAAAKEAAAK	MLVBM_Q7SVK7
GGGEAAAKGGS	MLVBM_Q7SVK7
EAAAKGGSPAP	SFV3L_P27401_2mut
GSSEAAAK	XMRV6_A1Z651
PAPGGGEAAAK	MMTVB_P03365_WS
GGSPAP	GALV_P21414_3mutA
GSSPAPGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGSSPAP	SFV1_P23074_2mutA
GGS	HTL32_Q0R5R2_2mut
GGSGGGGSS	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SFVCP_Q87040_2mutA

【０６９４】

【表Ｄ１－７１】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKGGGPAP	FOAMV_P14350_2mut
GSSGGGEAAAK	MMTVB_P03365
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	MMTVB_P03365_WS
EAAAKEAAAK	FOAMV_P14350-Pro_2mut
GSSPAPEAAAK	FOAMV_P14350_2mutA
EAAAKPAPGGS	GALV_P21414_3mutA
GSSGGSPAP	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGPAPEAAAK	MLVAV_P03356
GGGEAAAKPAP	SFV1_P23074-Pro_2mut
GGGGGSEAAAK	SFV3L_P27401_2mut
GGGPAPGSS	SFV3L_P27401_2mut
GGSEAAAKPAP	AVIRE_P03360
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	SFV1_P23074-Pro_2mut
EAAAKGSSGGS	FOAMV_P14350_2mutA
GGGGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSSPAPGGS	PERV_Q4VFZ2
GGSGSSPAP	GALV_P21414_3mutA
GGGPAPEAAAK	SFV3L_P27401
GGSGGGEAAAK	WMSV_P03359
GSAGSAAGSGEF	SFV1_P23074_2mut
GSSGGGEAAAK	MLVMS_P03355
GGG	MMTVB_P03365-Pro
PAPGSSGGS	FOAMV_P14350_2mut
GGGGSSPAP	FFV_O93209_2mut
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	MMTVB_P03365_WS
GGGGGGG	XMRV6_A1Z651
PAPAPAPAPAP	FOAMV_P14350
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MMTVB_P03365_2mut_WS
GGSGGGPAP	SFV3L_P27401_2mut
GGGGGG	SFV1_P23074-Pro
EAAAKPAPGSS	SFV3L_P27401_2mut
GGGGSSGGS	HTL3P_Q4U0X6_2mut
PAPGSSEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSSPAP	FOAMV_P14350-Pro_2mut
PAPGSSGGS	MMTVB_P03365
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	SRV2_P51517
PAPAPAP	MMTVB_P03365_2mut_WS
PAPGGGGGS	MMTVB_P03365_2mutB
GGGGSS	SFV1_P23074-Pro_2mutA

【０６９５】

【表Ｄ１－７２】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SFV3L_P27401-Pro
GGSGGSGGSGGSGGS	MMTVB_P03365-Pro
GGCGGGG	SFV3L_P27401_2mut
PAPGGGEAAAK	SFV3L_P27401
PAPGSS	FOAMV_P14350_2mutA
GGGGSGGGGS	SFVCP_Q87040_2mutA
GSSGGSGGG	XMRV6_A1Z651
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVBM_Q7SVK7
GSSEAAAKGGG	FFV_O93209-Pro_2mut
GGSEAAAKPAP	SFV3L_P27401-Pro
GSSGGSGGG	SFV1_P23074_2mut
EAAAKGGGGSS	FOAMV_P14350_2mutA
GGGGGG	SFV3L_P27401_2mut
GGGGG	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPEAAAKGGG	SFV3L_P27401
EAAAKGGSPAP	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGEAAAKPAP	SFV1_P23074_2mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	KORV_Q9TTC1-Pro
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SFVCP_Q87040
PAPGSSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7
GSSGSSGSS	FFV_O93209-Pro_2mut
GSSGGGPAP	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGGPAPEAAAK	WMSV_P03359_3mut
GGGEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
GSSGSSGSSGSS	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
PAPAPAPAPAP	FFV_O93209-Pro
GGSPAPEAAAK	FFV_O93209-Pro_2mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	GALV_P21414
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	FOAMV_P14350
GGGPAPEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
PAPGGSGGG	MLVF5_P26810_3mutA
PAPGGSGGG	FLV_P10273_3mut
GGGEAAAKGGS	SFV3L_P27401
GSAGSAAGSGEF	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSSPAPGGG	MPMV_P07572_2mutB
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	FOAMV_P14350
GGSGGGGSS	BLVJ_P03361_2mut
PAPEAAAKGSS	SFV1_P23074-Pro
GGG	FFV_O93209
EAAAKGGGGSS	SFV1_P23074_2mut

【０６９６】

【表Ｄ１－７３】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SRV2_P51517
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MMTVB_P03365
GGGEAAAKGGS	MMTVB_P03365_WS
GSSGSS	SFV1_P23074
GSSGGGGGS	SFV3L_P27401
GGGGSSEAAAK	SFV1_P23074
EAAAKGSSGGS	HTL1A_P03362_2mutB
GSSEAAAKGGS	GALV_P21414_3mutA
EAAAKGSSPAP	SFV1_P23074
EAAAKPAPGSS	SFV3L_P27401_2mutA
PAPGSSGGG	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SFV3L_P27401-Pro
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MMTVB_P03365_WS
GGGGSSEAAAK	MLVF5_P26810_3mutA
EAAAKGGSPAP	GALV_P21414
PAPEAAAKGSS	MMTVB_P03365_WS
GSSGGGGGS	SFVCP_Q87040_2mut
GGGGSSPAP	SFV1_P23074
EAAAKGGGGSS	XMRV6_A1Z651
PAPAPAPAP	MMTVB_P03365
GGSEAAAKGSS	SFV3L_P27401_2mutA
GSSPAPGGG	MMTVB_P03365_WS
GGGGGG	SFV3L_P27401-Pro
GGSGGSGGS	FOAMV_P14350-Pro_2mut
PAPAPAPAPAP	WMSV_P03359
GSSPAP	MLVBM_Q7SVK7
GGGGGSGSS	MMTVB_P03365_2mut_WS
EAAAKGSSGGS	MMTVB_P03365_2mutB_WS
EAAAK	FFV_O93209_2mutA
PAPEAAAK	SFV1_P23074-Pro
EAAAKGGSGSS	SFV3L_P27401
GGSGGSGGS	FFV_O93209-Pro
GSSGGGEAAAK	MMTVB_P03365
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	HTL1L_P0C211_2mutB
GGGEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGGGSGSS	MMTVB_P03365
GSSPAPGGS	FOAMV_P14350_2mutA
EAAAKGSS	MLVMS_P03355
GSSGGSGGG	FFV_O93209-Pro

【０６９７】

【表Ｄ１－７４】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGSGGGGSS	MMTVB_P03365-Pro_2mut
GGSPAPGSS	FOAMV_P14350_2mut
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	SFVCP_Q87040-Pro_2mut
GSSEAAAKGGG	FOAMV_P14350_2mutA
GGSGGSGGS	MMTVB_P03365-Pro
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	MMTVB_P03365_2mut_WS
GSSGSSGSSGSSGS	MMTVB_P03365-Pro
PAPEAAAK	WDSV_O92815
GSSGSSGSSGSSGSS	FFV_O93209-Pro_2mut
EAAAKGGGGSEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
GGSPAPEAAAK	FOAMV_P14350
GSSGSS	PERV_Q4VFZ2
GGG	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSGGGGSGGGGS	FFV_O93209_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
GGSGSSPAP	WMSV_P03359
GGGGGGGG	SFV3L_P27401_2mut
PAPGSSEAAAK	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
GGGGSSPAP	FOAMV_P14350_2mut
GSSGGSPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSSGGGGGS	GALV_P21414_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MMTVB_P03365
GSSGGGGGS	SFV1_P23074_2mut
GGGGSEAAAKGGGGS	SFV1_P23074
GGGEAAAKPAP	FFV_O93209
PAPGGGEAAAK	SFV1_P23074
GGSGGGEAAAK	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGG	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKGSSGGS	FFV_O93209_2mut
GGGGG	SFV1_P23074_2mut
GGGPAP	SFV3L_P27401
GSSGGSEAAAK	FFV_O93209
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	MMTVB_P03365-Pro
GSSGGGEAAAK	SFV1_P23074_2mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	SFV3L_P27401_2mut
GGSEAAAKPAP	FLV_P10273
GGGGSGGGGS	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
GSSEAAAKPAP	SFV3L_P27401
GGGGSEAAAKGGGGS	MMTVB_P03365-Pro
PAPGSSEAAAK	MLVF5_P26810_3mut

【０６９８】

【表Ｄ１－７５】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKGGSGGG	SFV3L_P27401
GGGPAPGGS	SFV3L_P27401
GSSEAAAKGGS	FOAMV_P14350_2mutA
EAAAKGGSGGG	HTL1L_P0C211
GSSGGSPAP	SFV3L_P27401_2mutA
PAPAP	FFV_O93209
PAPGGSGSS	MMTVB_P03365_WS
EAAAKGGGGGS	FOAMV_P14350_2mut
PAPEAAAKGGS	SFV3L_P27401_2mut
GSSEAAAKPAP	MMTVB_P03365-Pro
GGSGGS	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSEAAAKGGG	FFV_O93209-Pro_2mutA
EAAAK	HTL1L_P0C211
GSSPAP	MLVMS_P03355
EAAAKPAPGGG	FFV_O93209-Pro_2mut
GGGGSEAAAKGGGGS	SFV1_P23074-Pro_2mut
EAAAKGSSGGS	SFV3L_P27401
GSAGSAAGSGEF	FFV_O93209_2mutA
PAPEAAAKGGS	MMTVB_P03365_2mutB_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MMTVB_P03365
GGS	MMTVB_P03365
GGSEAAAKPAP	SFV1_P23074
EAAAKGSSGGG	HTLV2_P03363_2mut
GGSEAAAKGGG	MMTVB_P03365_WS
GGSGGS	FFV_O93209-Pro
GSSEAAAKGGS	MMTVB_P03365-Pro
PAPAPAPAPAP	SFV1_P23074_2mutA
GGSEAAAKGGG	MMTVB_P03365_2mutB_WS
PAPAPAPAP	MMTVB_P03365_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	HTL3P_Q4U0X6_2mut
PAPGGSEAAAK	SFV1_P23074-Pro_2mut
GGSGGGPAP	MMTVB_P03365
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	MMTVB_P03365-Pro
GGSEAAAKPAP	SFV1_P23074-Pro
GGGEAAAKGSS	SFV3L_P27401_2mutA
GGGPAPGGS	AVIRE_P03360
PAPGGG	MLVRD_P11227
GGSEAAAKGSS	SFV3L_P27401_2mut
GGGEAAAKGSS	FOAMV_P14350_2mut
GGGEAAAKGSS	SFV1_P23074-Pro

【０６９９】

【表Ｄ１－７６】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVAV_P03356
EAAAKGGGPAP	JSRV_P31623_2mutB
EAAAKGGGGSS	FOAMV_P14350_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SRV2_P51517
GSSGGGGGS	FFV_O93209
PAPAPAP	FOAMV_P14350_2mutA
GGSGGSGGSGGS	FOAMV_P14350
GGGEAAAK	MMTVB_P03365_WS
GGGGGS	SFV1_P23074_2mutA
GGSGGS	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGS	MMTVB_P03365-Prc
GGGGSS	BLVJ_P03361_2mut
PAPAP	MMTVB_P03365-Prc_2mut
PAPGGG	SMRVH_P03364
EAAAKGGGGSS	SFV3L_P27401
PAPAPAPAPAP	MMTVB_P03365
GGGPAP	MMTVB_P03365-Prc
GSSGGSGGG	MMTVB_P03365
EAAAKGGGPAP	FOAMV_P14350_2mutA
GSSGSSGSSGSS	SFV1_P23074
GGGGSGGGGS	SFV3L_P27401
GSSGGSGGG	MLVF5_P26810
GGGEAAAKPAP	MMTVB_P03365-Prc
PAPEAAAK	HTLV2_P03363_2mut
GSSGSSGSSGSS	FOAMV_P14350_2mut
GSSEAAAKPAP	MMTVB_P03365-Prc
PAPEAAAKGGG	HTL3P_Q4U0X6_2mut
GGSEAAAKGSS	MMTVB_P03365-Prc
EAAAKPAPGGS	MMTVB_P03365_2mut_WS
GSSGGSEAAAK	MLVF5_P26810_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MLVF5_P26810_3mut
EAAAKGGGGSS	MMTVB_P03365-Pro
GGGGGSGSS	HTL1A_P03362_2mutB
PAPAP	FFV_O93209-Pro_2mut
GGGGGSPAP	HTL1C_P14078_2mut
GGGPAP	HTLV2_P03363_2mut
EAAAKGGGGSEAAAK	SFVCP_Q87040
GGSEAAAKGGG	FFV_O93209-Pro_2mutA
GSSPAPGGS	FOAMV_P14350-Pro_2mut
GGGGGGG	MMTVB_P03365-Prc

【０７００】

【表Ｄ１－７７】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKGSS	SFV3L_P27401_2mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSEAAAKGGGGS	SFV1_P23074-Pro_2mutA
EAAAKGGGGSS	MMTVB_P03365
GGGEAAAKGGS	SFV1_P23074
PAPEAAAKGGG	MLVF5_P26810
GGGGSSGGS	MMTVB_P03365
GGSGSS	MMTVB_P03365
PAPAPAPAPAPAP	KORV_Q9TTC1
EAAAKGGG	SFV1_P23074-Pro_2mut
PAPAPAPAPAPAP	SRV2_P51517
GSSGSSGSSGSSGSS	FFV_O93209-Pro_2mutA
GGGGSS	FOAMV_P14350_2mut
PAPGGGEAAAK	MMTVB_P03365_WS
GGSGGGEAAAK	FFV_O93209-Pro_2mut
PAPAPAPAPAP	MMTVB_P03365_WS
GGGEAAAKGGS	MMTVB_P03365-Pro
GGGEAAAKGSS	MMTVB_P03365_2mutB
GSSPAPEAAAK	MMTVB_P03365_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	SFV1_P23074-Pro_2mutA
PAPGGG	SFV3L_P27401
GSSEAAAKGGG	MMTVB_P03365_WS
GGGGSSEAAAK	FOAMV_P14350_2mut
PAPGSSGGS	SFV1_P23074-Pro_2mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	SFV3L_P27401
EAAAKGSSGGG	MMTVB_P03365
PAPGGGGSS	WDSV_O92815_2mutA
GGSPAP	MMTVB_P03365-Pro
GGSGGSGGSGGSGGS	SFVCP_Q87040-Pro_2mut
PAPAPAPAP	MMTVB_P03365-Pro
GGGGG	HTL1A_P03362
GGSGGSGGSGGS	SFV1_P23074_2mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	FOAMV_P14350-Pro_2mut
PAPGGSEAAAK	MMTVB_P03365_2mutB_WS
PAPAPAPAP	SFV1_P23074_2mut
PAPGGGGSS	MMTVB_P03365
GGSGSS	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MMTVB_P03365_2mut
EAAAKGGSGGG	HTL3P_Q4U0X6_2mut
PAPGGGGSS	SFVCP_Q87040-Pro_2mutA

【０７０１】

【表Ｄ１－７８】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
EAAAKGGGGS	MLVAV_P03356
GGGGGS	FOAMV_P14350_2mut
GGGEAAAKGGS	FFV_O93209-Pro_2mutA
EAAAKPAPGGG	MMTVB_P03365_2mutB
GGSGGGPAP	FFV_O93209_2mut
GSSEAAAKPAP	MMTVB_P03365
PAPAPAPAPAPAP	SFV1_P23074_2mut
GGSPAPGGG	MMTVB_P03365-Pro
GGSGGGEAAAK	MMTVB_P03365
PAPAP	SFVCP_Q87040
GSSEAAAK	SFVCP_Q87040
GGGGSGGGGSGGGGS	MMTVB_P03365-Pro
GSSGSSGSS	SFV3L_P27401
EAAAKGGSGGG	MMTVB_P03365-Pro
GSSPAP	SFV1_P23074_2mut
GGGEAAAK	SFV1_P23074-Pro
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	MMTVB_P03365-Pro
PAPGGS	HTL1C_P14078_2mut
PAPGSSGGS	SFV1_P23074_2mut
PAPEAAAK	MMTVB_P03365_WS
PAPAP	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKGGS	HTL1A_P03362_2mut
GGGGSEAAAKGGGGS	HTL1C_P14078
EAAAKGSSGGS	FOAMV_P14350-Pro
PAPGGSGSS	MMTVB_P03365-Pro
PAPGGSEAAAK	SFV1_P23074_2mut
PAPGSSEAAAK	FFV_O93209-Pro_2mut
PAPGSSGGG	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
GSSGGGEAAAK	AVIRE_P03360
GGGGGG	SMRVH_P03364_2mut
PAPEAAAKGGG	MMTVB_P03365-Pro
GGGEAAAKGGS	SFVCP_Q87040_2mutA
PAPAPAPAP	SRV2_P51517
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	MMTVB_P03365
EAAAKGGGPAP	MLVAV_P03356
PAPAPAPAPAP	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
PAPGGSEAAAK	FOAMV_P14350
GSSGGGPAP	HTL32_Q0R5R2_2mutB
GGGGGSPAP	HTL3P_Q4U0X6_2mutB
GSSGGSGGG	MMTVB_P03365-Pro

【０７０２】

【表Ｄ１－７９】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPAP	SFVCP_Q87040-Pro
GSSGGGPAP	MMTVB_P03365-Prc
GGSGSS	MMTVB_P03365-Prc_2mut
GGSPAPEAAAK	SFV1_P23074-Pro_2mut
EAAAKGGSGGG	SFV3L_P27401_2mut
GGGGSSEAAAK	MMTVB_P03365_WS
GGGGGSGSS	MMTVB_P03365_2mut
GGGGSSGGS	SFV1_P23074-Pro_2mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	MMTVB_P03365_WS
PAPGGGEAAAK	SFV1_P23074-Pro
PAPEAAAKGGG	MMTVB_P03365
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	MMTVB_P03365
GSSGGSEAAAK	FOAMV_P14350-Pro_2mut
GGSPAP	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSSEAAAK	FOAMV_P14350
GSSEAAAK	MMTVB_P03365-Prc
EAAAKGSSGGS	HTL1A_P03362_2mut
GGGEAAAKPAP	FOAMV_P14350-Pro_2mut
EAAAKGGSPAP	FOAMV_P14350
GSSEAAAKPAP	MMTVB_P03365_WS
GSSGSSGSS	FOAMV_P14350_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MMTVB_P03365_WS
EAAAK	MMTVB_P03365
PAPGSS	BAEVM_P10272
PAPGGS	FFV_O93209-Pro_2mut
GGSGGS	SFV1_P23074-Pro_2mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	HTLV2_P03363_2mut
GGSGGGEAAAK	MMTVB_P03365_WS
PAPGSSGGG	HTL1A_P03362
GGSGGS	SFV3L_P27401-Pro
GSSGSS	SFV1_P23074-Pro
PAPGGSEAAAK	MMTVB_P03365
GSAGSAAGSGEF	MMTVB_P03365-Prc
PAPGGG	FOAMV_P14350_2mut
EAAAKGGSGSS	MMTVB_P03365_WS
GSSGGGEAAAK	SFV3L_P27401-Pro
GGSGGGPAP	FOAMV_P14350-Pro_2mut
PAPAPAPAPAPAP	WDSV_O92815
SGSETPGTSESATPES	SFVCP_Q87040-Pro_2mutA
GGSGGSGGS	SFV1_P23074

【０７０３】

【表Ｄ１－８０】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGGSS	SFVCP_Q87040_2mut
GGGGGSEAAAK	MMTVB_P03365
SGSETPGTSESATPES	MMTVB_P03365_WS
PAPAPAP	SFV3L_P27401
PAPEAAAKGSS	MMTVB_P03365_2mutB_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	SRV2_P51517
GGGPAPGSS	HTL32_Q0R5R2_2mutB
GGSGGGGSS	MMTVB_P03365-Pro
SGSETPGTSESATPES	SRV2_P51517
EAAAKGSSGGS	MMTVB_P03365-Pro
GSSPAPEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
GSSPAPEAAAK	SRV2_P51517
GGGGSSPAP	MMTVB_P03365-Pro
PAPGGGEAAAK	SFV1_P23074-Pro_2mutA
PAPEAAAKGGS	MMTVB_P03365
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	FOAMV_P14350-Pro
GGSPAPGSS	SFV3L_P27401
GGGPAPGGS	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GGGPAPGSS	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKPAP	MLVBM_Q7SVK7
EAAAKEAAAKEAAAK	HTL1C_P14078
GSSGGSEAAAK	SRV2_P51517
PAPGGGGGS	SRV2_P51517
GGGEAAAK	FFV_O93209-Pro_2mut
EAAAKGGGPAP	HTL32_Q0R5R2
GGSGSSGGG	MMTVB_P03365
PAPEAAAKGSS	MMTVB_P03365-Pro
PAPGGGGGS	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKGGGGS	MMTVB_P03365_WS
GGGGGS	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	HTL1C_P14078
EAAAKGGSPAP	MMTVB_P03365
GGGGSSPAP	FFV_O93209-Pro_2mut
GGGGSSGGS	MMTVB_P03365-Pro
PAPGSSGGS	MMTVB_P03365-Pro
GGGGGS	SRV2_P51517
GGSGSSGGG	MMTVB_P03365
GSSGGSEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	GALV_P21414
GGSEAAAKGGG	MMTVB_P03365-Pro

【０７０４】

【表Ｄ１－８１】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	MMTVB_P03365-Pro
GSSEAAAKGGS	MMTVB_P03365
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	HTL3P_Q4U0X6_2mutB
GGGEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
PAPAPAPAP	MMTVB_P03365-Pro
PAPGSSGGG	MMTVB_P03365
GSSGSSGSSGSSGSS	GALV_P21414
GGSPAP	MMTVB_P03365_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MMTVB_P03365-Pro
PAPEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
PAPGSSGGG	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GGGGGSEAAAK	MMTVB_P03365_2mutB_WS
PAPAPAPAPAP	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKGGSGSS	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MLVRD_P11227_3mut
PAPAPAPAP	FOAMV_P14350_2mutA
GGGPAPGSS	SFVCP_Q87040_2mut
PAPEAAAKGSS	SFVCP_Q87040_2mut
GGSPAPGGG	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MMTVB_P03365
EAAAKGGS	HTL3P_Q4U0X6_2mut
PAPGSSGGS	MMTVB_P03365_WS
GGGGSGGGGS	MMTVB_P03365
GGSGGS	FOAMV_P14350
EAAAKGGGGSEAAAK	SFVCP_Q87040-Pro_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	MMTVB_P03365-Pro_2mutB
PAPGGGEAAAK	SFVCP_Q87040-Pro
GSSGSS	JSRV_P31623_2mutB
EAAAKGGGGGS	MMTVB_P03365_2mut_WS
GSSPAPEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
GGGEAAAK	HTL1C_P14078
PAPEAAAKGSS	HTL32_Q0R5R2_2mutB
GGGGSSEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
PAPGSSGGS	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKGGGGGS	MMTVB_P03365
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MMTVB_P03365
EAAAKGGGGSS	HTL3P_Q4U0X6_2mut
GGGEAAAKGGS	SFVCP_Q87040-Pro
GGGGGSPAP	MMTVB_P03365-Pro_2mutB
GGSGGGEAAAK	SFV3L_P27401-Pro

【０７０５】

【表Ｄ１－８２】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
PAPGGGGGS	SFV3L_P27401-Pro
EAAAKGGGGSEAAAK	MMTVB_P03365
PAPEAAAKGSS	MMTVB_P03365-Prc
GGSEAAAKGGG	MMTVB_P03365-Pro
GGSGGSGGSGGSGGS	SMRVH_P03364_2mutB
GGSGGSGGSGGSGGS	HTL1L_P0C211_2mut
GGGGGG	WDSV_O92815
GGGGGSGSS	MMTVB_P03365-Prc
GGSEAAAKPAP	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGGPAPGSS	MMTVB_P03365_2mut_WS
GGGGGS	MMTVB_P03365_WS
GGSPAPEAAAK	MMTVB_P03365
PAPEAAAKGGS	HTL1A_P03362
EAAAKGGSGSS	MMTVB_P03365_2mut_WS
GGGPAPEAAAK	SFV3L_P27401-Pro_2mut
PAPGGGGSS	HTL32_Q0R5R2_2mut
GSSPAPGGG	HTL3P_Q4U0X6_2mut
GGGGSSGGS	BLVAU_P25059_2mut
EAAAKGGGGGS	HTL1L_P0C211
GGSEAAAKGSS	JSRV_P31623_2mutB
GSSGGG	JSRV_P31623
GGSGGSGGSGGS	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKPAP	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GGGGSSGGS	MMTVB_P03365_WS
GGSGGS	MMTVB_P03365_WS
EAAAKGGGGGS	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	MMTVB_P03365
GGSGGSGGS	MMTVB_P03365
GGGGGSEAAAK	MLVBM_Q7SVK7
GGSGSSPAP	MMTVB_P03365_WS
EAAAKEAAAKEAAAK	JSRV_P31623
PAPEAAAKGGS	MMTVB_P03365-Prc
GGSGSSEAAAK	FOAMV_P14350
GGGGGSGSS	MMTVB_P03365-Prc_2mut
GGGPAPGGS	MMTVB_P03365
SGSETPGTSESATPES	SFVCP_Q87040_2mut
GSSPAPGGS	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	MMTVB_P03365
EAAAKGGGPAP	MMTVB_P03365
GSSGGG	MMTVB_P03365_2mut_WS

【０７０６】

【表Ｄ１－８３】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GGGEAAAKPAP	MMTVB_P03365
PAPGGSGGG	MMTVB_P03365-Pro
GSSGGSGGG	WDSV_O92815_2mut
GGSGGG	HTL32_Q0R5R2_2mut
EAAAKGGSPAP	HTLV2_P03363_2mut
GGSPAPEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
GSSGGSEAAAK	MMTVB_P03365_2mut
GSAGSAAGSGEF	MMTVB_P03365_WS
PAPGGSGSS	FFV_O93209
GGSEAAAKGGG	MMTVB_P03365
GGSPAPGSS	MMTVB_P03365-Pro
GSSGGSGGG	SFV3L_P27401
PAPEAAAKGGG	HTL1A_P03362_2mutB
GGGEAAAKPAP	MMTVB_P03365-Pro
GGSEAAAK	HTL32_Q0R5R2_2mutB
GGGEAAAKGSS	MPMV_P07572
GGGGGSEAAAK	MMTVB_P03365-Pro
PAPAPAPAPAP	SFVCP_Q87040-Pro_2mutA
PAPAPAPAPAP	HTL1L_P0C211_2mut
GGGGSSGGS	HTL3P_Q4U0X6
PAPGGSEAAAK	MMTVB_P03365_2mut_WS
PAPAPAPAPAP	HTL1A_P03362
EAAAKPAPGGG	MMTVB_P03365_2mut_WS
GGSEAAAK	MMTVB_P03365_2mut_WS
GGGEAAAKGSS	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GGSPAPGSS	MMTVB_P03365-Pro
GGSEAAAKPAP	MLVBM_Q7SVK7
PAPEAAAKGGG	MMTVB_P03365_2mut_WS
GSSEAAAKPAP	MMTVB_P03365-Pro_2mutB
GGGGSEAAAKGGGGS	MMTVB_P03365-Pro_2mut
GSSEAAAKGGS	MMTVB_P03365-Pro_2mutB
GSSGSSGSSGSSGSS	SRV2_P51517_2mutB
GGGGGSPAP	HTL1L_P0C211_2mut
GGSEAAAK	MMTVB_P03365
GSSPAPEAAAK	SMRVH_P03364_2mutB
GGGPAPGGS	HTL1C_P14078_2mut
GGSPAPEAAAK	MMTVB_P03365_WS
GGSEAAAKPAP	HTL1A_P03362_2mut
PAPAPAPAP	HTLV2_P03363_2mut
GSSPAPGGG	MMTVB_P03365

【０７０７】

【表Ｄ１－８４】

リンカーアミノ酸配列	RTドメイン名
GSSGSSGSSGSS	MMTVB_P03365-Pro
GGSEAAAKGSS	MMTVB_P03365_WS
GGSGSSGGG	MMTVB_P03365_2mutB
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	JSRV_P31623_2mutB
GGSEAAAKPAP	MMTVB_P03365-Pro
GSSGGSGGG	HTLV2_P03363_2mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	WDSV_O92815_2mut
GGSPAPEAAAK	MMTVB_P03365
GGGGSSEAAAK	MMTVB_P03365
GGSGGGEAAAK	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	WDSV_O92815_2mut
GGSGSSEAAAK	MMTVB_P03365_2mutB_WS
GGSEAAAKPAP	MMTVB_P03365_WS
GSSGGGEAAAK	SFVCP_Q87040-Pro
GSSGGS	SFVCP_Q87040-Pro_2mut
GGSEAAAKPAP	SFVCP_Q87040_2mut
GSSGGSEAAAK	SFVCP_Q87040_2mut
GSSPAPEAAAK	SRV2_P51517_2mutB
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	BLVAU_P25059
GSSGSSGSSGSSGSS	HTL1C_P14078_2mut
EAAAKGGGGSS	MMTVB_P03365_2mutB
GGGEAAAKGSS	SFVCP_Q87040-Pro

【０７０８】

実施例４：様々なヒトＤＮＡポリメラーゼθドメインとのＣａｓ－Ｐｏｌ融合を含む遺伝子組換えシステムは、ヒト細胞での正確な編集を可能にする

この実施例では、Ｃａｓドメイン及びポリメラーゼドメイン（Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合）を含む例示的な遺伝子組換えポリペプチドを特性決定し、ヒト細胞内のゲノムＤＮＡに突然変異をプログラム可能にインストールするそれらの能力を決定した。遺伝子組換えポリペプチドは、例示的なヒトポリメラーゼ（ヒトＤＮＡポリメラーゼθ（Ｐｏｌθ）の異なる切断を含み（図２、表２３）：遺伝子組換えポリペプチドは、ポリメラーゼドメイン、エキソヌクレアーゼドメインを含み、２つのいずれかは、中央のドメインが切断されたか（Ｐｏｌθ＿Ｍ若しくはＰｏｌθ＿Ｌ）又は中央のドメインが欠如していた（Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ）。遺伝子組換えポリペプチドは、Ｎ８６３Ａ突然変異（ｎＣａｓ９）を含む例示的なＣａｓドメイン、ＳｐＣａｓ９を含んでいた。２つの異なるリンカー配列を使用して、Ｃａｓドメイン及びＰｏｌドメインを接続した：

例示的なリンカーＦＬ：

ＤＮＡ配列：ＴＣＴＧＧＡＧＧＡＴＣＴＡＧＣＧＧＡＧＧＡＴＣＣＴＣＴＧＧＣＡＧＣＧＡＧＡＣＡＣＣＡＧＧＡＡＣＡＡＧＣＧＡＧＴＣＡＧＣＡＡＣＡＣＣＡＧＡＧＡＧＣＡＧＴＧＧＣＧＧＣＡＧＣＡＧＣＧＧＣＧＧＣＡＧＣＡＧＣ（配列番号４４００）

アミノ酸配列：

ＳＧＧＳＳＧＧＳＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳＳＧＧＳＳＧＧＳＳ（配列番号４４０１）

【０７０９】

例示的なリンカーＵＬ：

ＤＮＡ配列：

【化３４】

GCCGAAGCCGCCGCCAAGGAGGCCGCCGCTAAGGAGGCTGCTGCCAAGGAAGCTGC
TGCTAAGGCTTTAGAAGCTGAAGCTGCTGCCAAAGAAGCTGCCGCCAAAGAGGCTG
CCGCAAAGGAGGCCGCTGCCAAGGCT (配列番号 : 4402)

アミノ酸配列：

ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＬＥＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡ（配列番号４４０３）

６つの遺伝子組換えポリペプチド（Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合）を試験した：（１）ｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、（２）ｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ、（３）ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｌ、（４）ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、（５）ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ並びに（６）ポリメラーゼドメインの代わりにｎＣａｓ９及び逆転写酵素ドメインを含むベンチマーク遺伝子組換えポリペプチド。

【０７１０】

【表２３－１】

表23: 例示的なCas-Pol融合遺伝子組換えポリペプチド

名称	アミノ酸配列	配列番号
Polθ_L	GASFDLSPGLQRILDKVSSPLENEKLKSMTINFSSLNRKNTELNEEQEVISNLETKQVQGISFSSNNEVKS KIEMLENNANHDETSSLLPRKESNIVDDNGLIPPTPIPTSASKLTFPGILETPVNPWKTNNVLQPGESYLFG SPSDIKNHDLSPGSRNGFKDNSPISDTSFSLQLSQDGLQLTPASSSSESLSIIDVASDQNLFQTFIKEWRC KKRFSISLACEKIRSLTSSKTATIGSRFKQASSPQEIPIRDDGFPIKGCDDTLVVGLAVCWGGRDAYYFSL QKEQKHSEISASLVPPSLDPSLTLKDRMWYLQSCLRKESDKECSVVIYDFIQSYKILLLSCGISLEQSYEDP KVACWLLDPDSQEPTLHSIVTSFLPHELPLLEGMETSQGIQSLGLNAGSEHSGRYRASVESILIFNSMNQL NSLLQKENLQDVFRKVEMPSQYCLALLELNGIGFSTAECESQKHIMQAKLDAIETQAYQLAGHSFSFTSS DDIAEVLFLELKLPPNREMKNQGSKKTLGSTRRGIDNGRKLRLGRQFSTSKDVLNKLKALHPLPGLILEW RRITNAITKVVFPLQREKCLNPFLGMERIYPVSQSHTATGRITFTEPNIQNVPRDFEIKMPTLVGESPPSQA VGKGLLPMGRGKYKKGFSVNPRCQAQMEERAADRGMPFSISMRHAFVPFPGGSILAADYSQLELRILAH LSHDRRLIQVLNTGADVFRSIAAEWKMIEPESVGDDLRQQAKQICYGIIYGMGAKSLGEQMGIKENDAAC YIDSFKSRYTGINQFMTETVKNCKRDGFVQTILGRRRYLPGIKDNNPYRKAHAERQAINTIVQGSAADIVKI ATVNIQKQLETFHSTFKSHGHREGMLQSDQTGLSRKRKLQGMFCPIRGGFFILQLHDELLYEVAEEDVVQ VAQIVKNEMESAVKLSVKLKVKVKIGASWGELKDFDV	4404
Polθ_M	GFKDNSPISDTSFSLQLSQDGLQLTPASSSSESLSIIDVASDQNLFQTFIKEWRCKKRFSISLACEKIRSLT SSKTATIGSRFKQASSPQEIPIRDDGFPIKGCDDTLVVGLAVCWGGRDAYYFSLQKEQKHSEISASLVPPS LDPSLTLKDRMWYLQSCLRKESDKECSVVIYDFIQSYKILLLSCGISLEQSYEDPKVACWLLDPDSQEPTL HSIVTSFLPHELPLLEGMETSQGIQSLGLNAGSEHSGRYRASVESILIFNSMNQLNSLLQKENLQDVFRKV EMPSQYCLALLELNGIGFSTAECESQKHIMQAKLDAIETQAYQLAGHSFSFTSSDDIAEVLFLELKLPPNR	4405

【０７１１】

【表２３－２】

	EMKNQGSKKTLGSTRRGIDNGRKLRLGRQFSTSKDVLNKLKALHPLPGLILEWRRITNAITKVVFPLQREK CLNPFLGMERIYPVSQSHTATGRITFTEPNIQNVPRDFEIKMPTLVGESPPSQAVGKGLLPMGRGKYKKG FSVNPRCQAQMEERAADRGMPFSISMRHAFVPFPGGSILAADYSQLELRILAHLSHDRRLIQVLNTGADV FRSIAAEWKMIEPESVGDDLRQQAKQICYGIIYGMGAKSLGEQMGIKENDAACYIDSFKSRYTGINQFMTE TVKNCKRDGFVQTILGRRRYLPGIKDNNPYRKAHAERQAINTIVQGSAADIVKIATVNIQKQLETFHSTFKS HGHREGMLQSDQTGLSRKRKLQGMFCPIRGGFFILQLHDELLYEVAEEDVVQVAQIVKNEMESAVKLSV KLKVKVKIGASWGELKDFDV	
Polθ_4x0q	SSSSESLSIIDVASDQNLFQTFIKEWRCKKRFSISLACEKIRSLTSSKTATIGSRFKQASSPQEIPIRDDGFPI KGCDDTLVVGLAVCWGGRDAYYFSLQKEQKHSEISASLVPPSLDPSLTLKDRMWYLQSCLRKESDKEC SVVIYDFIQSYKILLLSCGISLEQSYEDPKVACWLLDPDSQEPTLHSIVTSFLPHELPLLEGMETSQGIQSLG LNAGSEHSGRYRASVESILIFNSMNQLNSLLQKENLQDVFRKVEMPSQYCLALLELNGIGFSTAECESQK HIMQAKLDAIETQAYQLAGHSFSFTSSDDIAEVLFLELKLPPNREMKNQGSKKTLGSTRRGIDNGRKLRLG RQFSTSKDVLNKLKALHPLPGLILEWRRITNAITKVVFPLQREKCLNPFLGMERIYPVSQSHTATGRITFTE PNIQNVPRDFEIKMPTLVGESPPSQAVGKGLLPMGRGKYKKGFSVNPRCQAQMEERAADRGMPFSISM RHAFVPFPGGSILAADYSQLELRILAHLSHDRRLIQVLNTGADVFRSIAAEWKMIEPESVGDDLRQQAKQI CYGIIYGMGAKSLGEQMGIKENDAACYIDSFKSRYTGINQFMTETVKNCKRDGFVQTILGRRRYLPGIKDN NPYRKAHAERQAINTIVQGSAADIVKIATVNIQKQLETFHSTFKSHGHREGMLQSDQTGLSRKRKLQGMF CPIRGGFFILQLHDELLYEVAEEDVVQVAQIVKNEMESAVKLSVKLKVKVKIGASWGELKDFDV	4406
Polθ_4x0q_GS	SSSSESLSIIDVASDQNLFQTFIKEWRCKKRFSISLACEKIRGSGDDTLVVGLAVCWGGRDAYYFSLGGS GGLDPSLTLKDRMWYLQSCLRKESDKECSVVIYDFIQSYKILLLSCGISLEQSYEDPKVACWLLDPDSQE PTLHSIVTSFLPHELPLLEGMETSQGIQSLGLNAGSEHSGRYRASVESILIFNSMNQLNSLLQKENLQDVF RKVEMPSQYCLALLELNGIGFSTAECESQKHIMQAKLDAIETQAYQLAGHSFSFTSSDDIAEVLFLELKLP PGGSGGQFSTSKDVLNKLKALHPLPGLILEWRRITNAITKVVFPLQREKCLNPFLGMERIYPVSQSHTATG RITFTEPNIQNVPRDFEIKMGGSGGMPFSISMRHAFVPFPGGSILAADYSQLELRILAHLSHDRRLIQVLNT GADVFRSIAAEWKMIEPESVGDDLRQQAKQICYGIIYGMGAKSLGEQMGIKENDAACYIDSFKSRYTGIN QFMTETVKNCKRDGFVQTILGRRRYLPGIKDNNPYRKAHAERQAINTIVQGSAADIVKIATVNIQKQLETFH STFKSHGHREGMLQSDGGSGGCPIRGGFFILQLHDELLYEVAEEDVVQVAQIVKNEMESAVKLSVKLKV KVKIGASWGELKDFDV	4407
nCas9	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRY TRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVD STDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLS KSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYAD LFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAG YIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFL KDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPN EKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECF DSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVM KQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGD SLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIK ELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRS DKARGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKH VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVW DKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANL DKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRID LSQLGGD	

【０７１２】

例示的な遺伝子組換えポリペプチドによって編集として導入されるとき、外因性ＢＦＰマーカをＧＦＰ（本明細書に記載される）に変換する働きをする直接の単一の塩基対置換をコードする試験鋳型核酸を構築した。鋳型核酸は、（ｉ）遺伝子組換えポリペプチドを標的領域にガイドするためのｇＲＮＡスペーサー配列、例えば、ＢＦＰ遺伝子座の２０ヌクレオチド配列に相補的な配列；（ｉｉ）標的プライミング重合のためのニックＤＮＡの一本鎖と相補的な塩基対形成が可能なプライマー結合配列（ＰＢＳ）；（ｉｉｉ）意図された最終標的配列を更に含む重合のための鋳型を提供する異種目的配列；及び（ｉｖ）遺伝子組換えポリペプチドのＣａｓ９ドメインに関連するｇＲＮＡスカフォールド配列を含んでいた。例示的な鋳型核酸は、５’から３’に以下の順序で配列された：（ｉ）－（ｉｖ）－（ｉｉｉ）－（ｉｉ）。鋳型組成物が、表２４に記載され（ＲＮＡＣＳ－４２３９－ＤＤ、及びＲＮＡＣＳ－４２４１－ＤＲ）、ここで、（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）はそれぞれ、ＲＮＡ又はＤＮＡヌクレオチドのいずれかとして含まれ得る。

【０７１３】

【表２４】

表24: 実施例1において使用される鋳型核酸

名称	記述	スペーサー (i)	スカフォールド (iv)	Pol鋳型 (iii)	PBS (ii)	完全な鋳型分子
鋳型DD	BFP_g4_11RT_13PBS_DD	mG*mC*mC*rGrArArGrCrArCrUrGrCrArCrGrCrCrGrU (配列番号 4409)	rGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrC (配列番号4411)	CCTGACGTACG (配列番号 4413)	GCGTGCAGTG*mC*mU*mU (配列番号 4415)	mG*mC*mC*rGrArArGrCrArCrUrGrCrArCrGrCrCrGrUrGrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCCCTGACGTACGGCGTGCAGTG*mC*mU*mU (配列番号 4417)
鋳型DR	BFP_g4_11RT_13PBS_DR	mG*mC*mC*rGrArArGrCrArCrUrGrCrArCrGrCrCrGrU (配列番号 4410)	rGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrC (配列番号4412)	CCTGACGTACG (配列番号 4414)	rGrCrGrUrGrCrArGrUrG*mC*mU*mU (配列番号 4416)	mG*mC*mC*rGrArArGrCrArCrUrGrCrArCrGrCrCrGrUrGrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCCCTGACGTACGrGrCrGrUrGrCrArGrUrG*mC*mU*mU (配列番号 4418)
鋳型RR	BFP_g4_11RT_13PBS_RR	mG*mC*mC*rGrArArGrCrArCrUrGrCrArCrGrCrCrGrU (配列番号 4419)	rGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrC (配列番号 4420)	rCrCrUrGrArCrGrUrArCrG (配列番号 4421)	rGrCrGrUrGrCrArGrUrG*mC*mU*mU (配列番号 4422)	mG*mC*mC*rGrArArGrCrArCrUrGrCrArCrGrCrCrGrUrGrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArGrUrUrArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCrCrCrUrGrArCrGrUrArCrGrCrGrUrGrCrArGrUrG*mC*mU*mU (配列番号 4423)

「r_」として表されるRNA、例えばrA、rU;「_」として表されるDNA、
例えばA、T; 2' O-メチルRNA塩基が、「m_」として表され;
ホスホロチオエート化2'-O-メチルRNA塩基が、「m_*」として入力される。

【０７１４】

実験を実施して、Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合遺伝子組換えポリペプチドのゲノム編集能力を決定した。

【０７１５】

ＵＯＳ又はＨＥＫ２９３Ｔ細胞に、例示的な遺伝子組換えポリペプチドをコードし、抗生物質（ピューロマイシン）耐性カセットを含むレンチウイルスベクターを感染させた。遺伝子組換えポリペプチドを安定的に発現する細胞を、ピューロマイシン補充培地中で細胞を培養することによって選択した。２５０，０００個の細胞／ウェル（９６ウェルプレート）を、２．５ｕＭ及び５ｕＭの化学的に合成された例示的な鋳型核酸分子でヌクレオフェクトした。細胞を、ヌクレオフェクション後３日目に蛍光活性化細胞ソーティング（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｓｏｒｔｉｎｇ）（ＦＡＣＳ、フロー）に供した。意図した編集（ＢＦＰ陽性細胞からＧＦＰ陽性細胞への変換）の頻度を、ＢＦＰ陽性細胞のパーセンテージと比べたＧＦＰ陽性細胞のパーセンテージとして決定した（図３Ａ及び３Ｂ）。

【０７１６】

結果は、遺伝子組換えポリペプチドｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｌ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ、ｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、及びｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑが、編集活性、例えば、ＨＥＫ２９

３細胞における最大で約７５％の編集効率を示したことを示す。遺伝子組換えポリペプチドは、「ＤＲ」として示される、ＤＮＡコードされた異種目的配列及びＲＮＡプライマー結合配列を含む鋳型核酸で、高い編集活性（対照逆転写酵素を含有するベンチマーク遺伝子組換えポリペプチドと同等であるか又はそれより高い）を示した（図３Ａ～Ｂ）。遺伝子組換えポリペプチドは、「ＤＤ」として示される、ＤＮＡ異種目的配列及びＤＮＡプライマー結合配列の両方を含む鋳型核酸でも編集活性を示したが、ＲＮＡプライマー結合配列を使用した場合より低かった（図３Ａ～Ｂ）。遺伝子組換えポリペプチドは、「ＲＲ」として示される、ＲＮＡ異種目的配列及びＲＮＡプライマー結合配列を含む鋳型核酸で、編集活性を示さなかった（図３Ａ～Ｂ）。編集のレベルは、ベンチマーク遺伝子組換えポリペプチドと同等であるか又はそれより高く、これは、ポリメラーゼドメインを用いた遺伝子組換えポリペプチドが、逆転写酵素ドメインを用いた遺伝子組換えポリペプチドの有用な代替物であることを実証している。データが、試験される切断を含む遺伝子組換えポリペプチド（中央のドメインの完全な切断を含む）が編集活性を有していたことを示すため、結果は、Ｐｏｌθの様々な切断が、ポリメラーゼドメインとして使用され得ることを更に実証する。

【０７１７】

「約」、「少なくとも」、「未満」、及び「を超える」などの、本出願におけるいくつかのパラメータを表す全ての数値境界について、記載は、記載される値によって境界付けられるいずれの範囲も必然的に包含することが理解されるべきである。従って、例えば、「少なくとも１、２、３、４又は５」という記載は、とりわけ、１～２、１～３、１～４、１～５、２～３、２～４、２～５、３～４、３～５及び４～５などの範囲も表す。

【０７１８】

本明細書に引用される全ての特許、出願又は非特許文献及び参照配列情報などの他の参照文献について、それらが、あらゆる目的のため及び記載される提示のため、全体が参照により組み込まれることが理解されるべきである。参照により組み込まれる文献と及び本出願との間に矛盾が存在する場合、本出願が優先される。本出願に開示される参照遺伝子配列に関連する全ての情報、例えば、例えば、ゲノム遺伝子座、ゲノム配列、機能注釈、対立遺伝子多型及び参照ｍＲＮＡ（例えば、エクソン境界又は応答エレメントを含む）及びタンパク質配列（保存的ドメイン構造など）並びに化学参照（例えば、ＰｕｂＣｈｅｍ化合物、ＰｕｂＣｈｅｍ物質又はＰｕｂＣｈｅｍ　Ｂｉｏａｓｓａｙエントリ（構造及びアッセイなどのその中の注釈を含む））を含む、ＧｅｎｅＩＤｓ又は受入番号（典型的に、ＮＣＢＩ受入番号を参照する）は、全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０７１９】

本出願において使用される見出しは、便宜上のものであるに過ぎず、本出願の解釈に影響を及ぼすものではない。

【図面】

【図１】

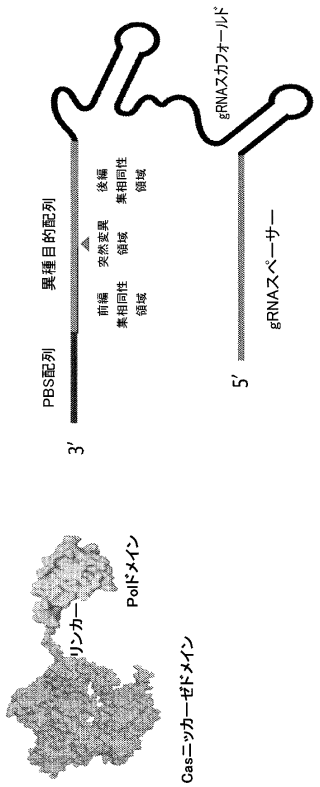


図１

【図２】

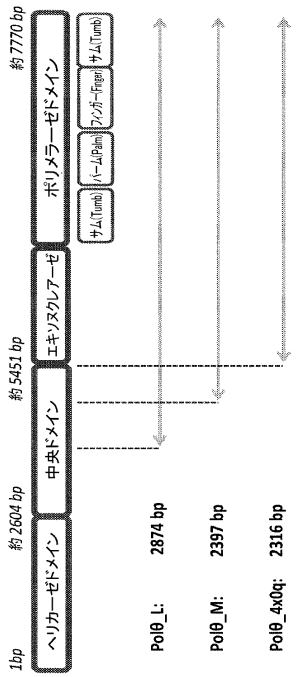
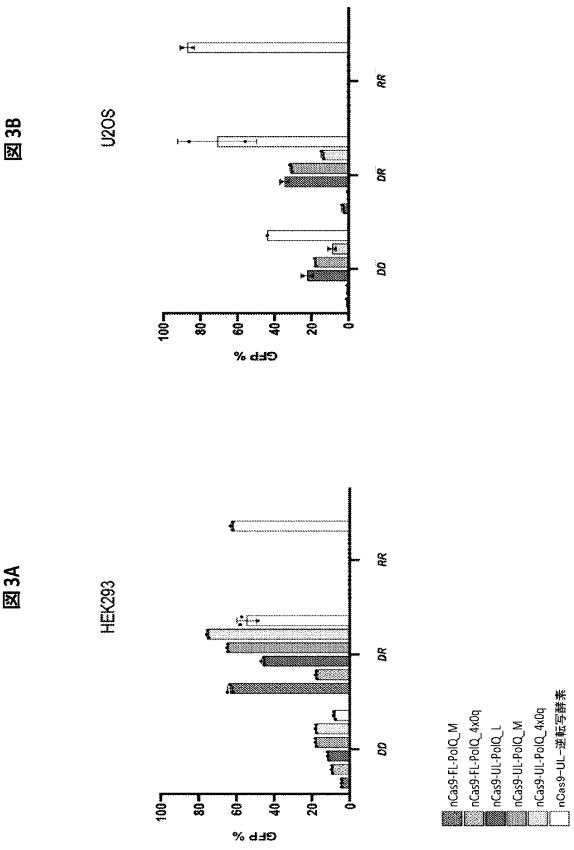


図２

【図３】



【配列表】
20245333160000001.xml

【手続補正書】
【提出日】令和6年5月14日(2024.5.14)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、２０２１年９月８日に出願された米国仮特許出願第６３／２４１，９３１号に対する優先権を主張するものであり、その各々の内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
配列表
本出願は、ＸＭＬ形式で電子的に提出され、全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。２０２２年１１月１６日に作成された前記ＸＭＬコピーは、Ｖ２０６５－７０２０ＷＯ＿ＳＬ．ｘｍｌと命名され、１１，４０５，８３３バイトのサイズである。
【背景技術】
【０００３】
ゲノムへの目的の核酸の組込みは、挿入事象を促進するための特殊なタンパク質の非存在下において低頻度で起こり、且つ部位特異性がほとんどない。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９のようないくつかの存在する手法は、宿主修復経路に依存する小さい編集により適しており、長い配列の組込みには有効性が低い。Ｃｒｅ／ｌｏｘＰといった他の既存の手法は、ｌｏｘＰ部位をゲノムに挿入する第１ステップ、次いで目的の配列をｌｏｘＰ部位に挿入する第２ステップを必要とする。当技術分野では、改善された組成物（例えばタンパク質及び核酸）及びゲノム内に目的の配列を挿入、変更又は削除する方法が必要とされている。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００４】
本開示は、宿主細胞、組織若しくは対象における１つ若しくは複数の位置のゲノムをインビボ又はインビトロで改変するための新規の組成物、システム及び方法に関する。特に、本発明は、注目する配列を宿主ゲノム中に挿入するか、宿主ゲノム中で改変するか、又は宿主ゲノム中で欠失させる組成物、システム及び方法を特徴とする。例えば、本開示は、遺伝子活性を調節する（例えば、目的の配列を挿入、変更又は削除する）ことが可能なシステム、及び１つ又は複数のこのようなシステムを投与して、疾患を引き起こす病原性突然変異を修正するように、ヌクレオチドにおけるゲノム配列を改変することにより、疾患を処置する方法を提供する。
【０００５】
組成物又は方法の構成は、以下に列挙される実施形態の１つ又は複数を含み得る。
【０００６】
１．遺伝子組換えポリペプチドであって、
標的核酸配列に結合するＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）及び
表１若しくは２３のポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列であって；ＤＢＤは、ＰｏｌドメインⅠに対して異種である、ポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン；及び
ＰｏｌドメインとＤＢＤとの間に配置されるリンカー

を含む遺伝子組換えポリペプチド。
【０００７】
２．遺伝子組換えポリペプチドであって、
Ｃａｓドメイン（例えば、Ｃａｓニッカーゼドメイン、例えばＣａｓ９ニッカーゼドメイン）；
表１若しくは２３のポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列であって、Ｐｏｌドメインは、ＣａｓドメインのＣ末端である、ポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン又は配列；及び
ＰｏｌドメインとＣａｓドメインとの間に配置されるリンカー
を含む遺伝子組換えポリペプチド。
【０００８】
３．リンカーは、表６からの配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を有する、実施形態１又は２の遺伝子組換えポリペプチド。
【０００９】
４．Ｐｏｌドメインは、表１又は２３のＰｏｌドメインに対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態の遺伝子組換えポリペプチド。
【００１０】
５．Ｐｏｌドメインは、表１又は２３のＰｏｌドメインに対して少なくとも９５％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００１１】
６．Ｐｏｌドメインは、表１又は２３のＰｏｌドメインに対して少なくとも９８％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００１２】
７．Ｐｏｌドメインは、表１又は２３のＰｏｌドメインに対して少なくとも９９％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００１３】
８．Ｐｏｌドメインは、表１又は２３のＰｏｌドメインに対して１００％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００１４】
９．リンカーは、表６からのリンカー配列に対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００１５】
１０．リンカーは、表６からのリンカー配列に対して少なくとも９５％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００１６】
１１．リンカーは、表６からのリンカー配列に対して少なくとも９７％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００１７】
１２．リンカーは、表６からのリンカー配列に対して１００％の同一性を有する配列を有する、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００１８】
１３．Ｃａｓドメインは、表４の配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を含む、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００１９】
１４．Ｃａｓドメインは、Ｃａｓニッカーゼドメインである、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００２０】

１５．Ｃａｓドメインは、Ｃａｓ９ニッカーゼドメインである、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００２１】
１６．Ｃａｓドメインは、Ｎ８６３Ａ突然変異を含む、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００２２】
１７．ＮＬＳを含み、例えば２つのＮＬＳを含む、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００２３】
１８．Ｃａｓ９ドメインのＮＬＳ　Ｎ末端を含む、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００２４】
１９．ＰｏｌドメインのＮＬＳ　Ｃ末端を含む、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００２５】
２０．Ｃａｓ９ドメインのＮ末端である第１のＮＬＳ及びＰｏｌドメインのＣ末端である第２のＮＬＳを含む、先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド。
【００２６】
２１．先の実施形態のいずれかの遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸（例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）。
【００２７】
２２．実施形態１～２０のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド又は実施形態２１の核酸を含む細胞。
【００２８】
２３．システムであって、
ｉ）実施形態１～２０のいずれかの遺伝子組換えポリペプチド、並びに
ｉｉ）鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）であって、
ａ）標的核酸配列の一部に相補的なｇＲＮＡスペーサー；
ｂ）遺伝子組換えポリペプチドのＣａｓドメインに結合するｇＲＮＡスカフォールド；
ｃ）異種目的配列；及び
ｄ）プライマー結合部位配列（ＰＢＳ配列）
を含む、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）
を含むシステム。
【００２９】
２４．鋳型核酸は、ＲＮＡを含む、実施形態２３のシステム。
【００３０】
２５．鋳型核酸は、ＤＮＡを含む、実施形態２３又は２４のシステム。
【００３１】
２６．ｇＲＮＡスペーサー及びｇＲＮＡスカフォールドは、ＲＮＡを含む、実施形態２３～２５のいずれかのシステム。
【００３２】
２７．異種目的配列は、ＤＮＡを含み、及びＰＢＳ配列は、ＲＮＡを含む、実施形態２３～２６のいずれかのシステム。
【００３３】
２８．異種目的配列及びＰＢＳ配列は、ＤＮＡを含む、実施形態２３～２６のいずれかのシステム。
【００３４】
２９．細胞（例えば、ヒト細胞）内の標的核酸を修飾する方法であって、細胞を、実施形態２３～２８のいずれかのシステム又はそれをコードする核酸と接触させ、それにより標的核酸を修飾することを含む方法。

【００３５】
３０．遺伝的欠陥と関連する疾患又は症状を有する対象を処置する方法であって、
対象に、先の実施形態のいずれかのシステム、ポリペプチド、鋳型ＲＮＡ又はそれをコードするＤＮＡを投与し、それにより遺伝的欠陥と関連する疾患又は症状を有する対象を処置すること
を含む方法。
【００３６】
３１．遺伝的欠陥と関連する疾患又は症状は、表１２～１５のいずれかに列挙される適応症であり、及び／又は遺伝的欠陥は、表１２～１５のいずれかに列挙される遺伝子における欠陥である、実施形態３０の方法。
【００３７】
３２．対象は、ヒト患者である、実施形態３０又は３１の方法。
【００３８】
一態様では、本開示は、遺伝子を組み換えるためのシステムであって、（ａ）標的プライミング逆転写が可能な遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸であって、ポリペプチドは、（ｉ）ポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン及び（ｉｉ）ＤＮＡに結合し、エンドヌクレアーゼ活性を有するＣａｓ９ニッカーゼを含む、核酸、並びに（ｂ）鋳型ＲＮＡ、ＤＮＡ、又は同じ鎖中にリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチド残基の両方を有するハイブリッドであって、（ｉ）標的遺伝子の第１の部分の第１の部分に相補的なｇＲＮＡスペーサー、（ｉｉ）ポリペプチドに結合するｇＲＮＡスカフォールド、（ｉｉｉ）遺伝子を組み換えるための突然変異領域を含む異種目的配列、及び（ｉｖ）鋳型ＲＮＡの３’末端において標的ＤＮＡ鎖に対して１００％の相同性の少なくとも３、４、５、６、７、又は８つの塩基を含むプライマー結合部位（ＰＢＳ）配列を含む、鋳型ＲＮＡ、ＤＮＡ、又はハイブリッドを含む、システムに関する。
【００３９】
ｇＲＮＡスペーサーは、鋳型ＲＮＡの５’末端において標的ＤＮＡに対して１００％の相同性の少なくとも１５の塩基を含み得る。鋳型ＲＮＡは、標的ＤＮＡ鎖に対して少なくとも８０％の相同性の少なくとも５つの塩基を含むＰＢＳ配列を更に含み得る。鋳型ＲＮＡは、１つ又は複数の化学修飾を含み得る。
【００４０】
遺伝子組換えポリペプチドのドメインは、ペプチドリンカーによって結合され得る。ポリペプチドは、１つ又は複数のペプチドリンカーを含み得る。遺伝子組換えポリペプチドは、核局在化シグナルを更に含み得る。ポリペプチドは、２つ以上の核局在化シグナル、例えば、複数の隣接する核局在化シグナル又はポリペプチドの異なる領域における１つ又は複数の核局在化シグナル、例えば、ポリペプチドのＮ末端における１つ又は複数の核局在化シグナル及びポリペプチドのＣ末端における１つ又は複数の核局在化シグナルを含み得る。遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸は、１つ又は複数のインテインドメインをコードし得る。
【００４１】
標的細胞へのシステムの導入は、外因性ＤＮＡの少なくとも１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、５００、又は１０００塩基対の挿入をもたらし得る。標的細胞へのシステムの導入は、欠失をもたらし得、ここで、欠失は、挿入の上流又は下流のゲノムＤＮＡの２、３、４、５、１０、５０又は１００塩基対未満である。標的細胞へのシステムの導入は、置換、例えば１、２又は３つのヌクレオチド、例えば連続したヌクレオチドの置換をもたらし得る。
【００４２】
異種目的配列は、少なくとも５、１０、２５、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、４００、５００、６００、又は７００塩基対であり得る。
【００４３】

一態様では、本開示は、上記のシステム及び薬学的に許容される賦形剤又は担体を含む医薬組成物に関し、ここで、薬学的に許容される賦形剤又は担体は、プラスミドベクター、ウイルスベクター、小胞、及び脂質ナノ粒子からなる群から選択される。一態様では、本開示は、上記のシステム及び複数の薬学的に許容される賦形剤又は担体を含む医薬組成物に関し、ここで、薬学的に許容される賦形剤又は担体は、プラスミドベクター、ウイルスベクター、小胞、及び脂質ナノ粒子からなる群から選択され、例えば、ここで、上記のシステムは、２つの異なる賦形剤又は担体、例えば、２つの脂質ナノ粒子、２つのウイルスベクター、又は１つの脂質ナノ粒子及び１つのウイルスベクターによって送達される。ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）であり得る。

【００４４】

一態様では、本開示は、上記のシステムを含む宿主細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞）に関する。

【００４５】

一態様では、本開示は、細胞、組織又は対象内のヒト遺伝子の突然変異を修正する方法であって、上記のシステムを、細胞、組織又は対象に投与することを含む方法に関する。システムは、インビボ、インビトロ、エクスビボ、又はインサイチュで導入され得る。（ａ）の核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込まれ得る。一部の実施形態では、（ａ）の核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込まれない。一部の実施形態では、異種目的配列は、宿主細胞ゲノム内の１つのみの標的部位において挿入される。異種目的配列は、宿主細胞ゲノム内の２つ以上の標的部位において、例えば、２つの相同染色体における同じ対応する部位又は同じ又は異なる染色体上の２つの異なる部位において挿入され得る。異種目的配列は、哺乳動物ポリペプチド、又はそのフラグメント若しくは変異体をコードし得る。システムの成分は、１、２、３、４、又はそれ以上の異なる核酸分子上で送達され得る。システムは、エレクトロポレーションによって又はプラスミドベクター、ウイルスベクター、小胞、及び脂質ナノ粒子から選択される少なくとも１つのビヒクルを使用することによって宿主細胞内に導入され得る。

【図面の簡単な説明】

【００４６】

【図１】本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを示す。左側のダイアグラムは、Ｃａｓニッカーゼドメイン（例えば、ｓｐＣａｓ９　Ｎ８６３Ａ）及びリンカーによって連結されたＰｏｌドメインを含む遺伝子組換えポリペプチドを示す。右側のダイアグラムは、５’から３’に、ｇＲＮＡスペーサー、ｇＲＮＡスカフォールド、異種目的配列、及びプライマー結合部位配列（ＰＢＳ配列）を含む鋳型核酸を示す。異種目的配列は、標的部位と比べて１つ又は複数の配列差を含む突然変異領域を含み得る。異種目的配列は、突然変異領域に隣接する、前編集相同性領域及び後編集相同性領域も含み得る。特定の理論に束縛されることは意図しないが、鋳型核酸のｇＲＮＡスペーサーが、ゲノム内の標的部位の第２鎖に結合し、鋳型核酸のｇＲＮＡスカフォールドが、遺伝子組換えポリペプチドに結合して、例えば、遺伝子組換えポリペプチドを、ゲノム内の標的部位に局在化すると考えられる。遺伝子組換えポリペプチドのＣａｓドメインが、標的部位（例えば、標的部位の第１鎖）に切れ目を入れて、例えば、ＰＢＳ配列を、標的部位の第１鎖上で改変されるべき部位に隣接する配列に結合すると考えられる。遺伝子組換えポリペプチドのＰｏｌドメインが、プライマーとしての鋳型核酸のＰＢＳ配列及び鋳型としての鋳型核酸の異種目的配列を含む相補的配列に結合された標的部位の第１鎖を使用して、例えば、異種目的配列に相補的な配列を重合させると考えられる。特定の理論に束縛されることは意図しないが、次に、ＤＮＡ重合が、前編集相同性領域、次に突然変異領域、及び次に後編集相同性領域を通して進行することにより、異種目的配列によって特定される突然変異を含むＤＮＡ鎖を生成し得ると考えられる。

【図２】ヒトＤＮＡポリメラーゼシータの例示的な切断を示すダイアグラムである。

【図３】ＨＥＫ２９３細胞（図３Ａ）及びＵ２ＯＳ細胞（図３Ｂ）における示される鋳型核酸分子についてのＣａｓ－Ｐｏｌ遺伝子組換えポリペプチドによる編集活性を示す一連

のグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００４７】
定義
「発現カセット」という用語は、本明細書で使用される場合、本発明の核酸分子の発現のために十分な核酸エレメントを含む核酸構築物を指す。
【００４８】
「ｇＲＮＡスペーサー」は、本明細書で使用される場合、標的核酸に対する相補性を有し、ｇＲＮＡスカフォールドと一緒に、Ｃａｓタンパク質を標的核酸に標的化し得る、核酸の部分を指す。
【００４９】
「ｇＲＮＡスカフォールド」は、本明細書で使用される場合、Ｃａｓタンパク質に結合し得、ｇＲＮＡスペーサーと一緒に、Ｃａｓタンパク質を標的核酸に標的化し得る、核酸の部分を指す。一部の実施形態では、ｇＲＮＡスカフォールドは、ｃｒＲＮＡ配列、テトラループ、及びｔｒａｃｒＲＮＡ配列を含む。
【００５０】
「遺伝子組換えポリペプチド」は、本明細書で使用される場合、ポリメラーゼ又はレトロウイルス逆転写酵素を含むポリペプチド、又は核酸配列（例えば、鋳型核酸上で提供される配列）を標的ＤＮＡ分子（例えば、宿主細胞内のゲノムＤＮＡ分子などの、哺乳動物宿主細胞内）に組み込むことが可能なポリメラーゼ又はレトロウイルス逆転写酵素に対する少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、宿主機構に実質的に依存せずに配列を組み込むことが可能である。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、配列を、ゲノム内のランダム位置に組み込み、一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、配列を特定の標的部位に組み込む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、集合的に、１）鋳型核酸への結合、２）標的ＤＮＡ分子への結合を促進し、３）鋳型核酸の少なくとも一部の、標的ＤＮＡへの組み込みを促進する１つ又は複数のドメインを含む。遺伝子組換えポリペプチドは、天然ポリペプチド及び例えば天然配列に対する１つ又は複数のアミノ酸置換を有するその操作された変異体の両方を含む。遺伝子組換えポリペプチドは、異種構築物も含み、例えば、ここで、上記に列挙されるドメインの１つ又は複数は、それ以外には野生型ドメインの異種融合（又は他のコンジュゲート）並びに修飾ドメインの融合によるかどうか、例えば、異種サブドメイン又は他の置換ドメインの置換又は融合によるかどうかにかかわらず、互いに異種である。本明細書に提供される方法において使用され得る、例示的な遺伝子組換えポリペプチド、及びそれらを含むシステム及びそれらを使用する方法が、例えば、レトロウイルス逆転写酵素ドメインを含む遺伝子組換えポリペプチドに関して参照により本明細書に組み込まれるＰＣＴ／ＵＳ２０２１／０２０９４８号明細書に記載される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、配列を遺伝子に組み込む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、配列を、遺伝子の外部の配列に組み込む。「遺伝子組換えシステム」は、本明細書で使用される場合、遺伝子組換えポリペプチド及び鋳型核酸を含むシステムを指す。
【００５１】
「ドメイン」という用語は、本明細書で使用される場合、生体分子の特定の機能に寄与する生体分子の構造を指す。ドメインは、生体分子の連続領域（例えば、連続配列）又は個別の非連続領域（例えば、非連続配列）を含み得る。タンパク質ドメインの例として、以下に限定されないが、エンドヌクレアーゼドメイン、ＤＮＡ結合ドメイン、ポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン、動員ドメイン、逆転写ドメインが挙げられ；核酸のドメインの例は、調節ドメイン、例えば転写因子結合ドメインである。一部の実施形態では、ドメイン（例えば、Ｃａｓドメイン）は、２つ以上のより小さいドメイン（例えば、ＤＮＡ結合ドメイン及びエンドヌクレアーゼドメイン）を含み得る。

【００５２】
本明細書で使用されるように、用語「外性」とは、生体分子（例えば、核酸配列又はポリペプチドなど）に関して用いられる場合、生体分子が、人為的に、宿主ゲノム、細胞若しくは生物に導入されたことを意味する。例えば、組換えＤＮＡ技術又はその他の方法を用いて、既存のゲノム、細胞、組織若しくは対象に付加される核酸は、既存の核酸配列、細胞、組織若しくは対象に対して外性である。
【００５３】
本明細書中で用いられる、標的ＤＮＡの個々のＤＮＡ鎖を説明するのに用いられる「第１の鎖」及び「第２の鎖」は、２つのＤＮＡ鎖を識別し、これらの鎖に基づいて、Ｐｏｌドメインは、例えば標的プライムド合成が開始する場所に基づいて、重合を開始する。第１の鎖は、標的ＤＮＡの鎖を指し、この上で、Ｐｏｌドメインが重合を開始する、例えば、標的プライムド合成が開始される。第２の鎖は、標的ＤＮＡの他方の鎖を指す。名称第１の鎖及び第２の鎖は、その他の点では標的部位ＤＮＡ鎖を説明しない；例えば、一部の実施形態において、第１の鎖及び第２の鎖は、本明細書中に記載されるポリペプチドによってニックが入れられるが、名称「第１の」及び「第２の」鎖は、そのようなニックが出現する順序とは無関係である。
【００５４】
「ゲノムセーフハーバー部位」（ＧＳＨ部位）は、例えば、挿入された遺伝因子が、宿主細胞若しくは生物にリスクをもたらす宿主ゲノムの有意な改変を引き起こさないように、新たな遺伝物質の組込みを収容することができる宿主ゲノム内の部位である。ＧＳＨ部位は、概して、以下の基準の１、２、３、４、５、６、７、８若しくは９を満たす：（ｉ）癌関連遺伝子から＞３００ｋｂに位置する；（ｉｉ）ｍｉＲＮＡ／その他の機能性低分子ＲＮＡから＞３００ｋｂに位置する；（ｉｉｉ）５’遺伝子末端から＞５０ｋｂに位置する；（ｉｖ）複製起点から＞５０ｋｂに位置する；（ｖ）超保存エレメントから＞５０ｋｂ離れている；（ｖｉ）低転写活性を有する（すなわちｍＲＮＡ＋／－２５ｋｂがない）；（ｖｉｉ）コピー数可変領域内ではない；（ｖｉｉｉ）オープンクロマチン内である；及び／又は（ｉｘ）ヒトゲノム内に１コピーを有し、ユニークである。これらの基準のいくつか又は全部を満たすヒトゲノム内のＧＳＨ部位の例として、以下のものが挙げられる：（ｉ）アデノウイルス部位１（ＡＡＶＳ１）、１９番染色体上のＡＡＶウイルスの天然に存在する組込み部位；（ｉｉ）ケモカイン（Ｃ－Ｃモチーフ）受容体５（ＣＣＲ５）遺伝子、ＨＩＶ－１共受容体として知られるケモカイン受容体遺伝子；（ｉｉｉ）マウスＲｏｓａ２６遺伝子座のヒトオーソログ；（ｉｖ）リボソームＤＮＡ（「ｒＤＮＡ」）遺伝子座。更に別のＧＳＨ部位が知られており、例えば、Ｐｅｌｌｅｎｚ ｅｔ ａｌ．ｅｐｕｂ Ａｕｇｕｓｔ ２０，２０１８（ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／３９６３９０）に記載されている。
【００５５】
用語「異種」は、第２の要素に関して第１の要素を表すために使用されるとき、第１の要素と第２の要素が、記載されるような配置で天然に存在しないことを意味する。例えば、異種ポリペプチド、核酸分子、構築物若しくは配列は、（ａ）それが発現される細胞に対してネイティブではないポリペプチド、核酸分子、又はポリペプチド若しくは核酸分子配列の部分、（ｂ）その天然の状態に対して改変若しくは突然変異したポリペプチド若しくは核酸分子又はポリペプチド若しくは核酸分子の部分、又は（ｃ）類似の条件下でのネイティブ発現レベルと比較して改変された発現を有するポリペプチド又は核酸分子を指す。例えば、異種調節配列（例えば、プロモータ、エンハンサー）を用いて、遺伝子又は核酸分子が天然に通常発現されるものと異なる様式で遺伝子又は核酸分子の発現を調節することができる。別の例において、ポリペプチドの異種ドメイン、又は核酸配列（例えば、ポリペプチドのＤＮＡ結合ドメイン、又はポリペプチドのＤＮＡ結合ドメインをコードする核酸）は、他のドメインと比較して配置され得るか、或いはポリペプチドの他のドメイン若しくは一部又はそのコード核酸と比較して異なる配列又は異なる供給源由来であり得る。特定の実施形態では、異種核酸分子は、天然の宿主細胞ゲノム内に存在し得るが、改

変された発現レベル若しくは異なる配列を有するか、又はその両方であり得る。他の実施形態では、異種核酸分子は、宿主細胞又は宿主ゲノムに内在性でなくてもよいが、代わりに形質転換（例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション）により宿主細胞に導入され得、ここで、付加される分子は、宿主ゲノムに組み込まれ得るか、又は一過性（例えば、ｍＲＮＡ）若しくは２世代以上にわたって半安定的（例えば、エピソームウイルスベクター、プラスミド若しくは他の自己複製ベクター）のいずれかで染色体外遺伝材料として存在することができる。

【００５６】

本明細書で使用される場合、標的部位への配列の「挿入」は、標的部位におけるＤＮＡ配列の正味の付加を指し、例えば、ここで、非編集標的部位におけるコグネイト位置を有さない異種目的配列における新たなヌクレオチドがある。一部の実施形態では、標的核酸配列に対するＰＢＳ配列及び異種目的配列のヌクレオチドアラインメントが、標的核酸配列におけるアラインメントギャップをもたらすであろう。

【００５７】

本明細書で使用される場合、標的部位における異種目的配列によって生成される「欠失」は、標的部位におけるＤＮＡ配列の正味の欠失を指し、例えば、ここで、異種目的配列におけるコグネイト位置を有さない非編集標的部位におけるヌクレオチドがある。一部の実施形態では、標的核酸配列に対するＰＢＳ配列及び異種目的配列のヌクレオチドアラインメントが、ＰＢＳ配列及び異種目的配列を含む分子におけるアラインメントギャップをもたらすであろう。

【００５８】

本明細書中で用いられる用語「逆位末端反復」又は「ＩＴＲ」は、その対称性のためそう命名されたＡＡＶウイルスシスエレメントを指す。そのエレメントは、ＡＡＶゲノムの有効な増加を促進する。ＩＴＲ機能のための最小エレメントは、Ｒｅｐ結合部位（ＲＢＳ；ＡＡＶ２のための５’－ＧＣＧＣＧＣＴＣＧＣＴＣＧＣＴＣ－３（配列番号４４２４）及び末端分離部位（ＴＲＳ；ＡＡＶ２のための５’－ＡＧＴＴＧＧ－３’）並びにヘアピン形成を可能にする可変的な回文配列であると仮定される。本発明に従えば、ＩＴＲは、少なくともこれらの３つのエレメント（ＲＢＳ、ＴＲＳ、及びヘアピンの形成を可能にする配列）を含む。加えて、本発明において、用語「ＩＴＲ」は、知られている天然のＡＡＶ血清型のＩＴＲ（例えば血清型１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、又は１１ＡＡＶのＩＴＲ）を、異なる血清型に由来するＩＴＲエレメントの融合によって形成されるキメラＩＴＲを、そしてその機能的バリアントを指す。「機能的バリアント」は、知られているＩＴＲと、少なくとも８０％、８５％、９０％の、好ましくは少なくとも９５％の配列同一性を示し、且つＲｅｐタンパク質の存在下で前記ＩＴＲを含む配列の増加を可能にする配列を指す。

【００５９】

「突然変異領域」という用語は、本明細書で使用される場合、標的核酸中の対応する配列と比べて、１つ又は複数の配列差を有する鋳型核酸中の領域を指す。配列差は、例えば、置換、挿入、フレームシフト、又は欠失を含み得る。

【００６０】

用語「（突然）変異型」は、核酸配列に適用されるとき、核酸配列内のヌクレオチドが、参照（例えば、天然）核酸配列に比して、挿入、欠失若しくは変更されていることを意味する。単一の改変が１遺伝子座で為される（点変異）、又は単一遺伝子座で複数のヌクレオチドが挿入、欠失若しくは変更される場合もある。加えて、１核酸配列内の任意の数の遺伝子座で、１つ若しくは複数の改変が為される場合もある。核酸配列は、当技術分野で公知の任意の方法によって突然変異させることができる。

【００６１】

「核酸分子」は、ＲＮＡ及びＤＮＡ分子の両方を指し、限定しないが、相補的ＤＮＡ（「ｃＤＮＡ」）、ゲノムＤＮＡ（「ｇＤＮＡ」）及びメッセンジャーＲＮＡ（「ｍＲＮＡ」）が挙げられ、本明細書に記載される通り、ＲＮＡ鋳型のように、化学的に合成される

又は組換えにより生成されるものなどの合成核酸分子も含む。核酸分子は、二本鎖又は一本鎖、環状若しくは線状であり得る。一本鎖の場合、核酸分子は、センス鎖又はアンチセンス鎖であり得る。別に記載のない限り、また一般フォーマット「配列番号」として本明細書に記載される全ての配列の例として、「配列番号１」を含む核酸は、少なくともその一部が、（ｉ）配列番号１の配列、又は（ｉｉ）配列番号１と相補的な配列のどちらかを有する核酸を指す。２つのどちらを選択するかは、配列番号１が使用される状況によって決定される。例えば、核酸がプローブとして使用される場合、２つの間の選択は、プローブが、所望の標的と相補的であるという要件によって決定される。本開示の核酸配列は、当業者に容易に理解されるように、化学的若しくは生化学的に修飾され得るか、又は非天然若しくは誘導体化ヌクレオチド塩基を含有し得る。こうした修飾として、例えば、標識、メチル化、類似体による１つ若しくは複数の自然発生的なヌクレオチドの置換、無電荷結合（例えば、メチルホスホン酸、リン酸トリエステル、ホスホロアミダート、カルバミン酸塩など）、電荷結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）などのヌクレオチド間修飾、ペンダント部分、（例えば、ポリペプチド）、挿入剤（例えば、アクリジン、ソラレンなど）、キレート剤、アルキル化剤、及び修飾結合（例えば、α－アノマー核酸など）が挙げられる。化学修飾塩基（例えば、下記の表９を参照）、バックボーン（例えば、下記の表１０を参照）、及び修飾キャップ（例えば、下記の表１１を参照）も含まれる。水素結合及びその他の化学的相互作用により指定配列と結合する能力についてポリヌクレオチドを模倣する合成分子も含まれる。こうした分子は、当技術分野において公知であり、例えば、分子の骨格中のリン酸結合の代わりにペプチド結合を使用するもの、例えばペプチド核酸（ＰＮＡ）がある。他の修飾として、例えば、リボース環が、架橋部分又は「ロックド」核酸（ＬＮＡ）に見いだされる修飾などの他の構造を含む類似体を挙げることができる。種々の実施形態において、核酸は、追加の遺伝的エレメント、例えば、組織特異的発現－制御配列（例えば、組織特異的プロモータ及び組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列）並びに追加のエレメント、例えば逆位反復（例えば逆位末端反復、例えば、ウイルスに由来するエレメント（例えばＡＡＶ　ＩＴＲ））及びタンデム反復、逆位反復／直接反復、相同領域（標的ＤＮＡに対する相同性の程度が異なるセグメント）、非翻訳領域（ＵＴＲ）（５’、３’、又は５’と３’両方のＵＴＲ）並びに前述のものの種々の組合せと作用関連している。本発明によって提供されるシステムの核酸エレメントは、一本鎖、二本鎖の、環状、直鎖状、オープンエンドの直鎖状、クローズドエンドの直鎖状、及びこれらの特定のバージョン、例えばｄｏｇｇｙｂｏｎｅ　ＤＮＡ（ｄｂＤＮＡ）、クローズドエンドのＤＮＡ（ｃｅＤＮＡ）が挙げられる種々のトポロジーで提供され得る。

【００６２】

本明細書で使用される場合、「遺伝子発現単位」は、少なくとも１つのエフェクター配列に作動可能に連結された少なくとも１つの調節核酸配列を含む核酸配列である。第１の核酸配列は、第１の核酸配列が、第２の核酸配列と機能的に関連して配置されるとき、第２の核酸配列と作動可能に連結している。例えば、プロモータ又はエンハンサーは、プロモータ又はエンハンサーが、コード配列の転写若しくは発現に影響を及ぼす場合、コード配列と作動可能に連結している。作動可能に連結したＤＮＡ配列は、連続的又は非連続であり得る。２つのタンパク質コード領域を連結する必要がある場合、作動可能に連結した配列が同じリーディングフレーム内に存在し得る。

【００６３】

「宿主ゲノム」又は「宿主細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、タンパク質及び／又は遺伝材料が導入された細胞及び／又はそのゲノムを指す。こうした用語は、特定の対象細胞及び／又はゲノムだけではなく、そのような細胞の子孫及び／又はそのような細胞の子孫のゲノムも指す。特定の修飾は、突然変異又は環境の影響により後の世代に起こり得ることから、こうした子孫は、実際、親細胞と同一ではない場合もあるが、やはり本明細書で使用される用語「宿主細胞」の範囲に含まれることを理解されたい。宿主ゲノム又は宿主細胞は、単離された細胞若しくは培養で増殖した細胞株又はそうした細胞

若しくは細胞株から単離されたゲノム物質であり得るか、或いは生体組織若しくは生物を構成する宿主細胞又は宿主ゲノムであり得る。いくつかの事例では、宿主細胞は、例えば、本明細書で記載されるように、動物細胞又は植物細胞であり得る。特定の例では、宿主細胞は、哺乳動物細胞、ヒト細胞、鳥類細胞、爬虫類細胞、ウシ細胞、ウマ細胞、ブタ細胞、ヤギ細胞、ヒツジ細胞、ニワトリ細胞、又はシチメンチョウ細胞であり得る。特定の例では、宿主細胞は、トウモロコシ細胞、ダイズ細胞、コムギ細胞、又はコメ細胞であり得る。

【００６４】

本明細書中で用いられる「作用関連」は、２つの核酸配列、例えば１）プロモータと、２）異種目的配列との機能的関係を説明し、そしてそのような例では、プロモータ及び異種目的配列（例えば、注目する遺伝子）は、適切な条件の下で、プロモータが異種目的配列の発現を駆動するように、向きを定められていることを意味する。例えば、プロモータと異種目的配列とを有する鋳型核酸は、例えば、（＋）又は（－）の向きの一本鎖であり得る。この鋳型中のプロモータと異種目的配列との間の「作用関連」は、鋳型核酸が特定の状態で転写されることとなるか否かに拘らず、適切な状態にある（例えば、必要とされる触媒因子及びＮＴＰその他の存在下で、（＋）の向きである）場合、正確に転写されることを意味する。作用関連は、他の組織特異的発現制御配列（例えば、エンハンサー、リプレッサ、及びマイクロＲＮＡ認識配列）、ＩＲ／ＤＲ、ＩＴＲ、ＵＴＲ、又は相同領域、及び異種目的配列、又はレトロウイルスＲＴドメインをコードする配列が挙げられる、核酸の他の対に類似して当て嵌まる。

【００６５】

「プライマー結合部位配列」又は「ＰＢＳ配列」という用語は、本明細書で使用される場合、標的核酸配列に含まれる領域に結合することが可能な、鋳型核酸の部分を指す。いくつかの事例では、ＰＢＳ配列は、標的核酸配列に含まれる領域に対して１００％の同一性を有する少なくとも３、４、５、６、７、又は８つの塩基を含む核酸配列である。一部の実施形態では、プライマー領域は、標的核酸配列に含まれる領域に対して１００％の同一性を有する少なくとも５、６、７、８つの塩基を含む。特定の理論に束縛されることを意図しないが、一部の実施形態では、鋳型核酸が、ＰＢＳ配列及び異種目的配列を含む場合、ＰＢＳ配列は、標的核酸配列に含まれる領域に結合して、Ｐｏｌドメインが、ＤＮＡ重合のためのプライマーとしてその領域を使用し、鋳型として異種目的配列を使用することを可能にする。

【００６６】

本明細書中で用いられる「ステム－ループ配列」は、自己相補性がステム－ループを形成するのに十分な、例えば、少なくとも２（例えば、３、４、５、６、７、８、９、又は１０）塩基対を含むステム、及び少なくとも３（例えば４）塩基対を有するループを有する、核酸配列（例えばＲＮＡ配列）を指す。ステムは、ミスマッチ又はバルジを含み得る。

【００６７】

本明細書中で用いられる「組織特異的発現－制御配列」は、異種目的配列を、標的組織内に組織特異的に、例えばオフターゲット組織と比較してオンターゲット組織内に優先的に含む転写産物のレベルを増減する核酸エレメントを意味する。一部の実施形態において、組織特異的発現－制御配列は、異種目的配列を、標的組織内に組織特異的に、例えばオフターゲット組織と比較してオンターゲット組織内に優先的に含む転写産物の転写、活性、又は半減期を優先的に駆動又は抑制する。例示的な組織特異的発現－制御配列は、組織特異的プロモータ、リプレッサ、エンハンサー、又はそれらの組合せ、及び組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列を含む。組織特異性は、オンターゲット（鋳型核酸の発現又は活性が所望されるか、又は容認できる組織）、及びオフターゲット（鋳型核酸の発現又は活性が所望されないか、又は容認できない組織）を指す。例えば、組織特異的プロモータは、オフターゲット組織と比較して、オンターゲット組織内で優先的に発現を駆動する。これに対し、組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列に結合するマイクロＲＮＡは、オンターゲッ

ト組織と比較して、オフターゲット組織内で優先的に発現されることにより、オフターゲット組織内での鋳型核酸の発現を引き下げる。従って、同じ組織、例えば標的組織に特有のプロモータ及びマイクロＲＮＡ認識配列は、組織内での関連配列の転写、活性、又は半減期に関して、対照的な機能を有する（発現レベルを一致させて、すなわち、オフターゲット組織内でのマイクロＲＮＡの高いレベル、及びオンターゲット組織内での低いレベルをそれぞれ促進且つ抑制する一方、プロモータは、オンターゲット組織内での高い発現、及びオフターゲット組織内での低い発現を駆動する）。

【００６８】

見出し一覧

１）導入
２）遺伝子組換えシステム
ａ）遺伝子組換えシステムのポリペプチド成分
ｉ）ライティングドメイン
ｉｉ）エンドヌクレアーゼドメイン及びＤＮＡ結合ドメイン
（１）Ｃａｓドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド
（２）ＴＡＬエフェクター及びジンクフィンガーヌクレアーゼ
ｉｉｉ）リンカー
ｉｖ）遺伝子組換えシステムのための局在化配列
ｖ）遺伝子組換えポリペプチド及びシステムの進化型変異体
ｖｉ）インテイン
ｖｉｉ）更なるドメイン
ｂ）鋳型核酸
ｉ）ｇＲＮＡスペーサー及びｇＲＮＡスカフォールド
ｉｉ）異種目的配列
ｉｉｉ）ＰＢＳ配列
ｉｖ）例示的な鋳型配列
ｃ）誘導性活性を有するｇＲＮＡ
ｄ）遺伝子組換えシステムにおける環状ＲＮＡ及びリボザイム
ｅ）標的核酸部位
ｆ）第２の鎖ニッキング
３）組成物及びシステムの作製
４）用途
ａ）治療用途
ｂ）植物への適用
５）投与及び送達
ａ）組織特異的活性／投与
ｉ）プロモータ
ｉｉ）ｍｉｃｒｏＲＮＡ
ｂ）ウイルスベクター及びその成分
ｃ）ＡＡＶ投与
ｄ）脂質ナノ粒子
６）キット、製品、及び医薬組成物
７）化学、製造、及び制御（ＣＭＣ）

【００６９】

導入

本開示は、例えば、インビボ又はインビトロで、細胞、組織若しくは対象におけるＤＮＡ配列内の１つ若しくは複数の位置で、ＤＮＡ配列をターゲティング、編集、修飾若しくは操作する（例えば、哺乳動物ゲノムの標的部位に異種目的配列を挿入する）組成物、システム及び方法に関する。異種目的ＤＮＡ配列は、例えば、置換、欠失、挿入、例えばコード配列、調節配列又は遺伝子発現単位を含み得る。

【００７０】
より具体的には、本開示は、例えば、目的の配列中に／から１つ又は複数のヌクレオチドを挿入するか、欠失させるか、又は置換することにより、目的のゲノムＤＮＡ配列を改変するための、ＤＮＡポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ベースのシステムを提供する。
【００７１】
ポリメラーゼ官能基へのＣａｓ９関連の官能基の融合を用いて、ゲノムＤＮＡに対する修飾を駆動し得る。ポリメラーゼ官能基は、例えば、核酸鋳型からＤＮＡを合成するＤＮＡポリメラーゼであり得る。核酸鋳型は、例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡであり得る。ＲＮＡ鋳型を使用し得るＤＮＡポリメラーゼ、例えば、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ、例えば、逆転写酵素の場合、遺伝子組換えポリペプチド成分には、上記のものなどの鋳型ＲＮＡが提供され得る。１つのこのような例は、ＤＮＡポリメラーゼθ（ＰＯＬＱによってコードされる、本明細書において「ＰＯＬＱ」又は「Ｐｏｌθ」と呼ばれ得るポリペプチド産物）、鋳型としてＤＮＡ又はＲＮＡのいずれかを使用することが示されている真核生物ＤＮＡポリメラーゼである。Ｃｈａｎｄｒａｍｏｕｌｙ　ｅｔ　ａｌ．２０２１（ＤＯＩ：１０．１１２６／ｓｃｉａｄｖ．ａｂｆ１７７１）。従って、（任意選択でリンカーを介して）ＰＯＬＱ（又はＰＯＬＱの構成要素）に融合されるＣａｓ９官能基は、（ｇＲＮＡスペーサーを介して）修飾に望ましいゲノム部位を標的とする鋳型ＲＮＡと共に生物又は細胞に投与されるとき、ゲノム修飾のためのドライバーとして使用され得、（ｇＲＮＡスカフォールドを介して）Ｃａｓ９官能基を動員し、（鋳型ＲＮＡを介して）ＤＮＡ合成をプライム及び鋳型化する。
【００７２】
本開示は、部分的に、遺伝子組換えポリペプチド成分及び鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）成分を含む遺伝子組換えシステムを提供する。一部の実施形態において、遺伝子組換えシステムを用いて、ゲノム内の標的部位中に改変を導入することができる。一部の実施形態において、遺伝子組換えポリペプチド成分は、ライティングドメイン（例えば逆転写酵素ドメイン）、ＤＮＡ結合ドメイン、及びエンドヌクレアーゼドメイン（例えばニッカーゼドメイン）を含む。一部の実施形態において、鋳型核酸（例えば鋳型ＲＮＡ）は、ゲノム内の標的部位に結合する（例えば、標的部位の第２の鎖に結合する）配列（例えばｇＲＮＡスペーサー）、遺伝子組換えポリペプチド成分に結合する配列（例えばｇＲＮＡスカフォールド）、異種目的配列及びＰＢＳ配列を含む。理論によって拘束されることを望むものではないが、鋳型核酸（例えば鋳型ＲＮＡ）は、ゲノム内の標的部位の第２の鎖に結合して、遺伝子組換えポリペプチド成分に結合する（例えば、ゲノム内の標的部位にポリペプチド成分を局在化させる）と考えられる。遺伝子組換えポリペプチド成分のエンドヌクレアーゼ（例えばニッカーゼ）は、標的部位（例えば、標的部位の第１の鎖）を切断して、例えば、ＰＢＳ配列が、標的部位の第１の鎖上で改変されることとなる部位に隣接する配列に結合し得ると考えられる。ポリペプチド成分のライティングドメイン（例えば、逆転写酵素ドメイン）は、プライマーとしての鋳型核酸のＰＢＳ配列及び鋳型としての鋳型核酸の異種目的配列を含む相補的配列に結合された標的部位の第１の鎖を用いて、例えば、異種目的配列に相補的な配列を重合すると考えられる。理論によって拘束されることを望むものではないが、適切な異種目的配列の選択は、標的部位での１つ以上のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は挿入をもたらし得ると考えられる。
【００７３】
遺伝子組換えシステム
一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムは、（Ａ）遺伝子組換えポリペプチド又は遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸を含み、ここで、遺伝子組換えポリペプチドは、（ｉ）逆転写酵素ドメイン、及び（ｘ）ＤＮＡ結合機能性を含むエンドヌクレアーゼドメイン又は（ｙ）エンドヌクレアーゼドメイン及び別個のＤＮＡ結合ドメインのいずれか；並びに（Ｂ）鋳型ＲＮＡを含む。遺伝子組換えポリペプチドは、一部の実施形態では、宿主機構に実質的に依存せずに、鋳型核酸配列を、標的ＤＮＡ分子（例えば、宿主細胞内のゲノムＤＮＡ分子などの、哺乳動物宿主細胞内）に組み込むこ

とが可能な実質的に自律的なタンパク質機構として働く。例えば、遺伝子組換えタンパク質は、ＤＮＡ結合ドメイン、逆転写酵素ドメイン、及びエンドヌクレアーゼドメインを含み得る。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合機能は、タンパク質をＤＮＡ配列に導くＲＮＡ成分、例えば、ｇＲＮＡスペーサーを含み得る。他の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、逆転写酵素ドメイン及びエンドヌクレアーゼドメインを含み得る。遺伝子組換えシステムのＲＮＡ鋳型エレメントは、典型的に、遺伝子組換えポリペプチドエレメントに対して異種であり、宿主ゲノム内に挿入（逆転写）される目的配列を提供する。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、標的プライミング逆転写が可能である。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、第２の鎖合成が可能である。

【００７４】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、第２のポリペプチドと組み合わされる。一部の実施形態では、第２のポリペプチドは、エンドヌクレアーゼドメインを含み得る。一部の実施形態では、第２のポリペプチドは、ポリメラーゼドメイン、例えば、逆転写酵素ドメインを含み得る。一部の実施形態では、第２のポリペプチドは、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼドメインを含み得る。一部の実施形態では、第２のポリペプチドは、例えば、第２の鎖合成又はＤＮＡ修復回復に寄与することにより、ゲノム編集の完了を補助する。

【００７５】

機能的遺伝子組換えポリペプチドは、無関係なＤＮＡ結合、逆転写、及びエンドヌクレアーゼドメインから構成され得る。このモジュラー構造は、機能ドメイン、例えば、ｄＣａｓ９（ＤＮＡ結合）、ＭＭＬＶ逆転写酵素（逆転写）、ＦｏｋＩ（エンドヌクレアーゼ）の組合せを可能にする。一部の実施形態では、複数の機能ドメインは、単一のタンパク質、例えば、Ｃａｓ９又はＣａｓ９ニッカーゼ（ＤＮＡ結合、エンドヌクレアーゼ）から起こることがある。

【００７６】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、集合的に、１）鋳型核酸への結合、２）標的ＤＮＡ分子への結合を促進し、３）鋳型核酸の少なくとも一部の、標的ＤＮＡへの組み込みを促進する１つ又は複数のドメインを含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、対応する天然配列に対する１つ又は複数のアミノ酸置換を含む改変されたポリペプチドである。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、例えば、それ以外には野生型ドメインの異種融合（又は他のコンジュゲート）並びに修飾ドメインの融合による、例えば、異種サブドメイン又は他の置換ドメインの置換又は融合による、互いに対して異種である２つ以上のドメインを含む。例えば、一部の実施形態では、ＲＴドメインが、ＤＢＤに対して異種であるか；ＤＢＤが、エンドヌクレアーゼドメインに対して異種であるか；又はＲＴドメインが、エンドヌクレアーゼドメインに対して異種であるかの１つ又は複数である。

【００７７】

一部の実施形態では、システムにおける使用のための鋳型ＲＮＡ分子は、５’から３’に、（１）ｇＲＮＡスペーサー；（２）ｇＲＮＡスカフォールド；（３）異種目的配列（４）プライマー結合部位（ＰＢＳ）配列を含む。一部の実施形態では：

（１）約１８～２２ｎｔのｇＲＮＡスペーサーであり、例えば、２０ｎｔであり、

（２）１つ又は複数のヘアピンループ、例えば、鋳型を、Ｃａｓドメイン、例えば、ニッカーゼＣａｓ９ドメインと会合するための１、２又は３つのループを含むｇＲＮＡスカフォールドである。一部の実施形態では、ｇＲＮＡスカフォールドは、５’から３’にかけて、ＧＴＴＴＴＡＧＡＧＣＴＡＧＡＡＡＴＡＧＣＡＡＧＴＴＡＡＡＡＴＡＡＧＧＣＴＡＧＴＣＣＧＴＴＡＴＣＡＡＣＴＴＧＡＡＡＡＡＧＴＧＧＧＡＣＣＧＡＧＴＣＧＧＴＣＣ（配列番号４００８）の配列を含む。

（３）一部の実施形態では、異種目的配列は、長さが、例えば、７～７４、例えば、１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、又は７０～８０ｎｔ若しくは８０～９０ｎｔである。一部の実施形態では、配列の第１の（大抵５’

）塩基は、Ｃでない。
（４）一部の実施形態では、ニッキングが起きた後、標的プライミング配列に結合するＰＢＳ配列は、例えば、３～２０ｎｔ、例えば、７～１５ｎｔ、例えば、１２～１４ｎｔである。一部の実施形態では、ＰＢＳ配列は、４０～６０％のＧＣ含量を有する。
【００７８】
一部の実施形態では、システムと会合される第２のｇＲＮＡは、完全な組み込みの駆動を補助し得る。一部の実施形態では、第２のｇＲＮＡは、第１の鎖ニックから０～２００ｎｔ離れた、例えば、第１の鎖ニックから０～５０、５０～１００、１００～２００ｎｔ離れた位置を標的にし得る。一部の実施形態では、第２のｇＲＮＡは、編集がなされた後、その標的配列にのみ結合することができ、例えば、ｇＲＮＡは、異種目的配列内に存在するが、初期標的配列内に存在しない配列に結合する。
【００７９】
一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを使用して、ＨＥＫ２９３、Ｋ５６２、Ｕ２ＯＳ、又はＨｅＬａ細胞に編集を実施する。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムを使用して、初代細胞、例えば、Ｅ１８．５マウスからの初代皮質ニューロンに編集を実施する。
【００８０】
一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドは、ＭｏＭＬＶ ＲＴ配列又はその変異体を含む逆転写酵素又はＲＴドメイン（例えば、本明細書に記載される）を含む。複数の実施形態では、ＭｏＭＬＶ ＲＴ配列は、Ｄ２００Ｎ、Ｌ６０３Ｗ、Ｔ３３０Ｐ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｄ５２４Ｇ、Ｅ５６２Ｑ、Ｄ５８３Ｎ、Ｐ５１Ｌ、Ｓ６７Ｒ、Ｅ６７Ｋ、Ｔ１９７Ａ、Ｈ２０４Ｒ、Ｅ３０２Ｋ、Ｆ３０９Ｎ、Ｌ４３５Ｇ、Ｎ４５４Ｋ、Ｈ５９４Ｑ、Ｄ６５３Ｎ、Ｒ１１０Ｓ、及びＫ１０３Ｌから選択される１つ又は複数の突然変異を含む。複数の実施形態では、ＭｏＭＬＶ ＲＴ配列は、任意選択で、Ｔ３０６Ｋ及び／又はＷ３１３Ｆを更に含む、Ｄ２００Ｎ、Ｌ６０３Ｗ、及びＴ３３０Ｐなどの突然変異の組合せを含む。
【００８１】
一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン（例えば、本明細書に記載される）は、例えば、Ｈ８４０Ａ突然変異を含む、ｎＣＡＳ９を含む。
【００８２】
一部の実施形態では、（例えば、本明細書に記載されるシステムの）異種目的配列は、約１～５０、５０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、又はそれ以上のヌクレオチド長である。
【００８３】
一部の実施形態では、ＲＴ及びエンドヌクレアーゼドメインは、例えば、アミノ酸配列ＳＧＧＳＳＧＧＳＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳＳＧＧＳＳＧＧＳＳ（配列番号４００６）を含む、フレキシブルリンカーによって連結される。
【００８４】
一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ＲＴドメインに対するＮ末端である。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ＲＴドメインに対するＣ末端である。
【００８５】
一部の実施形態では、システムは、例えば、本明細書に記載のように、ＴＰＲＴによって異種目的配列を標的部位に組み込む。
【００８６】
一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＤＮＡ結合ドメインを含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＲＮＡ結合ドメインを含む。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、Ｂ－ボックスタンパク質のＲＮＡ結合ドメイン、ＭＳ２コートタンパク質、ｄＣａｓ、又は本明細書中の表の配列のエレメントを含む。一部の

実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、標準ＲＮＡ結合ドメインより高い親和性で鋳型ＲＮＡに結合することができる。

【００８７】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５若しくは１００ヌクレオチド（及び任意選択で５００以下、４００、３００、２００、又は１００ヌクレオチド）の標的部位に挿入を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５若しくは１００ヌクレオチド（及び任意選択で５００、４００、３００、２００若しくは１００ヌクレオチド以下）の標的部位に挿入を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５又は１０キロベース（及び任意選択で１、５、１０又は２０キロベース以下）の標的部位に挿入を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも８１、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０若しくは２００ヌクレオチド（及び任意選択で５００、４００、３００若しくは２００ヌクレオチド以下）の欠失を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも８１、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０若しくは２００ヌクレオチド（及び任意選択で５００、４００、３００若しくは２００ヌクレオチド以下）の欠失を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０若しくは２００ヌクレオチド（及び任意選択で５００、４００、３００若しくは２００ヌクレオチド以下）の欠失を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５若しくは１０キロベース（及び任意選択で１、５、１０若しくは２０キロベース以下）の欠失を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０若しくは１００又はそれ以上のヌクレオチドの標的部位に置換を生成することができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、１～２、２～３、３～４、４～５、５～１０、１０～１５、１５～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０若しくは９０～１００ヌクレオチドの標的部位に置換を生成することができる。

【００８８】

一部の実施形態では、置換は、塩基転位型突然変異である。一部の実施形態では、置換は、トランスバージョン突然変異である。一部の実施形態では、置換は、アデニンをチミンに、アデニンをグアニンに、アデニンをシトシンに、グアニンをチミンに、グアニンをシトシンに、グアニンをアデニンに、チミンをシトシンに、チミンをアデニンに、チミンをグアニンに、シトシンをアデニンに、シトシンをグアニンに、又はシトシンをチミンに変換する。

【００８９】

一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、遺伝子の発現（例えば、転写又は翻訳）を増加又は減少させる。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、プロモータ又はエンハンサー内の配列、例えば転写因子に結合する配列を改変し、付加し、又は欠失させることにより、遺伝子の発現（例えば、転写又は翻

訳）を増加又は減少させる。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、遺伝子の翻訳を改変し（例えば、アミノ酸配列を改変し）、開始若しくは停止コドンを挿入するか若しくは欠失させ、遺伝子の翻訳フレームを改変若しくは修復する。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、例えば、スプライスアクセプター又はドナー部位を挿入し、欠失させ、又は改変することにより、遺伝子のスプライシングを改変する。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、転写物又はタンパク質の半減期を改変する。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、細胞におけるタンパク質局在化を改変する（例えば、細胞質からミトコンドリアにかけて、細胞質から細胞外空間内へ（例えば、分泌タグを付加する））。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、タンパク質フォールディングを改変する（例えば、改善する）（例えば、ミスフォールドタンパク質の蓄積を阻止するため）。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、遺伝子、例えば、遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を改変し、増加させ、減少させる。

【００９０】

例示的な遺伝子組換えポリペプチド、及びそれらを含むシステム及びそれらを使用する方法が、例えば、アミノ酸及びその中の核酸配列を含め、レトロウイルスＲＴドメインに関して参照により本明細書に組み込まれるＰＣＴ／ＵＳ２０２１／０２０９４８号明細書に記載される。

【００９１】

例示的な遺伝子組換えポリペプチド及びレトロウイルスＲＴドメイン配列は、例えば、２０２１年３月４日に出願された国際特許出願番号ＰＣＴ／ＵＳ２１／２０９４８号明細書、例えばその中の表３０、表３１及び表４４にも記載され；この出願全体が例えば前記配列及び表中のレトロウイルスＲＴに関して参照により本明細書に組み込まれる。従って、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドは、この段落に記載された表のいずれかに従うアミノ酸配列又はそのドメイン（例えば、レトロウイルスＲＴドメイン）、又は上記のいずれかのその機能的フラグメント若しくはバリアント、又はそれと少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【００９２】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステムのいずれかにおける使用のためのポリペプチドは、複数の相同タンパク質の整列されたポリペプチド配列に基づく、分子再構築体又は祖先再構築体であり得る。一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステムのいずれかにおける使用のための逆転写酵素ドメインは、分子再構築体若しくは祖先再構築体であり得、又は同じ又は異なる源からの逆転写酵素ドメインのアラインメントに基づいて、特定の残基において修飾され得る。当業者は、本明細書に提供される受入番号に基づき、例えば、保存ドメイン分析のためのＢａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ（ＢＬＡＳＴ）又はＣＤ－Ｓｅａｒｃｈのような常用の配列分析ツールを使用することにより、ポリペプチド又は核酸配列を整列させることができる。分子再構築体は、配列コンセンサスに基づき、例えば、Ｉｖｉｃｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １９９７，５０１－５１０；Ｗａｇｓｔａｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ２０１３，８８－９９に記載の手法を用いて作製され得る。

【００９３】

遺伝子組換えシステムのポリペプチド成分

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＤＮＡ標的部位結合、鋳型核酸（例えば、ＲＮＡ）結合、ＤＮＡ標的部位切断、及び鋳型核酸（例えば、ＲＮＡ）ライティング、例えば、逆転写の機能を有する。一部の実施形態では、各機能は、異なるドメイン内に含まれる。一部の実施形態では、機能は、２つ以上のドメインに起因し得る（例えば、２つ以上のドメインは、一緒に機能性を示す）。一部の実施形態では、２つ以上のドメ

インは、同一又は類似機能を有し得る（例えば、２つ以上のドメインは、それぞれ独立して、例えば、２つの異なるＤＮＡ配列において、ＤＮＡ結合機能性を有する）。他の実施形態では、１つ又は複数のドメインは、１つ又は複数の機能を実行可能であり、例えば、Ｃａｓ９ドメインは、ＤＮＡ結合及び標的部位切断の両方を実行可能であり得る。一部の実施形態では、ドメインは全て、単一のポリペプチド内部に位置する。一部の実施形態では、第１ドメインは、第１ポリペプチド中に存在し、第２ドメインは、第２ポリペプチド中に存在する。例えば、一部の実施形態では、配列は、第１ポリペプチドと第２ポリペプチドとの間で分割され得、例えば、第１ポリペプチドは、逆転写酵素（ＲＴ）ドメインを含み、且つ第２ポリペプチドは、ＤＮＡ結合ドメイン及びエンドヌクレアーゼドメイン、例えばニッカーゼドメインを含む。更なる例として、一部の実施形態では、第１ポリペプチド及び第２ポリペプチドのそれぞれは、ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、第１ＤＮＡ結合ドメイン及び第２ＤＮＡ結合ドメイン）を含む。一部の実施形態では、第１及び第２のポリペプチドは、翻訳後、スプリットインテインを介して結合されて、単一の遺伝子組換えポリペプチドを形成し得る。

【００９４】

いくつかの態様では、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドは、（例えば、本明細書に記載されるシステムは、以下を含む遺伝子組換えポリペプチドを含む）：１）Ｃａｓドメイン（例えば、Ｃａｓニッカーゼドメイン、例えばＣａｓ９ニッカーゼドメイン）；２）表Ｄの逆転写酵素（ＲＴ）ドメイン又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列であって、ＲＴドメインが、ＣａｓドメインのＣ末端である、逆転写酵素（ＲＴ）ドメイン；及びＲＴドメインとＣａｓドメインとの間に配置されるリンカーであって、表ＤのＲＴドメインと同じ行からの配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を有する、リンカーを含む。

【００９５】

一部の実施形態では、ＲＴドメインは、表ＤのＲＴドメインとの１００％の同一性を有する配列を有し、リンカーは、表ＤのＲＴドメインと同じ行からのリンカー配列との１００％の同一性を有する配列を有する。一部の実施形態では、Ｃａｓドメインは、表４の配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、配列表中の配列番号１～３３３２のいずれかに従うアミノ酸配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を含む。

【００９６】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、Ｃａｓドメインとリンカーとの間のＧＧアミノ酸配列、ＲＴドメインと第２のＮＬＳとの間のＡＧアミノ酸配列、及び／又はリンカーとＲＴドメインとの間のＧＧアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、第１のＮＬＳ及びＣａｓドメインを含む配列番号４０００の配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、第２のＮＬＳを含む配列番号４００１の配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を含む。

例示的なＮ末端ＮＬＳ－Ｃａｓ９ドメイン

【化１】

MPAAKRVKLDGGDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF
DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHP
IFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV
DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS
LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVN
TEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFY
KFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNR
EKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKN
LPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLK
EDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDR
EMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNF
MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPE
NIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRD
MYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKARGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQ
LLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKL
IREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDY
KVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKG
RDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAY
SVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFE
LENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEI
IEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDR
KRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGG(配列番号: 4000)

例示的なＣ末端配列

ＡＧＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＡＫＶＥ（配列番号４００１）

【００９７】

ライティングドメイン

本発明の特定の態様では、遺伝子組換えシステムのライティングドメインは、ポリメラーゼ官能基を用いて、ゲノムＤＮＡに対する修飾を駆動する。ポリメラーゼ官能基は、例えば、核酸鋳型からＤＮＡを合成するＤＮＡポリメラーゼであり得る。核酸鋳型は、例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡであり得る。ＲＮＡ鋳型を使用し得るＤＮＡポリメラーゼ、例えば、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ、例えば、逆転写酵素の場合、遺伝子組換えポリペプチド成分には、上記のものなどの鋳型ＲＮＡが提供され得る。１つのこのような例は、ＤＮＡポリメラーゼθ（ＰＯＬＱによってコードされる、本明細書において「ＰＯＬＱ」又は「Ｐｏｌθ」と呼ばれ得るポリペプチド産物））、鋳型としてＤＮＡ又はＲＮＡのいずれかを使用することが示されている真核生物ＤＮＡポリメラーゼである。Ｃｈａｎｄｒａｍｏｕｌｙ　ｅｔ　ａｌ．２０２１（ＤＯＩ：１０．１１２６／ｓｃｉａｄｖ．ａｂｆ１７７１）。従って、（任意選択でリンカーを介して）ＰＯＬＱ（又はＰＯＬＱの構成要素）に融合されるＣａｓ９官能基は、（ｇＲＮＡスペーサーを介して）修飾に望ましいゲノム部位を標的とする鋳型ＲＮＡと共に生物又は細胞に投与されるとき、ゲノム修飾のためのドライバーとして使用され得、（ｇＲＮＡスカフォールドを介して）Ｃａｓ９官能基を動員し、（鋳型ＲＮＡを介して）ＤＮＡ合成をプライム及び鋳型化する。

【００９８】

鋳型としてＤＮＡを使用するＤＮＡポリメラーゼは、ゲノム修飾を行うためにＣａｓ９官能基と一緒にも融合に組み込まれ得る。この場合、鋳型核酸は、共有結合又はリンカーによって互いに末端間で結合される、ｓｇＲＮＡ及びＤＮＡ鋳型の融合である。ｐｏｌθ（又はその構成要素）も、ＤＮＡ鋳型からＤＮＡを合成し得るため、このように機能し得る。本明細書に記載されるように、鋳型ＲＮＡに言及する実施形態は、リボヌクレオチドを含む鋳型核酸、又はリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドを含む鋳型核酸（例えば、１つ又は複数のＤＮＡ領域に結合された１つ又は複数のＲＮＡ領域を含む鋳型ＲＮＡ）を含み得ることが理解される。一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドは、表１に従うアミノ酸配列又はそれと少なくとも７０％、８０％、

８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を有するポリメラーゼドメインを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸は、表１に従うアミノ酸配列又はそれと少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を有するポリメラーゼドメインをコードする。

【００９９】

本明細書に記載されるように、逆転写酵素又は逆転写酵素ドメインに言及する実施形態は、表１に列挙されるポリメラーゼを含み得ることが理解される。

【０１００】

【表１－１】

表1: ゲノム改変ポリペプチドにおける使用のための例示的なポリメラーゼ。

行	Pol	配列	長さ	配列番号
1	イータ(η)	MATGQDRVVALVDMDCFFVQVEQRQNPHLRNKPCAVVQYKSWKGGGIIAVSYEARAFGVTRSMWADDAKKLCPDLLLAQVRESRGKANLTKYREASVEVMEIMSRFAVIERASIDEAYVDLTSAVQERLQKLQGQPISADLLPSTYIEGLPQGPTTAEETVQKEGMRKQGLFQWLDSLQIDNLTSPDLQLTVGAVIVEEMRAAIERETGFQCSAGISHNKVLAKLACGLNKPNRQTLVSHGSVPQLFSQMPIRKIRSLGGKLGASVIEILGIEYMGELTQFTESQLQSHFGEKNGSWLYAMCRGIEHDPVKPRQLPKTIGCSKNFPGKTALATREQVQWWLLQLAQELEERLTKDRNDNDRVATQLVVSIRVQGDKRLSSLRRCCALTRYDAHKMSHDAFTVIKNCNTSGIQTEWSPPLTMLFLCATKFSASAPSSSTDITSFLSSDPSSLPKVPVTSSEAKTQGSGPAVTATKKATTSLESFFQKAAERQKVKEASLSSLTAPTQAPMSNSPSKPSLPFQTSQSTGTEPFFKQKSLLLKQKQLNNSSVSSPQQNPWSNCKALPNSLPTEYPGCVPVCEGVSKLEESSKATPAEMDLAHNSQSMHASSASKSVLEVTQKATPNPSLLAAEDQVPCEKCGSLVPVWDMPEHMDYHFALELQKSFLQPHSSNPQVVSAVSHQGKRNPKSPLACTNKRPRPEGMQTLESFFKPLTH	713	4425
2	イオタ(ι)	MEKLGVEPEEEGGGDDDEEDAEAWAMELADVGAAASSQGVHDQVLPTPNASSRVIVHVDLDCFYAQVEMISNPELKDKPLGVQQKYLVVTCNYEARKLGVKKLMNVRDAKEKCPQLVLVNGEDLTRYREMSYKVTELLEEFSPVVERLGFDENFVDLTEMVEKRLQQLQSDELSAVTVSGHVYNNQSINLLDVLHIRLLVGSQIAAEMREAMYNQLGLTGCAGVASNKLLAKLVSGVFKPNQQTVLLPESCQHLIHSLNHIKEIPGIGYKTAKCLEALGINSVRDLQTFSPKILEKELGISVAQRIQKLSFGEDNSPVILSGPPQSFSEEDSFKKCSSEVEAKNKIEELLASLLNRVCQDGRKPHTVRLIIRRYSSEKHYGRESRQCPIPSHVIQKLGTGNYDVMTPMVDILMKLFRNMVNVKMPFHLTLLSVCFCNLKALNTAKKGLIDYYLMPSLSTTSRSGKHSFKMKDTHMEDFPKDKETNRDFLPSGRIESTRTRESPLDTTNFSKEKDINEFPLCSLPEGVDQEVFKQLPVDIQEEILSGKSREKFQGKGSVSCPLHASRGVLSFFSKKQMQDIPINPRDHLSSSKQVSSVSPCEPGTSGFNSSSSSYMSSQKDYSYYLDNRLKDERISQGPKEPQGFHFTNSNPAVSAFHSFPNLQSEQLFSRNHTTDSHKQTVATDSHEGLTENREPDSVDEKITFPSDIDPQVFYELPEAVQKELLAEWKRAGSDFHIGHK	740	4426
3	カッパ(κ)	MDSTKEKCDSYKDDLLLRMGLNDNKAGMEGLDKEKINKIIMEATKGSRFYGNELKKEKQVNQRIENMMQQKAQITSQQLRKAQLQVDRFAMELEQSRNLSNTIVHIDMDAFYAAVEMRDNPELKDKPIAVGSMSMLSTSNYHARRFGVRAAMPGFIAKRLCPQLIIVPPNFDKYRAVSKEVKEILADYDPNFMAMSLDEAYLNITKHLEERQNWPEDKRRYFIKMGSSVENDNPGKEVNKLSEHERSISPLLFEESPSDVQPPGDPFQVNFEEQNNPQILQNSVVFGTSAQEVVKEIRFRIEQKTTLTASAGIAPNTMLAKVCSDKNKPNGQYQILPNRQAVMDFIKDLPIRKVSGIGKVTEKMLKALGIITCTELYQQRALLSLLFSETSWHYFLHISLGLGSTHLTRDGERKSMSVERTFSEINKAEEQYSLCQELCSELAQDLQKERLKGRTVTIKLKNVNFEVKTRASTVSSVVSTAEEIFAIAKELLKTEIDADFPHPLRLRLMGVRISSFPNEEDRKHQQRSIIGFLQAGNQALSATECTLEKTDKDKFVKPLEMSHKKSFFDKKRSERKWSHQDTFKCEAVNKQSFQTSQPFQVLKKKMNENLE	870	4427

【０１０１】

【表１－２】

行	Pol	配列	長さ	配列番号
		ISENSDDCQILTCPVCFRAQGCISLEALNKHVDECLDGPSISENFKMFSCSHVSATKVNKKENVPASSLCEKQDYEAHPKIKEISSVD CIALVDTIDNSSKAESIDALSNKHSKEECSSLPSKSFNIEHCHQNSSSTVSLENEDVGSFRQEYRQPYLCEVKTGQALVCPVCNVEQ KTSDLTLFNVHVDVCLNKSFIQELRKDKFNPVNQPKESSRSTGSSSGVQKAVTRTKRPGLMTKYSTSKKIKPNNPKHTLDIFFK		
4	REV1	MRRGGWRKRAENDGWETWGGYMAAKVQKLEEQFRSDAAMQKDGTSSTIFSGVAIYVNGYTDPSAEELRKLMMLHGGQYHVYYS RSKTTHIIATNLPNAKIKELKGEKVIRPEWIVESIKAGRLLSYIPYQLYTKQSSVQKGLSFNPVCRPEDPLPGPSNIAKQLNNRVNHIVK KIETENEVKVNGMNSWNEEDENNDFSFVDLEQTSPGRKQNGIPHPRGSTAIFNGHTPSSNGALKTQDCLVPMVNSVASRLSPAFS QEEDKAEKSSTDFRDCTLQQLQQSTRNTDALRNPHRTNSFSLSPLHSNTKINGAHHSTVQGPSSTKSTSSVSTFSKAAPSVPSKPS DCNFISNFYSHSRLHHISMWKCELTEFVNTLQRQSNGIFPGREKLKKMKTGRSALVVTDTGDMSVLNSPRHQSCIMHVDMDCFFVS VGIRNRPDLKGKPVAVTSNRGTGRAPLRPGANPQLEWQYYQNKILKGKAADIPDSSLWENPDSAQANGIDSVLSRAEIASCSYEAR QLGIKNGMFFGHAKQLCPNLQAVPYDFHAYKEVAQTLYETLASYTHNIEAVSCDEALVDITEILAETKLTPDEFANAVRMEIKDQTKC AASVGIGSNILLARMATRKAKPDGQYHLKPEEVDDFIRGQLVTNLPGVGHSMESKLASLGIKTCGDLQYMTMAKLQKEFGPKTGQM LYRFCRGLDDRPVRTEKERKSVSAEINYGIRFTQPKEAEAFLLSLSEEIQRRLEATGMKGKRLTLKIMVRKPGAPVETAKFGGHGICD NIARTVTLDQATDNAKIIGKAMLNMFHTMKLNISDMRGVGIHVNQLVPTNLNPSTCPSRPSVQSSHFPSGSYSVRDVFQVQKAKKST EEEHKEVFRAAVDLEISSASRTCTFLPPFPAHLPTSPDTNKAESSGKWNGLHTPVSVQSRLNLSIEVPSPSQLDQSVLEALPPDLRE QVEQVCAVQQAESHGDKKKEPVNGCNTGILPQPVGTVLLQIPEPQESNSDAGINLIALPAFSQVDPEVFAALPAELQRELKAAYDQR QRQGENSTHQQSASASVPKNPLLHLKAAVKEKKRNKKKKTIGSPKRIQSPLNNKLLNSPAKTLPGACGSPQKLIDGFLKHEGPPAEK PLEELSASTSGVPGLSSLQSDPAGCVRPPAPNLAGAVEFNDVKTLLREWITTISDPMEEDILQVVKYCTDLIEEKDLEKLDLVIKYMKR LMQQSVESVWNMAFDFILDNVQVVLQQTYGSTLKVT	1251	4428
5	ベータ (β)	MSKRKAPQETLNGGITDMLTELANFEKNVSQAIHKYNAYRKAASVIAKYPHKIKSGAEAKKLPGVGTKIAEKIDEFLATGKLRKLEKIR QDDTSSSINFLTRVSGIGPSAARKFVDEGIKTLEDLRKNEDKLNHHQRIGLKYFGDFEKRIPREEMLQMQDIVLNEVKKVDSEYIATV CGSFRRGAESSGDMDVLLTHPSFTSESTKQPKLLHQVVEQLQKVHFITDTLSKGETKFMGVCQLPSKNDEKEYPHRRIDIRLIPKDQ YYCGVLYFTGSDIFNKNMRAHALEKGFTINEYTIRPLGVTGVAGEPLPVDSEKDIFDYIQWKYREPKDRSE	335	4429
6	ラムダ (λ)	MDPRGILKAFPKRQKIHADASSKVLAKIPRREEGEEAEEWLSSLRAHVVRTGIGRARAELFEKQIVQHGGQLCPAQGPGVTHIVVDE GMDYERALRLLRLPQLPPGAQLVKSAWLSLCLQERRLVDVAGFSIFIPSRYLDHPQPSKAEQDASIPPGTHEALLQTALSPPPPPTR PVSPPQKAKEAPNTQAQPISDDEASDGEETQVSAADLEALISGHYPTSLEGDCEPSPAPAVLDKWVCAQPSSQKATNHNLHITEKL EVLAKAYSVQGDKWRALGYAKAINALKSFHKPVTSYQEACSIPGIGKRMAEKIIEILESGHLRKLDHISESVPVLELFSNIWGAGTKTA QMWYQQGFRSLEDIRSQASLTTQQAIGLKHYSDFLERMPREEATEIEQTVQKAAQAFNSGLLCVACGSYRRGKATCGDVDVLITHP DGRSHRGIFSRLLDSLRQEGFLTDDLVSQEENGQQQKYLGVCRLPGPGRRHRRLDIIVVPYSEFACALLYFTGSAHFNRSMRALAK TKGMSLSEHALSTAVVRNTHGCKVGPGRVLPTPTEKDVFRLLGLPYREPAERDW	575	4430
7	ミュー Mu (μ) (μ)	MLPKRRRARVGSPSGDAASSTPPSTRFPGVAIYLVEPRMGRSRRAFLTGLARSKGFRVLDACSSEATHVVMEETSAEEAVSWQER RMAAAPPGCTPPALLDISWLTESLGAGQPVPVECRHRLEVAGPRKGPLSPAWMPAYACQRPTPLTHHNTGLSEALEILAEAAGFEG SEGRLLTFCRAASVLKALPSPVTTLSQLQGLPHFGEHSSRVVQELLEHGVCEEVERVRRSERYQTMKLFTQIFGVGVKTADRWYRE GLRTLDDLREQPQKLTQQQKAGLQHHQDLSTPVLRSDVDALQQVVEEAVGQALPGATVTLTGGFRRGKLQGHDVDFLITHPKEGQ EAGLLPRVMCRLQDQGLILYHQHQHSCCESPTRLAQQSHMDAFERSFCIFRLPQPPGAAVGGSTRPCPSWKAVRVDLVVAPVSQF PFALLGWTGSKLFQRELRRFSRKEKGLWLNSHGLFDPEQKTFFQAASEEDIFRHLGLEYLPPEQRNA	494	4431
8	TdT	MDPPRASHLSPRKKRPRQTGALMASSPQDIKFQDLVVFILEKKMGTTRRAFLMELARRKGFRVENELSDSVTHIVAENNSGSDVLE WLQAQKVQVSSQPELLDVSWLIECIRAGKPVEMTGKHQLVVRRDYSDSTNPGPPKTPPIAVQKISQYACQRRTTLNNCNQIFTDAF DILAENCEFRENEDSCVTFMRAASVLKSLPFTIISMKDTEGIPCLGSKVKGIIEEIIEDGESSEVKAVLNDERYQSFKLFTSVFGVGLKT SEKWFRMGFRTLSKVRSDKSLKFTRMQKAGFLYYEDLVSCVTRAEAEAVSVLVKEAVWAFLPDAFVTMTGGFRRGKKMGHDVDF LITSPGSTEDEEQLLQKVMNLWEKKGLLLYYDLVESTFEKLRLPSRKVDALDHFQKCFLIFKLPRQRVDSDQSSWQEGKTWKAIRVD LVLCPYERRAFALLGWTGSRQFERDLRRYATHERKMILDNHALYDKTKRIFLKAESEEEIFAHLGLDYIEPWERNA	509	4432
9	シータ (θ)	MNLLRRSGKRRRSESGSDSFSGSGGDSSASPQFLSGSVLSPPPGLGRCLKAAAAGECKPTVPDYERDKLLLANWGLPKAVLEKYH SFGVKKMFEWQAECLLLGQVLEGKNLVYSAPTSAGKTLVAELLILKRVLEMRKKALFILPFVSVAKEKKYYLQSLFQEVGIKVDGYMG STSPSRHFSSLDIAVCTIERANGLINRLIEENKMDLLGMVVVDELHMLGDSHRGYLLELLLTKICYITRKSASCQADLASSLSNAVQIVG MSATLPNLELVASWLNAELYHTDFRPVPLLESVKVGNSIYDSSMKLVREFEPMLQVKGDEDHVVSLCYETICDNHSVLLFCPSKKW CEKLADIIAREFYNLHHQAEGLVKPSECPPVILEQKELLEVMDQLRRLPSGLDSVLQKTVPWGVAFHHAGLTFEERDIIEGAFRQGLI	2590	4433

【０１０２】

【表１－３】

行	Pol	配列	長さ	配列番号
		RVLAATSTLSSGVNLPARRVIIRTPIFGGRPLDILTYKQMVGRAGRKGVDTVGESILICKNSEKSKGIALLQGSLKPVRSCLQRREGEE VTGSMIRAILEIIVGGVASTSQDMHTYAACTFLAASMKEGKQGIQRNQESVQLGAIEACVMWLLENEFIQSTEASDGTEGKVYHPTH LGSATLSSSLSPADTLDIFADLQRAMKGFVLENDLHILYLVTPMFEDWTTIDWYRFFCLWEKLPTSMKRVAELVGVEEGFLARCVKG KVVARTERQHRQMAIHKRFFTSLVLLDLISEVPLREINQKYGCNRGQIQSLQQSAAVYAGMITVFSNRLGWHNMELLLSQFQKRLTF GIQRELCDLVRVSLLNAQRARVLYASGFHTVADLARANIVEVEVILKNAVPFKSARKAVDEEEEAVEERRNMRTIWVTGRKGLTERE AAALIVEEARMILQQDLVEMGVQWNPCALLHSSTCSLTHSESEVKEHTFISQTKSSYKKLTSKNKSNTIFSDSYIKHSPNIVQDLNKSR EHTSSFNCNFQNGNQEHQTCSIFRARKRASLDINKEKPGASQNEGKTSDKKVVQTFSQKTKKAPLNFNSEKMSRSFRSWKRRKHL KRSRDSSPLKDSGACRIHLQGQTLSNPSLCEDPFTLDEKKTEFRNSGPFAKNVSLSGKEKDNKTSFPLQIKQNCSWNITLTNDNFVE HIVTGSQSKNVTCQATSVVSEKGRGVAVEAEKINEVLIQNGSKNQNVYMKHHDIHPINQYLRKQSHEQTSTITKQKNIIERQMPCEAV SSYINRDSNVTINCERIKLNTEENKPSHFQALGDDISRTVIPSEVLPSAGAFSKSEGQHENFLNISRLQEKTGTYTTNKTKNNHVSDLG LVLCDFEDSFYLDTQSEKIIQQMATENAKLGAKDTNLAAGIMQKSLVQQNSMNSFQKECHIPFPAEQHPLGATKIDHLDLKTVGTMK QSSDSHGVDILTPESPIFHSPILLEENGLFLKKNEVSVTDSQLNSFLQGYQTQETVKPVILLIPQKRTPTGVEGECLPVPETSLNMSDS LLFDSFSDDYLVKEQLPDMQMKEPLPSEVTSNHFSDSLCLQEDLIKKSNVNENQDTHQQLTCSNDESIIFSEMDSVQMVEALDNVDI FPVQEKNHTVVSPRALELSDPVLDEHHQGDQDGGDQDERAEKSKLTGTRQNHSFIWSGASFDLSPGLQRILDKVSSPLENEKLKS MTINFSSLNRKNTELNEEQEVISNLETKQVQGISFSSNNEVKSKIEMLENNANHDETSSLLPRKESNIVDDNGLIPPTPIPTSASKLTFP GILETPVNPWKTNNVLQPGESYLFGSPSDIKNHDLSPGSRNGFKDNSPISDTSFSLQLSQDGLQLTPASSSSESLSIIDVASDQNLFQ TFIKEWRCKKRFSISLACEKIRSLTSSKTATIGSRFKQASSPQEIPIRDDGFPIKGCDDTLVVGLAVCWGGRDAYYFSLQKEQKHSEIS ASLVPPSLDPSLTLKDRMWYLQSCLRKESDKECSVVIYDFIQSYKILLLSCGISLEQSYEDPKVACWLLDPDSQEPTLHSIVTSFLPHE LPLLEGMETSQGIQSLGLNAGSEHSGRYRASVESILIFNSMNQLNSLLQKENLQDVFRKVEMPSQYCLALLELNGIGFSTAECESQK HIMQAKLDAIETQAYQLAGHSFSFTSSDDIAEVLFLELKLPPNREMKNQGSKKTLGSTRRGIDNGRKLRLGRQFSTSKDVLNKLKALH PLPGLILEWRRITNAITKVVFPLQREKCLNPFLGMERIYPVSQSHTATGRITFTEPNIQNVPRDFEIKMPTLVGESPPSQAVGKGLLPM GRGKYKKGFSVNPRCQAQMEERAADRGMPFSISMRHAFVPFPGGSILAADYSQLELRILAHLSHDRRLIQVLNTGADVFRSIAAEW KMIEPESVGDDLRQQAKQICYGIIYGMGAKSLGEQMGIKENDAACYIDSFKSRYTGINQFMTETVKNCKRDGFVQTILGRRRYLPGIK DNNPYRKAHAERQAINTIVQGSAADIVKIATVNIQKQLETFHSTFKSHGHREGMLQSDQTGLSRKRKLQGMFCPIRGGFFILQLHDEL LYEVAEEDVVQVAQIVKNEMESAVKLSVKLKVKVKIGASWGELKDFDV		
10	ニューイ(v)	MENYEALVGFDLCNTPLSSVAQKIMSAMHSGDLVDSKTWGKSTETMEVINKSSVKYSVQLEDRKTQSPEKKDLKSLRSQTSRGSA KLSPQSFSVRLTDQLSADQKQKSISSLTLSSCLIPQYNQEASVLQKKGHKRKHFLMENINNENKGSINLKRKHITYNNLSEKTSKQMA LEEDTDDAEGYLNSGNSGALKKHFCDIRHLDDWAKSQLIEMLKQAAALVITVMYTDGSTQLGADQTPVSSVRGIVVLVKRQAEGGH GCPDAPACGPVLEGFVSDDPCIYIQIEHSAIWDQEQEAHQQFARNVLFQTMKCKCPVICFNAKDFVRIVLQFFGNDGSWKHVADFIG LDPRIAAWLIDPSDATPSFEDLVEKYCEKSITVKVNSTYGNSSRNIVNQNVRENLKTLYRLTMDLCSKLKDYGLWQLFRTLELPLIPIL AVMESHAIQVNKEEMEKTSALLGARLKELEQEAHFVAGERFLITSNNQLREILFGKLKLHLLSQRNSLPRTGLQKYPSTSEAVLNALR DLHPLPKIILEYRQVHKIKSTFVDGLLACMKKGSISSTWNQTGTVTGRLSAKHPNIQGISKHPIQITTPKNFKGKEDKILTISPRAMFVS SKGHTFLAADFSQIELRILTHLSGDPELLKLFQESERDDVFSTLTSQWKDVPVEQVTHADREQTKKVVYAVVYGAGKERLAACLGVP IQEAAQFLESFLQKYKKIKDFARAAIAQCHQTGCVVSIMGRRRPLPRIHAHDQQLRAQAERQAVNFVVQGSAADLCKLAMIHVFTAV AASHTLTARLVAQIHDELLFEVEDPQIPECAALVRRTMESLEQVQALELQLQVPLKVSLSAGRSWGHLVPLQEAWGPPPGPCRTES PSNSLAAPGSPASTQPPPLHFSPSFCL	900	4434

【０１０３】

【表１－４】

表 1a: 表 1 に列記されるポリメラーゼの特性

行	ファミリー	Pol	宿主	遺伝子記号	UniProt 受託番号	UniProt 名	触媒サブユニット質量 (kDa)	更なるサブユニット	生物学的経路	鋳型核酸
1	Y	イータ (η)	ヒト (Homo sapiens)	POLH	Q9Y253	POLH_HUMAN	78	モノマー	TLS	
2	Y	イオタ (ι)	ヒト (Homo sapiens)	POLI	Q9UNA4	POLI_HUMAN	80	モノマー	TLS	
3	Y	カッパ (κ)	ヒト (Homo sapiens)	POLK	Q9UBT6	POLK_HUMAN	76	モノマー	TLS	
4	Y	REV1	ヒト (Homo sapiens)	REV1	Q9UBZ9	REV1_HUMAN	138	モノマー	TLS	
5	X	ベータ (β)	ヒト (Homo sapiens)	POLB	P06746	DPOLB_HUMAN	39	モノマー	BER	
6	X	ラムダ (λ)	ヒト (Homo sapiens)	POLL	Q9UGP5	DPOLL_HUMAN	66	モノマー	BER, NHEJ, TLS	
7	X	ミュー (μ)	ヒト (Homo sapiens)	POLM	Q9NP87	DPOLM_HUMAN	55	モノマー	NHEJ, V(D)J	
8	X	TdT	ヒト (Homo sapiens)	DNTT	P04053	TDT_HUMAN	56	モノマー	V(D)J	鋳型非依存的
9	A	シータ (θ)	ヒト (Homo sapiens)	POLQ	O75417	DPOLQ_HUMAN	290	モノマー	TLS, MMEJ, RTDR	DNA 及び/又は RNA
10	A	ニュー (ν)	ヒト (Homo sapiens)	POLN	Q7Z5Q5	DPOLN_HUMAN	100	モノマー	ICL 修復	

生物学的経路について、TLS = 損傷乗り越え合成; BER = 塩基除去修復; NHEJ = 非相同末端結合; V(D)J = V(D)J 組換えプロセス; MMEJ = マイクロホモロジー媒介末端結合; RTDR = RNA 鋳型化 DNA 修復。

【０１０４】

本発明の特定の態様では、遺伝子組換えシステムのライティングドメインは、逆転写酵素活性を有し、逆転写酵素ドメイン（ＲＴドメイン）とも称される。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、ＲＴ触媒部分、ＲＮＡ結合領域（例えば、鋳型ＲＮＡに結合する領域）を含む。

【０１０５】

一部の実施形態では、逆転写酵素をコードする核酸は、例えばヒト細胞について改善された、改変されたコドン使用を有するように、その天然配列から改変される。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、レトロウイルスからの異種の逆転写酵素である。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドを含むＲＴドメインは、その元のアミノ酸配列から突然変異されている、例えば、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０若しくは１００の置換を有する。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、レトロウイルスのＲＴ、例えば、ＨＩＶ－１ＲＴ、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍｏｌｏｎｅｙ Ｍｕｒｉｎｅ Ｌｅｕｋｅｍｉａ Ｖｉｒｕｓ）（ＭＭＬＶ）ＲＴ、トリ骨髄芽球症ウイルス（ａｖｉａｎ ｍｙｅｌｏｂｌａｓｔｏｓｉｓ ｖｉｒｕｓ）（ＡＭＶ）ＲＴ、又はラウス肉腫ウイルス（Ｒｏｕｓ Ｓａｒｃｏｍａ Ｖｉｒｕｓ）（ＲＳＶ）ＲＴに由来する。

【０１０６】

一部の実施形態では、レトロウイルス逆転写酵素（ＲＴ）ドメインは、ターゲットプライム逆転写（ＴＰＲＴ）開始の、例えば内因性ＲＴドメインと比較して増加したストリンジェンシーを示す。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、第１の鎖ニックの直ぐ上流の標的部位内の３ｎｔ、例えばＲＮＡ鋳型をプライムするゲノムＤＮＡが、ＲＮＡ鋳型中の相同性の３ｎｔに対して少なくとも６６％若しくは１００％の相補性を有するとき、ＴＰＲＴを開始する。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、鋳型ＲＮＡの相同性と標的ＤＮ

Ａプライミング逆転写との間で５ｎｔ未満が一致しない（例えば、１、２、３、４又は５ｎｔ未満が一致しない）とき、ＴＰＲＴを開始する。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、ＴＰＲＴ反応のプライミングでのミスマッチにおけるストリンジェンシーが増加するように修飾され、例えば、ＲＴドメインは、野生型（例えば、非修飾）ＲＴドメインと比較して、プライミング領域内でのミスマッチを全く許容しないか、又はミスマッチをより少なければ許容する。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、ＨＩＶ－１　ＲＴドメインを含む。複数の実施形態では、ＨＩＶ－１　ＲＴドメインは、代替的なＲＴドメイン（例えば、Ｊａｍｂｕｒｕｔｈｕｇｏｄａ ａｎｄ Ｅｉｃｋｂｕｓｈ Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ４０７（５）：６６１－６７２（２０１１）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）によって記載のとおり）と比較して、３つのヌクレオチドミスマッチであっても、より低いレベルで合成を開始する。

【０１０７】

一部の実施形態では、ＲＴドメインは、二量体（例えば、ヘテロ二量体又はホモ二量体）を形成する。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、単量体である。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、天然には単量体又は二量体（例えば、ヘテロ二量体又はホモ二量体）として機能する。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、天然には単量体として機能する、例えば、単量体として機能するウイルスに由来する。複数の実施形態では、ＲＴドメインは、マウス白血病ウイルス（ｍｕｒｉｎｅ ｌｅｕｋｅｍｉａ ｖｉｒｕｓ）（ＭＬＶ；時としてＭｏＭＬＶと称される）（例えば、Ｐ０３３５５）、ブタ内因性レトロウイルス（ｐｏｒｃｉｎｅ ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓ ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）（ＰＥＲＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｑ４ＶＦＺ２）、マウス乳腺腫瘍ウイルス（ｍｏｕｓｅ ｍａｍｍａｒｙ ｔｕｍｏｒ ｖｉｒｕｓ）（ＭＭＴＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０３３６５）、マソン・ファイザー・サルウイルス（Ｍａｓｏｎ－Ｐｆｉｚｅｒ ｍｏｎｋｅｙ ｖｉｒｕｓ）（ＭＰＭＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０７５７２）、ウシ白血病ウイルス（ｂｏｖｉｎｅ ｌｅｕｋｅｍｉａ ｖｉｒｕｓ）（ＢＬＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０３３６１）、ヒトＴ細胞白血病ウイルス－１（ｈｕｍａｎ Ｔ－ｃｅｌｌ ｌｅｕｋｅｍｉａ ｖｉｒｕｓ－１）（ＨＴＬＶ－１）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０３３６２）、ヒト泡沫状ウイルス（ｈｕｍａｎ ｆｏａｍｙ ｖｉｒｕｓ）（ＨＦＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１４３５０）、サル泡沫状ウイルス（ｓｉｍｉａｎ ｆｏａｍｙ ｖｉｒｕｓ）（ＳＦＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ２３０７４）若しくはウシ泡沫状／シンシチウムウイルス（ｂｏｖｉｎｅ ｆｏａｍｙ／ｓｙｎｃｙｔｉａｌ ｖｉｒｕｓ）（ＢＦＶ／ＢＳＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｏ４１８９４）、又はその機能性断片若しくは変異体（例えば、それと少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列）からのＲＴドメインから選択される。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、その天然機能性において二量体である。一部の実施形態では、ＲＴドメインは、二量体として機能するウイルスに由来する。複数の実施形態では、ＲＴドメインは、トリ肉腫／白血病ウイルス（ａｖｉａｎ ｓａｒｃｏｍａ／ｌｅｕｋｅｍｉａ ｖｉｒｕｓ）（ＡＳＬＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ａ０Ａ１４２ＢＫＨ１）、ラウス肉腫ウイルス（Ｒｏｕｓ ｓａｒｃｏｍａ ｖｉｒｕｓ）（ＲＳＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０３３５４）、トリ骨髄芽球症ウイルス（ａｖｉａｎ ｍｙｅｌｏｂｌａｓｔｏｓｉｓ ｖｉｒｕｓ）（ＡＭＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｑ８３１３３）、ヒト免疫不全ウイルスＩ型（ｈｕｍａｎ ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｖｉｒｕｓ ｔｙｐｅ Ｉ）（ＨＩＶ－１）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０３３６９）、ヒト免疫不全ウイルスＩＩ型（ｈｕｍａｎ ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｖｉｒｕｓ ｔｙｐｅ ＩＩ）（ＨＩＶ－２）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１５８３３）、サル免疫不全ウイルス（ｓｉｍｉａｎ ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｖｉｒｕｓ）（ＳＩＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０５８９６）、ウシ免疫不全ウイルス（ｂｏｖｉｎｅ ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｖｉｒｕｓ）（ＢＩＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ１９５６０）、ウマ感染性貧血ウイルス（ｅｑｕｉｎｅ ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ ａｎｅｍｉａ ｖｉｒｕｓ）（ＥＩＡＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０３３７１

）、又はネコ免疫不全ウイルス（ｆｅｌｉｎｅ ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｖｉｒｕｓ）（ＦＩＶ）（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ Ｐ１６０８８）（Ｈｅｒｓｃｈｈｏｒｎ ａｎｄ Ｈｉｚｉ Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ ６７（１６）：２７１７－２７４７（２０１０））、又はその機能性断片若しくは変異体（例えば、それと少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列）からのＲＴドメインから選択される。天然には、ヘテロ二量体ＲＴドメインは、一部の実施形態では、ホモ二量体として機能的でもあり得る。一部の実施形態では、二量体ＲＴドメインは、融合タンパク質として、例えば、ホモ二量体融合タンパク質又はヘテロ二量体融合タンパク質として発現される。一部の実施形態では、システムのＲＴ機能は、（例えば、本明細書に記載のような）複数のＲＴドメインによって満たされる。更なる実施形態では、複数のＲＴドメインは、融合されるか又は分かれており、例えば、同じポリペプチド上又は異なるポリペプチド上に存在し得る。

【０１０８】

一部の実施形態では、本明細書に記載の遺伝子組換えシステムは、インテグラーゼドメインを含み、例えば、インテグラーゼドメインは、ＲＴドメインの一部であり得る。一部の実施形態では、ＲＴドメイン（例えば、本明細書に記載される）は、インテグラーゼドメインを含む。一部の実施形態では、ＲＴドメイン（例えば、本明細書に記載される）は、インテグラーゼドメインを欠いており、又は突然変異若しくは欠失によって不活性化されているインテグラーゼドメインを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の遺伝子組換えシステムは、リボヌクレアーゼＨドメインを含み、例えば、リボヌクレアーゼＨドメインは、ＲＴドメインの一部であり得る。一部の実施形態では、ＲＮａｓｅ Ｈドメインは、ＲＴドメインの一部ではなく、フレキシブルリンカーを介して共有結合的に連結される。一部の実施形態では、ＲＴドメイン（例えば、本明細書に記載される）は、リボヌクレアーゼＨドメイン、例えば、内因性リボヌクレアーゼＨドメイン又は異種リボヌクレアーゼＨドメインを含む。一部の実施形態では、ＲＴドメイン（例えば、本明細書に記載される）は、リボヌクレアーゼＨドメインを欠いている。一部の実施形態では、ＲＴドメイン（例えば、本明細書に記載される）は、異種リボヌクレアーゼＨドメインに対して、付加、欠失、突然変異、又は交換されているリボヌクレアーゼＨドメインを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、不活性化内因性ＲＮａｓｅ Ｈドメインを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドの他のドメインの１つからの内因性ＲＮａｓｅ Ｈドメインは、それがポリペプチドに含まれないように遺伝子的に除去され、例えば、内因性ＲＮａｓｅ Ｈドメインは、ドメインを含むポリペプチドから部分的に又は完全に切断される。一部の実施形態では、リボヌクレアーゼＨドメインの突然変異は、例えば、Ｋｏｔｅｗｉｃｚ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ １６（１）：２６５－２７７（１９８８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）における方法による測定として、例えば、突然変異を有しない他の類似ドメインと比較して、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％若しくは９０％だけより低い、より低いリボヌクレアーゼ活性を示すポリペプチドを生成する。一部の実施形態では、リボヌクレアーゼＨ活性は、消失する。

【０１０９】

一部の実施形態では、ＲＴドメインは、突然変異を受け、突然変異を有しない他の類似ドメインと比較して忠実度が増加する。例えば、一部の実施形態では、ＲＴドメイン内（例えば、逆転写酵素中）のＹＡＤＤ（配列番号４４３５）又はＹＭＤＤ（配列番号４４３６）モチーフは、ＹＶＤＤ（配列番号４４３７）と置換される。複数の実施形態では、ＹＡＤＤ（配列番号４４３５）、又はＹＭＤＤ（配列番号４４３６）、又はＹＶＤＤ（配列番号４４３７）の置換は、レトロウイルス逆転写酵素活性において、より高い忠実度をもたらす（例えば、Ｊａｍｂｕｒｕｔｈｕｇｏｄａ ａｎｄ Ｅｉｃｋｂｕｓｈ Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２０１１に記載される；その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０１１０】

一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドは、表２に従う

アミノ酸配列又はそれと少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を有するＲＴドメインを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸は、表２に従うアミノ酸配列又はそれと少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を有するＲＴドメインをコードする。

【０１１１】

【表２－１】

表2: レトロウイルスからの例示的な逆転写酵素ドメイン

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
AVIRE_P03360	TAPLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALPVRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLPVRKSGTSEYRMVQDLREVNKRVETIHPTVPNPYTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDAFFCIPLAPESQLIFAFEWADAEEGESGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALNRDLQGFRLDHPSVSLLQYVDDLLIAADTQAACLSATRDLLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQAILQIPVPKTKRQVREFLGTIGYCRLWIPGFAELAQPLYAATRGGNDPLVWGEKEEEAFQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRPVAYLSKRLDPVAAGWPRCLRAIAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPPDKWLTNARITQYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTDQPLAQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSVIWAEPLPIGTSAQKAELIALTKALEWSKDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGMIYRERGLLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPKRVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATIS	4438
AVIRE_P03360_3mut	TAPLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALPVRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLPVRKSGTSEYRMVQDLREVNKRVETIHPTVPNPYTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDAFFCIPLAPESQLIFAFEWADAEEGESGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALNRDLQGFRLDHPSVSLLQYVDDLLIAADTQAACLSATRDLLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQAILQIPVPKTKRQVREFLGTIGYCRLWIPGFAELAQPLYAATRPGNDPLVWGEKEEEAFQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRPVAYLSKRLDPVAAGWPRCLRAIAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPPDKWLTNARITQYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTDQPLAQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSVIWAEPLPIGTSAQKAELIALTKALEWSKDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGMIYRERGWLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPKRVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATIS	4439
AVIRE_P03360_3mutA	TAPLEEEYRLFLEAPIQNVTLLEQWKREIPKVWAEINPPGLASTQAPIHVQLLSTALPVRVRQYPITLEAKRSLRETIRKFRAAGILRPVHSPWNTPLLPVRKSGTSEYRMVQDLREVNKRVETIHPTVPNPYTLLSLLPPDRIWYSVLDLKDAFFCIPLAPESQLIFAFEWADAEEGESGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALNRDLQGFRLDHPSVSLLQYVDDLLIAADTQAACLSATRDLLMTLAELGYRVSGKKAQLCQEEVTYLGFKIHKGSRSLSNSRTQAILQIPVPKTKRQVREFLGKIGYCRLFIPGFAELAQPLYAATRPGNDPLVWGEKEEEAFQSLKLALTQPPALALPSLDKPFQLFVEETSGAAKGVLTQALGPWKRPVAYLSKRLDPVAAGWPRCLRAIAAAALLTREASKLTFGQDIEITSSHNLESLLRSPPDKWLTNARITQYQVLLLDPPRVRFKQTAALNPATLLPETDDTLPIHHCLDTLDSLTSTRPDLTDQPLAQAEATLFTDGSSYIRDGKRYAGAAVVTLDSVIWAEPLPIGTSAQKAELIALTKALEWSKDKSVNIYTDSRYAFATLHVHGMIYRERGWLTAGGKAIKNAPEILALLTAVWLPKRVAVMHCKGHQKDDAPTSTGNRRADEVAREVAIRPLSTQATIS	4440
BAEVM_P10272	TVSLQDEHRLFDIPVTTSLPDVWLQDFPQAWAETGGLGRAKCQAPIIIDLKPTAVPVSIKQYPMSLEAHMGIRQHIIKFLELGVLRPCRSPWNTPLLPVKKPGTQDYRPVQDLREINKRTVDIHPTVPNPYNLLSTLKPDYSWYTVLDLKDAFFCLPLAPQSQELFAFEWKDPERGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLTDFRTQHPEVTLLQYVDDLLLAAPTKKACTQGTRHLLQELGEKGYRASAKKAQICQTKVTYLGYILSEGKRWLTPGRIETVARIPPRNPREVREFLGTAGFCRLWIPGFAELAAPLYALTKESTPFTWQTEHQLAFEALKKALLSAPALGLPDTSKPFTLFLDERQGIAKGVLTQKLGPWKRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRIMAATAMLVKDSAKLTLGQPLTVITPHTLEAIVRQPPDRWITNARLTHYQALLLDTDRVQFGPPVTLNPATLLPVPENQPSPHDCRQVLAETHGTREDLKDQELPDADHTWYTDGSSYLDSGTRRAGAAVVDGHNTIWAQSLPPGTSAQKAELIALTKALELSKGKKANIYTDSRYAFATAHTHGSIYERRGLLTSEGKEIKNKAEIIALLKALFLPQEVAIIHCPGHQKGQDPVAVGNRQADRVARQAAMAEVLTLATEPDNTSHIT	4441
BAEVM_P10272_3mut	TVSLQDEHRLFDIPVTTSLPDVWLQDFPQAWAETGGLGRAKCQAPIIIDLKPTAVPVSIKQYPMSLEAHMGIRQHIIKFLELGVLRPCRSPWNTPLLPVKKPGTQDYRPVQDLREINKRTVDIHPTVPNPYNLLSTLKPDYSWYTVLDLKDAFFCLPLAPQSQELFAFEWKDPERGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLTDFRTQHPEVTLLQYVDDLLLAAPTKKACTQGTRHLLQELGEKGYRASAKKAQICQTKVTYLGYILSEGKRWLTPGRIETVARIPPRNPREVREFLGTAGFCRLWIPGFAELAAPLYALTKPSTPFTWQTEHQLAFEALKKALLSAPALGLPDTSKPFTLFLDERQGIAKGVLTQKLGPWKRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRIMAATAMLVKDSAKLTLGQPLTVITPHTLEAIVRQPPDRWITNARLTHYQALLLDTDRVQFGPPVTLNPATLLPVPENQPSPHDCRQVLAETHGTREDLKDQELPDADHTWYTDGSSYLDSGTRRAGAAVVDGHNTIWAQSLPPGTSAQKAELIALTKALELSKGKKANIYTDSRYAFATAHTHGSIYERRGWLTSEGKEIKNKAEIIALLKALFLPQEVAIIHCPGHQKGQDPVAVGNRQADRVARQAAMAEVLTLATEPDNTSHIT	4442
BAEVM_P10272_3mutA	TVSLQDEHRLFDIPVTTSLPDVWLQDFPQAWAETGGLGRAKCQAPIIIDLKPTAVPVSIKQYPMSLEAHMGIRQHIIKFLELGVLRPCRSPWNTPLLPVKKPGTQDYRPVQDLREINKRTVDIHPTVPNPYNLLSTLKPDYSWYTVLDLKDAFFCLPLAPQSQELFAFEWKDPERGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLTDFRTQHPEVTLLQYVDDLLLAAPTKKACTQGTRHLLQELGEKGYRASAKKAQICQTKVTYLGYILSEGKRWLTPGRIETVARIPPRNPREVREFLGKAGFCRLFIPGFAELAAPLYALTKPSTPFTWQTEHQLAFEALKKALLSAPALGLPDTSKPFTLFLDERQGIAKGVLTQKLGPWKRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRIMAATAMLVKDSAKLTLGQPLTVITPHTLEAIVRQPPDRWITNARLTHYQALLLDTDRVQFGPPVTLNPATLLPVPENQPSPHDCRQVLAETHGTREDLKDQELPDADHTWYTDGSSYLDSGTRRAGAAVVDGHNTIWAQSLPPGTSAQKAELIALTKALELSKGKKANIYTDSRYAFATAHTHGSIYERRGWLTSEGKEIKNKAEIIALLKALFLPQEVAIIHCPGHQKGQDPVAVGNRQADRVARQAAMAEVLTLATEPDNTSHIT	4443

【０１１２】

【表２－２】

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
BLVAU_P25059	GVLDAPPSHIGLEHLPPPPEVPQFPLNLERLQALQDLVHRSLEAGYISPWDGPGNNPVFPVRKPNGAWRFVHDLRVTNALTKPIPALSPGPPDLT AIPTHLPHIICLDLKDAFFQIPVEDRFRSYFAFTLPTPGGLQPHRRFAWRVLPQGFINSPALFERALQEPLRQVSAAFSQSLLVSYMDDILYVSPTEE QRLQCYQTMAAHLRDLGFQVASEKTRQTPSPVPFLGQMVHERMVTYQSLPTLQISSPISLHQLQTVLGDLQWVSRGTPTTRRPLQLLYSSLKGID DPRAIIHLSPEQQQGIAELRQALSHNARSRYNEQEPLLAYVHLTRAGSTLVLFQKGAQFPLAYFQTPLTDNQASPWGLLLLLGCQYLQAAQALSSYA KTILKYYHNLPKTSLDNWIQSSEDPRVQELLQLWPQISSQGIQPPGPWKTLVTRAEVFLTPQFSPEPIPAALCLFSDGAARRGAYCLWKDHLLDFQ AVPAPESAQKGELAGLLAGLAAAPPEPLNIWVDSKYLYSLLRTLVLGAWLQPDPVPSYALLYKSLLRHPAIFVGHVRSHSSASHPIASLNNYVDQL	4444
BLVAU_P25059_2mut	GVLDAPPSHIGLEHLPPPPEVPQFPLNLERLQALQDLVHRSLEAGYISPWDGPGNNPVFPVRKPNGAWRFVHDLRVTNALTKPIPALSPGPPDLT AIPTHLPHIICLDLKDAFFQIPVEDRFRSYFAFTLPTPGGLQPHRRFAWRVLPQGFINSPALFQRALQEPLRQVSAAFSQSLLVSYMDDILYVSPTEE QRLQCYQTMAAHLRDLGFQVASEKTRQTPSPVPFLGQMVHERMVTYQSLPTLQISSPISLHQLQTVLGDLQWVSRGTPTTRRPLQLLYSSLKPID DPRAIIHLSPEQQQGIAELRQALSHNARSRYNEQEPLLAYVHLTRAGSTLVLFQKGAQFPLAYFQTPLTDNQASPWGLLLLLGCQYLQAAQALSSYA KTILKYYHNLPKTSLDNWIQSSEDPRVQELLQLWPQISSQGIQPPGPWKTLVTRAEVFLTPQFSPEPIPAALCLFSDGAARRGAYCLWKDHLLDFQ AVPAPESAQKGELAGLLAGLAAAPPEPLNIWVDSKYLYSLLRTLVLGAWLQPDPVPSYALLYKSLLRHPAIFVGHVRSHSSASHPIASLNNYVDQL	4445
BLVJ_P03361	GVLDTPPSHIGLEHLPPPPEVPQFPLNLERLQALQDLVHRSLEAGYISPWDGPGNNPVFPVRKPNGAWRFVHDLRATNALTKPIPALSPGPPDLT AIPTHPPHIICLDLKDAFFQIPVEDRFRFYLSFTLPSPGGLQPHRRFAWRVLPQGFINSPALFERALQEPLRQVSAAFSQSLLVSYMDDILYASPTEE QRSQCYQALAARLRDLGFQVASEKTSQTPSPVPFLGQMVHEQIVTYQSLPTLQISSPISLHQLQAVLGDLQWVSRGTPTTRRPLQLLYSSLKRHH DPRAIIQLSPEQLQGIAELRQALSHNARSRYNEQEPLLAYVHLTRAGSTLVLFQKGAQFPLAYFQTPLTDNQASPWGLLLLLGCQYLQTQALSSYA KPILKYYHNLPKTSLDNWIQSSEDPRVQELLQLWPQISSQGIQPPGPWKTLITRAEVFLTPQFSPDPIPAALCLFSDGATGRGAYCLWKDHLLDFQ AVPAPESAQKGELAGLLAGLAAAPPEPVNIWVDSKYLYSLLRTLVLGAWLQPDPVPSYALLYKSLLRHPAIVVGHVRSHSSASHPIASLNNYVDQL	4446
BLVJ_P03361_2mut	GVLDTPPSHIGLEHLPPPPEVPQFPLNLERLQALQDLVHRSLEAGYISPWDGPGNNPVFPVRKPNGAWRFVHDLRATNALTKPIPALSPGPPDLT AIPTHPPHIICLDLKDAFFQIPVEDRFRFYLSFTLPSPGGLQPHRRFAWRVLPQGFINSPALFNRALQEPLRQVSAAFSQSLLVSYMDDILYASPTEE QRSQCYQALAARLRDLGFQVASEKTSQTPSPVPFLGQMVHEQIVTYQSLPTLQISSPISLHQLQAVLGDLQWVSRGTPTTRRPLQLLYSSLKRHH DPRAIIQLSPEQLQGIAELRQALSHNARSRYNEQEPLLAYVHLTRAGSTLVLFQKGAQFPLAYFQTPLTDNQASPWGLLLLLGCQYLQTQALSSYA KPILKYYHNLPKTSLDNWIQSSEDPRVQELLQLWPQISSQGIQPPGPWKTLITRAEVFLTPQFSPDPIPAALCLFSDGATGRGAYCLWKDHLLDFQ AVPAPESAQKGELAGLLAGLAAAPPEPVNIWVDSKYLYSLLRTWVLGAWLQPDPVPSYALLYKSLLRHPAIVVGHVRSHSSASHPIASLNNYVDQL	4447
BLVJ_P03361_2mutB	GVLDTPPSHIGLEHLPPPPEVPQFPLNLERLQALQDLVHRSLEAGYISPWDGPGNNPVFPVRKPNGAWRFVHDLRATNALTKPIPALSPGPPDLT APPTHPPHIICLDLKDAFFQIPVEDRFRFYLSFTLPSPGGLQPHRRFAWRVLPQGFINSPALFQRALQEPLRQVSAAFSQSLLVSYMDDILYASPTE EQRSQCYQALAARLRDLGFQVASEKTSQTPSPVPFLGQMVHEQIVTYQSLPTLQISSPISLHQLQAVLGDLQWVSRGTPTTRRPLQLLYSSLKRH HDPRAIIQLSPEQLQGIAELRQALSHNARSRYNEQEPLLAYVHLTRAGSTLVLFQKGAQFPLAYFQTPLTDNQASPWGLLLLLGCQYLQTQALSSY AKPILKYYHNLPKTSLDNWIQSSEDPRVQELLQLWPQISSQGIQPPGPWKTLITRAEVFLTPQFSPDPIPAALCLFSDGATGRGAYCLWKDHLLDF QAVPAPESAQKGELAGLLAGLAAAPPEPVNIWVDSKYLYSLLRTWVLGAWLQPDPVPSYALLYKSLLRHPAIVVGHVRSHSSASHPIASLNNYVD QL	4448
FFV_O93209	MDLLKPLTVERKGVKIKGYWNSQADITCVPKDLLQGEEPVRQQNVTTIHGTQEGDVYYVNLKIDGRRINTEVIGTTLDYAIITPGDVPWILKKPLELTI KLDLEEQQGTLLNNSILSKKGKEELKQLFEKYSALWQSWENQVGHRRIRPHKIATGTVKPTPQKQYHINPKAKPDIQIVINDLLKQGVLIQKESTMN TPVYPVPKPNGRWRMVLDYRAVNKVTPLIAVQNQHSYGILGSLFKGRYKTTIDLSNGFWAHPIVPEDYWITAFTWQGKQYCWTVLPQGFLNSPG LFTGDVVDLLQGIPNVEVYVDDVYISHDSEKEHLEYLDILFNRLKEAGYIISLKKSNIANSIVDFLGFQITNEGRGLTDTFKEKLENITAPTTLKQLQSIL GLLNFARNFIPDFTELIAPLYALIPKSTKNYVPWQIEHSTTLETLITKLNGAEYLQGRKGDKTLIMKVNASYTTGYIRYYNEGEKKPISYVSIVFSKTEL KFTELEKLLTTVHKGLLKALDLSMGQNIHVYSPIVSMQNIQKTPQTAKKALASRWLSWLSYLEDPRIRFFYDPQMPALKDLPAVDTGKDNKKHPSN FQHIFYTDGSAITSPTKEGHLNAGMGIVYFINKDGNLQKQQEWSISLGNHTAQFAEIAAFEFALKKCLPLGGNILVVTDSNYVAKAYNEELDVWASN GFVNNRKKPLKHISKWKSVADLKRLRPDVVVTHEPGHQKLDSSPHAYGNNLADQLATQASFKVH	4449
FFV_O93209_2mut	MDLLKPLTVERKGVKIKGYWNSQADITCVPKDLLQGEEPVRQQNVTTIHGTQEGDVYYVNLKIDGRRINTEVIGTTLDYAIITPGDVPWILKKPLELTI KLDLEEQQGTLLNNSILSKKGKEELKQLFEKYSALWQSWENQVGHRRIRPHKIATGTVKPTPQKQYHINPKAKPDIQIVINDLLKQGVLIQKESTMN TPVYPVPKPNGRWRMVLDYRAVNKVTPLIAVQNQHSYGILGSLFKGRYKTTIDLSNGFWAHPIVPEDYWITAFTWQGKQYCWTVLPQGFLNSPG LFNGDVVDLLQGIPNVEVYVDDVYISHDSEKEHLEYLDILFNRLKEAGYIISLKKSNIANSIVDFLGFQITNEGRGLTDTFKEKLENITAPTTLKQLQSIL GLLNFARNFIPDFTELIAPLYALIPKSPKNYVPWQIEHSTTLETLITKLNGAEYLQGRKGDKTLIMKVNASYTTGYIRYYNEGEKKPISYVSIVFSKTEL KFTELEKLLTTVHKGLLKALDLSMGQNIHVYSPIVSMQNIQKTPQTAKKALASRWLSWLSYLEDPRIRFFYDPQMPALKDLPAVDTGKDNKKHPSN FQHIFYTDGSAITSPTKEGHLNAGMGIVYFINKDGNLQKQQEWSISLGNHTAQFAEIAAFEFALKKCLPLGGNILVVTDSNYVAKAYNEELDVWASN GFVNNRKKPLKHISKWKSVADLKRLRPDVVVTHEPGHQKLDSSPHAYGNNLADQLATQASFKVH	4450
FFV_O93209_2mutA	MDLLKPLTVERKGVKIKGYWNSQADITCVPKDLLQGEEPVRQQNVTTIHGTQEGDVYYVNLKIDGRRINTEVIGTTLDYAIITPGDVPWILKKPLELTI KLDLEEQQGTLLNNSILSKKGKEELKQLFEKYSALWQSWENQVGHRRIRPHKIATGTVKPTPQKQYHINPKAKPDIQIVINDLLKQGVLIQKESTMN TPVYPVPKPNGRWRMVLDYRAVNKVTPLIAVQNQHSYGILGSLFKGRYKTTIDLSNGFWAHPIVPEDYWITAFTWQGKQYCWTVLPQGFLNSPG LFNGDVVDLLQGIPNVEVYVDDVYISHDSEKEHLEYLDILFNRLKEAGYIISLKKSNIANSIVDFLGFQITNEGRGLTDTFKEKLENITAPTTLKQLQSIL GKLNFARNFIPDFTELIAPLYALIPKSPKNYVPWQIEHSTTLETLITKLNGAEYLQGRKGDKTLIMKVNASYTTGYIRYYNEGEKKPISYVSIVFSKTEL KFTELEKLLTTVHKGLLKALDLSMGQNIHVYSPIVSMQNIQKTPQTAKKALASRWLSWLSYLEDPRIRFFYDPQMPALKDLPAVDTGKDNKKHPSN FQHIFYTDGSAITSPTKEGHLNAGMGIVYFINKDGNLQKQQEWSISLGNHTAQFAEIAAFEFALKKCLPLGGNILVVTDSNYVAKAYNEELDVWASN GFVNNRKKPLKHISKWKSVADLKRLRPDVVVTHEPGHQKLDSSPHAYGNNLADQLATQASFKVH	4451
FFV_O93209-Pro	VPWILKKPLELTIKLDLEEQQGTLLNNSILSKKGKEELKQLFEKYSALWQSWENQVGHRRIRPHKIATGTVKPTPQKQYHINPKAKPDIQIVINDLLK QGVLIQKESTMNTPVYPVPKPNGRWRMVLDYRAVNKVTPLIAVQNQHSYGILGSLFKGRYKTTIDLSNGFWAHPIVPEDYWITAFTWQGKQYCW TVLPQGFLNSPGLFTGDVVDLLQGIPNVEVYVDDVYISHDSEKEHLEYLDILFNRLKEAGYIISLKKSNIANSIVDFLGFQITNEGRGLTDTFKEKLENI TAPTTLKQLQSILGLLNFARNFIPDFTELIAPLYALIPKSTKNYVPWQIEHSTTLETLITKLNGAEYLQGRKGDKTLIMKVNASYTTGYIRYYNEGEKKP ISYVSIVFSKTELKFTELEKLLTTVHKGLLKALDLSMGQNIHVYSPIVSMQNIQKTPQTAKKALASRWLSWLSYLEDPRIRFFYDPQMPALKDLPAVD TGKDNKKHPSNFQHIFYTDGSAITSPTKEGHLNAGMGIVYFINKDGNLQKQQEWSISLGNHTAQFAEIAAFEFALKKCLPLGGNILVVTDSNYVAKA YNEELDVWASNGFVNNRKKPLKHISKWKSVADLKRLRPDVVVTHEPGHQKLDSSPHAYGNNLADQLATQASFKVH	4452
FFV_O93209-Pro_2mut	VPWILKKPLELTIKLDLEEQQGTLLNNSILSKKGKEELKQLFEKYSALWQSWENQVGHRRIRPHKIATGTVKPTPQKQYHINPKAKPDIQIVINDLLK QGVLIQKESTMNTPVYPVPKPNGRWRMVLDYRAVNKVTPLIAVQNQHSYGILGSLFKGRYKTTIDLSNGFWAHPIVPEDYWITAFTWQGKQYCW TVLPQGFLNSPGLFNGDVVDLLQGIPNVEVYVDDVYISHDSEKEHLEYLDILFNRLKEAGYIISLKKSNIANSIVDFLGFQITNEGRGLTDTFKEKLENI TAPTTLKQLQSILGLLNFARNFIPDFTELIAPLYALIPKSPKNYVPWQIEHSTTLETLITKLNGAEYLQGRKGDKTLIMKVNASYTTGYIRYYNEGEKKP ISYVSIVFSKTELKFTELEKLLTTVHKGLLKALDLSMGQNIHVYSPIVSMQNIQKTPQTAKKALASRWLSWLSYLEDPRIRFFYDPQMPALKDLPAVD TGKDNKKHPSNFQHIFYTDGSAITSPTKEGHLNAGMGIVYFINKDGNLQKQQEWSISLGNHTAQFAEIAAFEFALKKCLPLGGNILVVTDSNYVAKA YNEELDVWASNGFVNNRKKPLKHISKWKSVADLKRLRPDVVVTHEPGHQKLDSSPHAYGNNLADQLATQASFKVH	4453

【０１１３】

【表２－３】

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
FFV_O93209-Pro_2mutA	VPWILKKPLELTIKLDLEEQQGTLLNNSILSKKGKEELKQLFEKYSALWQSWENQVGHRRIRPHKIATGTVKPTPQKQYHINPKAKPDIQIVINDLLK QGVLIQKESTMNTPVYPVPKPNGRWRMVLDYRAVNKVTPLIAVQNQHSYGILGSLFKGRYKTTIDLSNGFWAHPIVPEDYWITAFTWQGKQYCW TVLPQGFLNSPGLFNGDVVDLLQGIPNVEVYVDDVYISHDSEKEHLEYLDILFNRLKEAGYIISLKKSNIANSIVDFLGFQITNEGRGLTDTFKEKLENI TAPTTLKQLQSILGKLNFARNFIPDFTELIAPLYALIPKSPKNYVPWQIEHSTTLETLITKLNGAEYLQGRKGDKTLIMKVNASYTTGYIRYYNEGEKKP ISYVSIVFSKTELKFTELEKLLTTVHKGLLKALDLSMGQNIHVYSPIVSMQNIQKTPQTAKKALASRWLSWLSYLEDPRIRFFYDPQMPALKDLPAVD TGKDNKKHPSNFQHIFYTDGSAITSPTKEGHLNAGMGIVYFINKDGNLQKQQEWSISLGNHTAQFAEIAAFEFALKKCLPLGGNILVVTDSNYVAKA YNEELDVWAASNGFVNNRKKPLKHISKWKSVADLKRLRPDVVVTHEPPGHQKLDSSPHAYGNNLADQLATQASFKVH 4454
FLV_P10273	TLQLEEEYRLFEPESTQKQEMDIWLKNFPQAWAETGGMGTAHCQAPVLIQLKATATPISIRQYPMPHEAYQGIKPHIRRMLDQGILKPCQSPWNT PLLPVKKPGTEDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSTLPPSHPWYTVLDLKDAFFCLRLHSESQLLFAFEWRDPEIGLSGQLTWTRLPQG FKNSPTLFDEALHSDLADFRVRYPALVLLQYVDDLLLAAATRTECLEGTKALLETLGNKGYRASAKKAQICLQEVTYLGYSLKDGQRWLTKARKEAI LSIPVPKNSRQVREFLGTAGYCRLWIPGFAELAAPLYPLTRPGTLFQWGTEQQLAFEDIKKALLSSPALGLPDITKPFELFIDENSGFAKGVLVQKL GPWKRPVAYLSKKLDTVASGWPPCLRMVAAIAILVKDAGKLTLGQPLTILTSHPVEALVRQPPNKWLSNARMTHYQAMLLDAERVHFGPTVSLNP ATLLPLPSGGNHHDCLQILAETHGTRPDLTDQPLPDADLTWYTDGSSFIRNGEREAGAAVTTESEVIWAAPLPPGTSAQRAELIALTQALKMAEGK KLTVYTDSRYAFATTHVHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKNEILALLEALFLPKRLSIIHCPGHQKGDSPQAKGNRLADDTAKKAATETHSSLTVLP 4455
FLV_P10273_3mut	TLQLEEEYRLFEPESTQKQEMDIWLKNFPQAWAETGGMGTAHCQAPVLIQLKATATPISIRQYPMPHEAYQGIKPHIRRMLDQGILKPCQSPWNT PLLPVKKPGTEDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSTLPPSHPWYTVLDLKDAFFCLRLHSESQLLFAFEWRDPEIGLSGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHSDLADFRVRYPALVLLQYVDDLLLAAATRTECLEGTKALLETLGNKGYRASAKKAQICLQEVTYLGYSLKDGQRWLTKARKEAI LSIPVPKNSRQVREFLGTAGYCRLWIPGFAELAAPLYPLTRPGTLFQWGTEQQLAFEDIKKALLSSPALGLPDITKPFELFIDENSGFAKGVLVQKL GPWKRPVAYLSKKLDTVASGWPPCLRMVAAIAILVKDAGKLTLGQPLTILTSHPVEALVRQPPNKWLSNARMTHYQAMLLDAERVHFGPTVSLNPA ATLLPLPSGGNHHDCLQILAETHGTRPDLTDQPLPDADLTWYTDGSSFIRNGEREAGAAVTTESEVIWAAPLPPGTSAQRAELIALTQALKMAEGK KLTVYTDSRYAFATTHVHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKNEILALLEALFLPKRLSIIHCPGHQKGDSPQAKGNRLADDTAKKAATETHSSLTVLP 4456
FLV_P10273_3mutA	TLQLEEEYRLFEPESTQKQEMDIWLKNFPQAWAETGGMGTAHCQAPVLIQLKATATPISIRQYPMPHEAYQGIKPHIRRMLDQGILKPCQSPWNT PLLPVKKPGTEDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSTLPPSHPWYTVLDLKDAFFCLRLHSESQLLFAFEWRDPEIGLSGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHSDLADFRVRYPALVLLQYVDDLLLAAATRTECLEGTKALLETLGNKGYRASAKKAQICLQEVTYLGYSLKDGQRWLTKARKEAI LSIPVPKNSRQVREFLGKAGYCRLFIPGFAELAAPLYPLTRPGTLFQWGTEQQLAFEDIKKALLSSPALGLPDITKPFELFIDENSGFAKGVLVQKLG PWKRPVAYLSKKLDTVASGWPPCLRMVAAIAILVKDAGKLTLGQPLTILTSHPVEALVRQPPNKWLSNARMTHYQAMLLDAERVHFGPTVSLNPA TLLPLPSGGNHHDCLQILAETHGTRPDLTDQPLPDADLTWYTDGSSFIRNGEREAGAAVTTESEVIWAAPLPPGTSAQRAELIALTQALKMAEGKK LTVYTDSRYAFATTHVHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKNEILALLEALFLPKRLSIIHCPGHQKGDSPQAKGNRLADDTAKKAATETHSSLTVLP 4457
FOAMV_P14350	MNPLQLLQPLPAEIKGTKLLAHWNSGATITCIPESFLEDEQPIKKTLIKTIHGEKQQNVYYVTFKVKGRKVEAEVIASPYEYILLSPTDVPWLTQQPLQ LTILVPLQEYQEKILSKTALPEDQKQQLKTLFVKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLTPQNS TMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFLN SPALFTADVVDLLKEIPNVQVYVDDIYLSHDDPKEHVQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQKTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNITPPKDLKQ LQSILGLLNFARNFIPNFAELVQPLYNLIASAKGKYIEWSEENTKQLNMVIEALNTASNLEERLPEQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNETGKKPIMYLNY VFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYTSSQSPV KHPSQYEGVFYTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHATYKPEYQVLNQWSIPLGNHTAQMAEIAAVEFACKKALKIPGPVLVITDSFYVAESANKELP YWKSNGFVNNKKKPLKHISKWKSIAECLSMKPDITIQHEKGISLQIPVFILKGNALADKLATQGSYVVN 4458
FOAMV_P14350_2mut	MNPLQLLQPLPAEIKGTKLLAHWNSGATITCIPESFLEDEQPIKKTLIKTIHGEKQQNVYYVTFKVKGRKVEAEVIASPYEYILLSPTDVPWLTQQPLQ LTILVPLQEYQEKILSKTALPEDQKQQLKTLFVKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLTPQNS TMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFLN SPALFNADVVDLLKEIPNVQVYVDDIYLSHDDPKEHVQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQKTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNITPPKDLK QLQSILGLLNFARNFIPNFAELVQPLYNLIAPAKGKYIEWSEENTKQLNMVIEALNTASNLEERLPEQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNETGKKPIMYLN YVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYTSSQSP VKHPSQYEGVFYTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHATYKPEYQVLNQWSIPLGNHTAQMAEIAAVEFACKKALKIPGPVLVITDSFYVAESANKEL PYWKSNGFVNNKKKPLKHISKWKSIAECLSMKPDITIQHEKGISLQIPVFILKGNALADKLATQGSYVVN 4459
FOAMV_P14350_2mutA	MNPLQLLQPLPAEIKGTKLLAHWNSGATITCIPESFLEDEQPIKKTLIKTIHGEKQQNVYYVTFKVKGRKVEAEVIASPYEYILLSPTDVPWLTQQPLQ LTILVPLQEYQEKILSKTALPEDQKQQLKTLFVKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLTPQNS TMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFLN SPALFNADVVDLLKEIPNVQVYVDDIYLSHDDPKEHVQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQKTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNITPPKDLK QLQSILGKLNFARNFIPNFAELVQPLYNLIAPAKGKYIEWSEENTKQLNMVIEALNTASNLEERLPEQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNETGKKPIMYLN YVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYTSSQSP VKHPSQYEGVFYTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHATYKPEYQVLNQWSIPLGNHTAQMAEIAAVEFACKKALKIPGPVLVITDSFYVAESANKEL PYWKSNGFVNNKKKPLKHISKWKSIAECLSMKPDITIQHEKGISLQIPVFILKGNALADKLATQGSYVVN 4460
FOAMV_P14350-Pro	VPWLTQQPLQLTILVPLQEYQEKILSKTALPEDQKQQLKTLFVKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLL KQGVLTPQNSTMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYC WTRLPQGFLNSPALFTADVVDLLKEIPNVQVYVDDIYLSHDDPKEHVQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQKTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTK LLNITPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFAELVQPLYNLIASAKGKYIEWSEENTKQLNMVIEALNTASNLEERLPEQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNE TGKKPIMYLNYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHI PDVYTSSQSPVKHPSQYEGVFYTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHATYKPEYQVLNQWSIPLGNHTAQMAEIAAVEFACKKALKIPGPVLVITDSF YVAESANKELPYWKSNGFVNNKKKPLKHISKWKSIAECLSMKPDITIQHEKGISLQIPVFILKGNALADKLATQGSYVVN 4461
FOAMV_P14350-Pro_2mut	VPWLTQQPLQLTILVPLQEYQEKILSKTALPEDQKQQLKTLFVKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLL KQGVLTPQNSTMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYC WTRLPQGFLNSPALFNADVVDLLKEIPNVQVYVDDIYLSHDDPKEHVQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQKTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTK LLNITPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFAELVQPLYNLIAPAKGKYIEWSEENTKQLNMVIEALNTASNLEERLPEQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNE TGKKPIMYLNYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHI PDVYTSSQSPVKHPSQYEGVFYTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHATYKPEYQVLNQWSIPLGNHTAQMAEIAAVEFACKKALKIPGPVLVITDSF YVAESANKELPYWKSNGFVNNKKKPLKHISKWKSIAECLSMKPDITIQHEKGISLQIPVFILKGNALADKLATQGSYVVN 4462
FOAMV_P14350-Pro_2mutA	VPWLTQQPLQLTILVPLQEYQEKILSKTALPEDQKQQLKTLFVKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLL KQGVLTPQNSTMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYC WTRLPQGFLNSPALFNADVVDLLKEIPNVQVYVDDIYLSHDDPKEHVQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQKTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTK	4463

【０１１４】

【表２－４】

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
	LLNITPPKDLKQLQSILGKLNFARNFIPNFAELVQPLYNLIAPAKGKYIEWSEENTKQLNMVIEALNTASNLEERLPEQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNE TGKKPIMYLNYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHI PDVYTSSQSPVKHPSQYEGVFYTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHATYKPEYQVLNQWSIPLGNHTAQMAEIAAVEFACKKALKIPGPVLVITDSF YVAESANKELPYWKSNGFVNNKKKPLKHISKWKSIAECLSMKPDITIQHEKGISLQIPVFILKGNALADKLATQGSYVVN	
GALV_P21414	VLNLEEEYRLHEKPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPVAVRQYPMSKEAREGIRPHIQKFLDLGVLVPCRSPWNT PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSYTWYSVLDLKDAFFCLRLHPNSQPLFAFEWKDPEKGNTGQLTWTRLPQG FKNSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLVAAPTYEDCKKGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQREVTYLGYLLKEGKRWLTPARKA TVMKIPVPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQQAFDHIKKALLSAPALALPDLTKPFTLYIDERAGVARGVLTQTL GPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLTLGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPA TLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLEDQPLPGVPTWYTDGSSFITEGKRRAGAPIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQALRLAEGKN INIYTDSRYAFATAHIHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPRRVAIIHCPGHQRGSNPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAGTTKP	4464
GALV_P21414_3mut	VLNLEEEYRLHEKPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPVAVRQYPMSKEAREGIRPHIQKFLDLGVLVPCRSPWNT PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSYTWYSVLDLKDAFFCLRLHPNSQPLFAFEWKDPEKGNTGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLVAAPTYEDCKKGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQREVTYLGYLLKEGKRWLTPARKA TVMKIPVPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKPSIPFIWTEEHQQAFDHIKKALLSAPALALPDLTKPFTLYIDERAGVARGVLTQTL GPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLTLGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPA TLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLEDQPLPGVPTWYTDGSSFITEGKRRAGAPIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQALRLAEGKN INIYTDSRYAFATAHIHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPRRVAIIHCPGHQRGSNPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAGTTKP	4465
GALV_P21414_3mutA	VLNLEEEYRLHEKPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPVAVRQYPMSKEAREGIRPHIQKFLDLGVLVPCRSPWNT PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSYTWYSVLDLKDAFFCLRLHPNSQPLFAFEWKDPEKGNTGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLVAAPTYEDCKKGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQREVTYLGYLLKEGKRWLTPARKA TVMKIPVPTTPRQVREFLGKAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTKPSIPFIWTEEHQQAFDHIKKALLSAPALALPDLTKPFTLYIDERAGVARGVLTQTL GPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLTLGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPA TLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLEDQPLPGVPTWYTDGSSFITEGKRRAGAPIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQALRLAEGKN INIYTDSRYAFATAHIHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPRRVAIIHCPGHQRGSNPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAGTTKP	4466
HTL1A_P03362	AVLGLEHLPRPPQISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTIDLSSSSPGPPDLSSLPTTLAHL QTIDLRDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWKVLPQGFKNSPTLFEMQLAHILQPIRQAFPQCTILQYMDDILLASPSHEDLLLLSEA TMASLISHGLPVSENKTQQTPGTIKFLGQIISPNHLTYDAVPTVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQRHTDPRDQIYLNPS QVQSLVQLRQALSQNCRSRLVQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKEQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNIS TQTFNQFIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTAAPLAPVKALMPVFTLSPVIINTAPCLFSDGSTSRAAYILWDKQILSQRSFPLPP PHKSAQRAELLGLLHGLSSARSWRCLNIFLDSKYLYHYLRTLALGTFQGRSSQAPFQALLPRLLSRKVVYLHHVRSHTNLPDPISRLNALTDALLIT PVLQL	4467
HTL1A_P03362_2mut	AVLGLEHLPRPPQISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTIDLSSSSPGPPDLSSLPTTLAHL QTIDLRDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWKVLPQGFKNSPTLFQMQLAHILQPIRQAFPQCTILQYMDDILLASPSHEDLLLLSEA TMASLISHGLPVSENKTQQTPGTIKFLGQIISPNHLTYDAVPTVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQPHTDPRDQIYLNPS QVQSLVQLRQALSQNCRSRLVQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKEQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNIS TQTFNQFIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTAAPLAPVKALMPVFTLSPVIINTAPCLFSDGSTSRAAYILWDKQILSQRSFPLPP PHKSAQRAELLGLLHGLSSARSWRCLNIFLDSKYLYHYLRTLALGTFQGRSSQAPFQALLPRLLSRKVVYLHHVRSHTNLPDPISRLNALTDALLIT PVLQL	4468
HTL1A_P03362_2mutB	AVLGLEHLPRPPQISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTIDLSSSSPGPPDLSSPPTTLAHL QTIDLRDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWKVLPQGFKNSPTLFQMQLAHILQPIRQAFPQCTILQYMDDILLASPSHEDLLLLSEA TMASLISHGLPVSENKTQQTPGTIKFLGQIISPNHLTYDAVPTVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQPHTDPRDQIYLNPS QVQSLVQLRQALSQNCRSRLVQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKEQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNIS TQTFNQFIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTAAPLAPVKALMPVFTLSPVIINTAPCLFSDGSTSRAAYILWDKQILSQRSFPLPP PHKSAQRAELLGLLHGLSSARSWRCLNIFLDSKYLYHYLRTLALGTFQGRSSQAPFQALLPRLLSRKVVYLHHVRSHTNLPDPISRLNALTDALLIT PVLQL	4469
HTL1C_P14078	AVLGLEHLPRPPEISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTIDLSSSSPGPPDLSSLPTTLAHL QTIDLKDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWRVLPQGFKNSPTLFEMQLAHILQPIRQAFPQCTILQYMDDILLASPSHADLQLLSEA TMASLISHGLPVSENKTQQTPGTIKFLGQIISPNHLTYDAVPKVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQRHTDPRDQIYLNP SQVQSLVQLRQALSQNCRSRLVQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKQQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNI STQTFNQFIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTTAPLAPVKALMPVFTLSPVIINTAPCLFSDGSTSQAAYILWDKHILSQRSFPLP PPHKSAQRAELLGLLHGLSSARSWRCLNIFLDSKYLYHYLRTLALGTFQGRSSQAPFQALLPRLLSRKVVYLHHVRSHTNLPDPISRLNALTDALLI TPVLQL	4470
HTL1C_P14078_2mut	AVLGLEHLPRPPEISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTIDLSSSSPGPPDLSSLPTTLAHL QTIDLKDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWRVLPQGFKNSPTLFQMQLAHILQPIRQAFPQCTILQYMDDILLASPSHADLQLLSEA TMASLISHGLPVSENKTQQTPGTIKFLGQIISPNHLTYDAVPKVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQRHTDPRDQIYLNPS QVQSLVQLRQALSQNCRSRLVQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKQQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNIS TQTFNQFIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTTAPLAPVKALMPVFTLSPVIINTAPCLFSDGSTSQAAYILWDKHILSQRSFPLPP PHKSAQRAELLGLLHGLSSARSWRCLNIFLDSKYLYHYLRTLALGTFQGRSSQAPFQALLPRLLSRKVVYLHHVRSHTNLPDPISRLNALTDALLI TPVLQL	4471
HTL1L_P0C211	GLEHLPRPPEISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTVDLSSSSPGPPDLSSLPTTLAHLQTI DLKDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWKVLPQGFKNSPTLFEMQLASILQPIRQAFPQCVILQYMDDILLASPSPEDLQQLSEATM ASLISHGLPVSQDKTQQTPGTIKFLGQIISPNHITYDAVPTVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQGHTDPRDQIYLNPSQV QSLMQLQQALSQNCRSRLAQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKQQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNISIQ TFNQFIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTAAPLAPVKALTPVFTLSPIIINTAPCLFSDGSTSQAAYILWDKHILSQRSFPLPPHK SAQQAELLGLLHGLSSARSWHCLNIFLDSKYLYHYLRTLALGTFQGKSSQAPFQALLPRLLAHKVIYLHHVRSHTNLPDPISKLNALTDALLITPIL	4472
HTL1L_P0C211_2mut	GLEHLPRPPEISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTVDLSSSSPGPPDLSSLPTTLAHLQTI DLKDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWKVLPQGFKNSPTLFQMQLASILQPIRQAFPQCVILQYMDDILLASPSPEDLQQLSEATM ASLISHGLPVSQDKTQQTPGTIKFLGQIISPNHITYDAVPTVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQGHTDPRDQIYLNPSQV	4473

【０１１５】

【表２－５】

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
	QSLMQLQQALSQNCRSRLAQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKQQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNISIQ TFNQFIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTAAPLAPVKALTPVFTLSPIIINTAPCLFSDGSTSQAAYILWDKHILSQRSFPLPPPHK SAQQAELLGLLHGLSSARSWHCLNIFLDSKYLYHYLRTLAWGTFQGKSSQAPFQALLPRLLAHKVIYLHHVRSHTNLPDPISKLNALTDALLITPIL	
HTL1L_P0C211_2mutB	GLEHLPRPPEISQFPLNPERLQALQHLVRKALEAGHIEPYTGPGNNPVFPVKKANGTWRFIHDLRATNSLTVDLSSSSPGPPDLSSPPTTLAHLQTI DLKDAFFQIPLPKQFQPYFAFTVPQQCNYGPGTRYAWKVLPQGFKNSPTLFQMQLASILQPIRQAFPQCVILQYMDDILLASPSPEDLQQLSEATM ASLISHGLPVSQDKTQQTPGTIKFLGQIISPNHITYDAVPTVPIRSRWALPELQALLGEIQWVSKGTPTLRQPLHSLYCALQGHTDPRDQIYLNPSQV QSLMQLQQALSQNCRSRLAQTLPLLGAIMLTLTGTTTVVFQSKQQWPLVWLHAPLPHTSQCPWGQLLASAVLLLDKYTLQSYGLLCQTIHHNISIQ TFNQFIQTSDHPSVPILLHHSHRFKNLGAQTGELWNTFLKTAAPLAPVKALTPVFTLSPIIINTAPCLFSDGSTSQAAYILWDKHILSQRSFPLPPPHK SAQQAELLGLLHGLSSARSWHCLNIFLDSKYLYHYLRTLAWGTFQGKSSQAPFQALLPRLLAHKVIYLHHVRSHTNLPDPISKLNALTDALLITPIL	4474
HTL32_Q0R5R2	GLEHLPPPPEVSQFPLNPERLQALTDLVSRALEAKHIEPYQGPGNNPIFPVKKPNGKWRFIHDLRATNSVTRDLASPSPGPPDLTSLPQGLPHLRTI DLTDAFFQIPLPTIFQPYFAFTLPQPNNYGPGTRYSWRVLPQGFKNSPTLFEQQLSHILTPVRKTFPNSLIIQYMDDILLASPAPGELAALTDKVTNA LTKEGLPLSPEKTQATPGPIHFLGQVISQDCITYETLPSINVKSTWSLAELQSMLGELQWVSKGTPVLRSSLHQLYLALRGHRDPRDTIKLTSIQVQ ALRTIQKALTLNCRSRLVNQLPILALIMLRPTGTTAVLFQTKQKWPLVWLHTPHPATSLRPWGQLLANAVIILDKYSLQHYGQVCKSFHHNISNQAL TYYLHTSDQSSVAILLQHSHRFHNLGAQPSGPWRSLLQMPQIFQNIDVLRPPFTISPVVINHAPCLFSDGSASKAAFIIWDRQVIHQQVLSLPSTCS AQAGELFGLLAGLQKSQPWVALNIFLDSKFLIGHLRRMALGAFPGPSTQCELHTQLLPLLQGKTVYVHHVRSHTLLQDPISRLNEATDALMLAPLLP L	4475
HTL32_Q0R5R2_2mut	GLEHLPPPPEVSQFPLNPERLQALTDLVSRALEAKHIEPYQGPGNNPIFPVKKPNGKWRFIHDLRATNSVTRDLASPSPGPPDLTSLPQGLPHLRTI DLTDAFFQIPLPTIFQPYFAFTLPQPNNYGPGTRYSWRVLPQGFKNSPTLFQQQLSHILTPVRKTFPNSLIIQYMDDILLASPAPGELAALTDKVTNA LTKEGLPLSPEKTQATPGPIHFLGQVISQDCITYETLPSINVKSTWSLAELQSMLGELQWVSKGTPVLRSSLHQLYLALRGHRDPRDTIKLTSIQVQ ALRTIQKALTLNCRSRLVNQLPILALIMLRPTGTTAVLFQTKQKWPLVWLHTPHPATSLRPWGQLLANAVIILDKYSLQHYGQVCKSFHHNISNQAL TYYLHTSDQSSVAILLQHSHRFHNLGAQPSGPWRSLLQMPQIFQNIDVLRPPFTISPVVINHAPCLFSDGSASKAAFIIWDRQVIHQQVLSLPSTCS AQAGELFGLLAGLQKSQPWVALNIFLDSKFLIGHLRRMAWGAFPGPSTQCELHTQLLPLLQGKTVYVHHVRSHTLLQDPISRLNEATDALMLAPLLP PL	4476
HTL32_Q0R5R2_2mutB	GLEHLPPPPEVSQFPLNPERLQALTDLVSRALEAKHIEPYQGPGNNPIFPVKKPNGKWRFIHDLRATNSVTRDLASPSPGPPDLTSPPQGLPHLRT IDLTDAFFQIPLPTIFQPYFAFTLPQPNNYGPGTRYSWRVLPQGFKNSPTLFQQQLSHILTPVRKTFPNSLIIQYMDDILLASPAPGELAALTDKVTNA LTKEGLPLSPEKTQATPGPIHFLGQVISQDCITYETLPSINVKSTWSLAELQSMLGELQWVSKGTPVLRSSLHQLYLALRGHRDPRDTIKLTSIQVQ ALRTIQKALTLNCRSRLVNQLPILALIMLRPTGTTAVLFQTKQKWPLVWLHTPHPATSLRPWGQLLANAVIILDKYSLQHYGQVCKSFHHNISNQAL TYYLHTSDQSSVAILLQHSHRFHNLGAQPSGPWRSLLQMPQIFQNIDVLRPPFTISPVVINHAPCLFSDGATSKAAFILWDKQVIHQQVLPLPSTCSAQA GELFGLLAGLQKSKPWPALNIFLDSKFLIGHLRRMALGAFLGPSTQCDLHARLFPLLQGKTVYVHHVRSHTLLQDPISRLNEATDALMLAPLLPL	4477
HTL3P_Q4U0X6	GLEHLPPPPEVSQFPLNPERLQALTDLVSRALEAKHIEPYQGPGNNPIFPVKKPNGKWRFIHDLRATNSLTRDLASPSPGPPDLTSLPQDLPHLRTI DLTDAFFQIPLPAVFQPYFAFTLPQPNNHGPGTRYSWRVLPQGFKNSPTLFEQQLSHILAPVRKAFPNSLIIQYMDDILLASPALRELTALTDKVTNA LTKEGLPMSLEKTQATPGSIHFLGQVISPDCITYETLPSIHVKSIWSLAELQSMLGELQWVSKGTPVLRSSLHQLYLALRGHRDPRDTIELTSTQVQ ALKTIQKALALNCRSRLVSQLPILALIILRPTGTTAVLFQTKQKWPLVWLHTPHPATSLRPWGQLLANAIITLDKYSLQHYGQICKSFHHNISNQALTY YLHTSDQSSVAILLQHSHRFHNLGAQPSGPWRSLLQVPQIFQNIDVLRPPFIISPVVIDHAPCLFSDGATSKAAFILWDKQVIHQQVLPLPSTCSAQA GELFGLLAGLQKSKPWPALNIFLDSKFLIGHLRRMALGAFLGPSTQCDLHARLFPLLQGKTVYVHHVRSHTLLQDPISRLNEATDALMLAPLLPL	4478
HTL3P_Q4U0X6_2mut	GLEHLPPPPEVSQFPLNPERLQALTDLVSRALEAKHIEPYQGPGNNPIFPVKKPNGKWRFIHDLRATNSLTRDLASPSPGPPDLTSLPQDLPHLRTI DLTDAFFQIPLPAVFQPYFAFTLPQPNNHGPGTRYSWRVLPQGFKNSPTLFQQQLSHILAPVRKAFPNSLIIQYMDDILLASPALRELTALTDKVTNA LTKEGLPMSLEKTQATPGSIHFLGQVISPDCITYETLPSIHVKSIWSLAELQSMLGELQWVSKGTPVLRSSLHQLYLALRGHRDPRDTIELTSTQVQ ALKTIQKALALNCRSRLVSQLPILALIILRPTGTTAVLFQTKQKWPLVWLHTPHPATSLRPWGQLLANAIITLDKYSLQHYGQICKSFHHNISNQALTY YLHTSDQSSVAILLQHSHRFHNLGAQPSGPWRSLLQVPQIFQNIDVLRPPFIISPVVIDHAPCLFSDGATSKAAFILWDKQVIHQQVLPLPSTCSAQA GELFGLLAGLQKSKPWPALNIFLDSKFLIGHLRRMAWGAFLGPSTQCDLHARLFPLLQGKTVYVHHVRSHTLLQDPISRLNEATDALMLAPLLPL	4479
HTL3P_Q4U0X6_2mutB	GLEHLPPPPEVSQFPLNPERLQALTDLVSRALEAKHIEPYQGPGNNPIFPVKKPNGKWRFIHDLRATNSLTRDLASPSPGPPDLTSPPQDLPHLRTI DLTDAFFQIPLPAVFQPYFAFTLPQPNNHGPGTRYSWRVLPQGFKNSPTLFQQQLSHILAPVRKAFPNSLIIQYMDDILLASPALRELTALTDKVTNA LTKEGLPMSLEKTQATPGSIHFLGQVISPDCITYETLPSIHVKSIWSLAELQSMLGELQWVSKGTPVLRSSLHQLYLALRGHRDPRDTIELTSTQVQ ALKTIQKALALNCRSRLVSQLPILALIILRPTGTTAVLFQTKQKWPLVWLHTPHPATSLRPWGQLLANAIITLDKYSLQHYGQICKSFHHNISNQALTY YLHTSDQSSVAILLQHSHRFHNLGAQPSGPWRSLLQVPQIFQNIDVLRPPFIISPVVIDHAPCLFSDGATSKAAFILWDKQVIHQQVLPLPSTCSAQA GELFGLLAGLQKSKPWPALNIFLDSKFLIGHLRRMAWGAFLGPSTQCDLHARLFPLLQGKTVYVHHVRSHTLLQDPISRLNEATDALMLAPLLPL	4480
HTLV2_P03363_2mut	HLPPPPQVDQFPLNLPERLQALNDLVSKALEAGHIEPYSGPGNNPVFPVKKPNGKWRFIHDLRATNAITTTLTSPSPGPPDLTSLPTALPHLQTIDL TDAFFQIPLPKQYQPYFAFTIPQPCNYGPGTRYAWTVLPQGFKNSPTLFQQQLAAVLNPMRKMFPTSTIVQYMDDILLASPTNEELQQLSQLTLQA LTTHGLPISQEKTQQTPGQIRFLGQVISPNHITYESTPTIPIKSQWTLTELQVILGEIQWVSKGTPILRKHLQSLYSALHPYRDPRACITLTPQQLHALH AIQQALQHNCRGRLNPALPLLGLISLSTSGTTSVIFQPKQNWPLAWLHTPHPPTSLCPWGHLLACTILTLDKYTLQHYGQLCQSFHHNMSKQALCD FLRNSPHPSVGILIHHMGRFHNLGSQPSGPWKTLLHLPTLLQEPRLLRPIFTLSPVVLDTAPCLFSDGSPQKAAYVLWDQTILQQDITPLPSHETHS AQKGELLALICGLRAAKPWPSLNIFLDSKYLIKYLHSLAIGAFLGTSAHQTLQAALPPLLQGKTIYLHHVRSHTNLPDPISTFNEYTDSLILAPLVPL	4481
JSRV_P31623	PLGTSDSPVTHADPIDWKSEEPVWVDQWPLTQEKLSAAQQLVQEQLRLGHIEPSTSAWNSPIFVIKKKSGKWRLLQDLRKVNETMMHMGALQP GLPTPSAIPDKSYIIVIDLKDCFYTIPLAPQDCKRFAFSLPSVNFKEPMQRYQWRVLPQGMTNSPTLCQKFVATAIAPVRQRFPQLYLVHYMDDILLA HTDEHLLYQAFSILKQHLSLNGLVIADEKIQTHFPYNYLGFSLYPRVYNTQLVKLQTDHLKTLNDFQKLLGDINWIRPYLKLPTYTLQPLFDILKGDSD PASPRTLSLEGRTALQSIEEAIRQQQITYCDYQRSWGLYILPTPRAPTGVLYQDKPLRWIYLSATPTKHLLPYYELVAKIIAKGRHEAIQYFGMEPPFI CVPYALEQQDWLFQFSDNWSIAFANYPGQITHHYPSDKLLQFASSHAFIFPKIVRRQPIPEATLIFTDGSSNGTAALIINHQTYYAQTSFSSAQVVEL FAVHQALLTVPTSFNLFTDSSYVVGALQMIETVPIIGTTSPEVLNLFTLIQQVLHCRQHPCFFGHIRAHSTLPGALVQGNHTADVLTKQVFFQS	4482
JSRV_P31623_2mutB	PLGTSDSPVTHADPIDWKSEEPVWVDQWPLTQEKLSAAQQLVQEQLRLGHIEPSTSAWNSPIFVIKKKSGKWRLLQDLRKVNETMMHMGALQP GLPTPSPIPDKSYIIVIDLKDCFYTIPLAPQDCKRFAFSLPSVNFKEPMQRYQWRVLPQGMTNSPTLCQKFVATAIAPVRQRFPQLYLVHYMDDILLA HTDEHLLYQAFSILKQHLSLNGLVIADEKIQTHFPYNYLGFSLYPRVYNTQLVKLQTDHLKTLNDFQKLLGDINWIRPYLKLPTYTLQPLFDILKGDSD PASPRTLSLEGRTALQSIEEAIRQQQITYCDYQRSWGLYILPTPRAPTGVLYQDKPLRWIYLSATPTKHLLPYYELVAKIIAKGRHEAIQYFGMEPPFI CVPYALEQQDWLFQFSDNWSIAFANYPGQITHHYPSDKLLQFASSHAFIFPKIVRRQPIPEATLIFTDGSSNGTAALIINHQTYYAQTSFSSAQVVEL FAVHQALLTVPTSFNLFTDSSYVVGALQMIETVPIIGTTSPEVLNLFTLIQQVLHCRQHPCFFGHIRAHSTLPGALVQGNHTADVLTKQVFFQS	4483
KORV_Q9TTC1	TLGDQGSRGSDPLPEPRVTLTVEGIPTEFLVNTGAEHSVLTKPMGKMGSKRTVVAGATGSKVYPWTTKRLLKIGQKQVTHSFLVIPECPAPLLGR DLLTKLKAQIQFSTEGPQVTWEDRPAMCLVLNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASPVAVRQYPMS KEAREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPN	4484

【０１１６】

【表２－６】

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
	SQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSAK KAQLCREEVTYLGYLLKGGKRWLTPARKATVMKIPTPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAHQEAFGRIKEALLS APALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLTLGQNVLVIAPHNLESIVRQPPDR WMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRDQPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTV WASNLPEGTSAQKAELIALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQRGTDPVA TGNRKADEAAKQAAQSTRILTETTKN	
KORV_Q9T TC1_3mut	TLGDQGSRGSDPLPEPRVTLTVEGIPTEFLVNTGAEHSVLTKPMGKMGSKRTVVAGATGSKVYPWTTKRLLKIGQKQVTHSFLVIPECPAPLLGR DLLTKLKAQIQFSTEGPQVTWEDRPAMCLVLNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASPVAVRQYPMS KEAREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPN SQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSAK KAQLCREEVTYLGYLLKGGKRWLTPARKATVMKIPTPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTRPKVPFTWTEAHQEAFGRIKEALLS APALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLTLGQNVLVIAPHNLESIVRQPPDR WMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRDQPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTV WASNLPEGTSAQKAELIALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQRGTDPV ATGNRKADEAAKQAAQSTRILTETTKN	4485
KORV_Q9T TC1_3mutA	TLGDQGSRGSDPLPEPRVTLTVEGIPTEFLVNTGAEHSVLTKPMGKMGSKRTVVAGATGSKVYPWTTKRLLKIGQKQVTHSFLVIPECPAPLLGR DLLTKLKAQIQFSTEGPQVTWEDRPAMCLVLNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASPVAVRQYPMS KEAREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPN SQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYRVSAK KAQLCREEVTYLGYLLKGGKRWLTPARKATVMKIPTPTTPRQVREFLGKAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTRPKVPFTWTEAHQEAFGRIKEALLS APALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLTLGQNVLVIAPHNLESIVRQ WMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRDQPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDNKRTV WASNLPEGTSAQKAELIALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQRGTDPV ATGNRKADEAAKQAAQSTRILTETTKN	4486
KORV_Q9T TC1-Pro	LLGRDLLTKLKAQIQFSTEGPQVTWEDRPAMCLVLNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASPVAVRQ YPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLK LHPNSQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYR VSAKKAQLCREEVTYLGYLLKGGKRWLTPARKATVMKIPTPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTREKVPFTWTEAHQEAFGRIKE ALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAIAAVALLKDADKLTLGQNVLVIAPHNLESIVRQ PPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRDQPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDN KRTVWASNLPEGTSAQKAELIALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQRGT DPVATGNRKADEAAKQAAQSTRILTETTKN	4487
KORV_Q9T TC1-Pro_3mut	LLGRDLLTKLKAQIQFSTEGPQVTWEDRPAMCLVLNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASPVAVRQ YPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLK LHPNSQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYR VSAKKAQLCREEVTYLGYLLKGGKRWLTPARKATVMKIPTPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTRPKVPFTWTEAHQEAFGRIKE ALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAIAAVALLLKDADKLTLGQNVLVIAPHNLESIVRQ PPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRDQPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDN KRTVWASNLPEGTSAQKAELIALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQRGT DPVATGNRKADEAAKQAAQSTRILTETTKN	4488
KORV_Q9T TC1-Pro_3mutA	LLGRDLLTKLKAQIQFSTEGPQVTWEDRPAMCLVLNLEEEYRLHEKPVPPSIDPSWLQLFPMVWAEKAGMGLANQVPPVVVELKSDASPVAVRQ YPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLK LHPNSQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLASFRALNPQVVMLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTRRLLQELSKLGYR VSAKKAQLCREEVTYLGYLLKGGKRWLTPARKATVMKIPTPTTPRQVREFLGKAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTRPKVPFTWTEAHQEAFGRIKE ALLSAPALALPDLTKPFALYVDEKEGVARGVLTQTLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAIAAVALLKDADKLTLGQNVLVIAPHNLESIVRQ PPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAILNPATLLPVESDDTPIHICSEILAEETGTRPDLRDQPLPGVPAWYTDGSSFIMDGRRQAGAAIVDN KRTVWASNLPEGTSAQKAELIALTQALRLAEGKSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQRGT DPVATGNRKADEAAKQAAQSTRILTETTKN	4489
MLVAV_P03356	TLNLEDEYRLYETSAEPEVSPGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEAKLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNT PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHRWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQ GFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLLTLGNLGYRASAKKAQLCQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKE TVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVL TQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLRKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGP VVALNPATLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQAL KMAEGKRLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTS TLL	4490
MLVAV_P03356_3mut	TLNLEDEYRLYETSAEPEVSPGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEAKLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNT PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHRWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQ GFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLLTLGNLGYRASAKKAQLCQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKE TVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVL TQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLRKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGP VVALNPATLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQAL KMAEGKRLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDT STLL	4491
MLVAV_P03356_3mutA	TLNLEDEYRLYETSAEPEVSPGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEAKLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNT PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHRWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQ GFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLLTLGNLGYRASAKKAQLCQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKE TVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVL TQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLRKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGP	4492

【０１１７】

【表２－７】

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
	VVALNPATLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQAL KMAEGKRLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAARE AAIKTPPDT STLL	
MLVBM_Q7SVK7	TLGIEDEYRLHETSTEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIQQYPMSHEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETV MGQPVPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFSWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVA LNPATLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAGALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKRLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLL	4493
MLVBM_Q7SVK7	TLGIEDEYRLHETSTEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIQQYPMSHEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKETV MGQPVPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFSWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVA LNPATLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAGALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKRLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLL	4493
MLVBM_Q7SVK7_3mut	TLGIEDEYRLHETSTEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIQQYPMSHEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKETV MGQPVPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFSWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVA LNPATLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAGALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKRLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLL	4494
MLVBM_Q7SVK7_3mut	TLGIEDEYRLHETSTEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIQQYPMSHEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKETV MGQPVPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFSWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVA LNPATLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAGALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKRLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLL	4494
MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS	LGIEDEYRLHETSTEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIQQYPMSHEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQGF KNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKETV MGQPVPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFSWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVA LNPATLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAGALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKRLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLLI	4495
MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS	LGIEDEYRLHETSTEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIQQYPMSHEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPL LPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGMGISGQLTWTRLPQGF KNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDILLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKETV MGQPVPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFSWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPVVA LNPATLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAGALPAGTSAQRAELIALTQALKMA EGKRLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTSTLLI	4495
MLVCB_P08361	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFDEALHRDLAGFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET VMGQPIPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAFQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVV ALNPATLLPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRSDLMDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALK MAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNSAEARGNRMADQAARE VATRETPET STLL	4496
MLVCB_P08361_3mut	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLAGFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET VMGQPIPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAFQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVV ALNPATLLPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRSDLMDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALK MAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNSAEARGNRMADQAARE VATRETPET STLL	4497
MLVCB_P08361_3mutA	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLAGFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET VMGQPIPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFSWGPDQQKAFQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVA LNPATLLPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRSDLMDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALKM AEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNSAEARGNRMADQAARE VATRETPETST LL	4498

【０１１８】

【表２－８】

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
MLVF5_P26810	TLNIEDEYRLHETSKGPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAFRQAPLIISLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQSLFAFEWKDPEMGISGQLTWTRLPQGF KNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETV MGQPTPKTPRQLREFLGTAGLCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFKWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDVGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPIVAL NPATLLPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRRAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA AGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNHAEARGNRMADQAARE VATRETPETSTLL	4499
MLVF5_P26810_3mut	TLNIEDEYRLHETSKGPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAFRQAPLIISLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQSLFAFEWKDPEMGISGQLTWTRLPQGF KNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETV MGQPTPKTPRQLREFLGTAGLCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFKWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDVGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPIVAL NPATLLPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRRAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA AGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNHAEARGNRMADQAARE VATRETPETSTL L	4500
MLVF5_P26810_3mutA	TLNIEDEYRLHETSKGPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAFRQAPLIISLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQSLFAFEWKDPEMGISGQLTWTRLPQGF KNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETV MGQPTPKTPRQLREFLGKAGLCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFKWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQ KLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDVGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPIVAL NPATLLPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRRAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMA AGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNHAEARGNRMADQAARE VATRETPETSTL L	4501
MLVFF_P26809_3mut	TLNIEDEYRLHETSKGPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNT PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQSLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQ GFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKE TVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFEWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVL TQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPIV ALNPATLLPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVVWAKALPAGTSAQRAELIALTQALK MAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNRAEARGNRMADQAAREVATRETPET STLL	4502
MLVFF_P26809_3mutA	TLNIEDEYRLHETSKGPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNT PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQSLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQ GFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGDLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKE TVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFEWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVL TQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPIV ALNPATLLPLPEEGLQHDCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVVWAKALPAGTSAQRAELIALTQALK MAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNRAEARGNRMADQAAREVATRETPET STLL	4503
MLVMS_P03355	TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET VMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFEWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVV ALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKM AEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTL L	4013
MLVMS_P03355	TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET VMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVV ALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKM AEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LL	4504
MLVMS_P03355_3mut	TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET VMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVV ALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKM	4504

【０１１９】

【表２－９】

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
	AEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LL	
MLVMS_P03355_3mutA_WS	TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET VMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVV ALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKM AEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LL	4505
MLVMS_P03355_3mutA_WS	TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET VMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVV ALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKM AEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LL	4505
MLVMS_P03355_PLV919	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET VMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVV ALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKM AEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSPSGGSKRTADGSEFE	4506
MLVMS_P03355_PLV919	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET VMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVV ALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKM AEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSPSGGSKRTADGSEFE	4506
MLVRD_P11227	TLNIEDEYRLHEISTEPDVSPGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEAKLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQGLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPTSHRWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFASEWRDPGMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFDEALHRGLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLKTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKET VMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPRFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYHEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPV VALNPATLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTEPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALK MAEGKRLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYKRRGLLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTST LL	4507
MLVRD_P11227_3mut	TLNIEDEYRLHEISTEPDVSPGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEAKLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQGLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPTSHRWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFASEWRDPGMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRGLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLKTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLREGQRWLTEARKET VMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPRFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYHEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPV VALNPATLLPLPEEGAPHDCLEILAETHGTEPDLTDQPIPDADHTWYTDGSSFLQEGQRKAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALK MAEGKRLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYKRRGWLTSEGREIKNKSEILALLKALFLPKRLSIIHCLGHQKGDSAEARGNRLADQAAREAAIKTPPDTST LL	4508
MMTVB_P03365	WVQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLNTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRD IMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQ DLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTV RDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFL KLTTGELKPLFEILNGDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQL IIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQG REPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYA DSLTRILT	4509
MMTVB_P03365	WVQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLNTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRD IMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQ DLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTV RDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFL KLTTGELKPLFEILNGDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQL IIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQG REPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYA DSLTRILT	4509
MMTVB_P03365_2mut	WVQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLNTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRD IMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQ DLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTV	4510

【０１２０】

【表２－１０】

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
	RDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFL KLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQL IIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQG REPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYA DSLTRILT	
MMTVB_P03365_2mut_WS	VQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLDTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDIM KDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDL RAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRD KYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKL TTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIIK GRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGRE PIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSL TRILTA	4511
MMTVB_P03365_2mut_WS	VQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLDTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDIM KDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDL RAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRD KYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKL TTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIIK GRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGRE PIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSL TRILTA	4511
MMTVB_P03365_2mutB	WVQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLNTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRD IMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQ DLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAPPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTV RDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFL KLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQL IIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQG REPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYA DSLTRILT	4512
MMTVB_P03365_2mutB	WVQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLNTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRD IMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQ DLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAPPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTV RDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFL KLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQL IIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQG REPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYA DSLTRILT	4512
MMTVB_P03365_2mutB_WS	VQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLDTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDIM KDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDL RAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRD KYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKL TTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIIK GRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGRE PIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSL TRILTA	4513
MMTVB_P03365_2mutB_WS	VQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLDTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDIM KDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDL RAVNATMHDMGALQPGLPSPPAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRD KYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKL TTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIIK GRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGRE PIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSL TRILTA	4513
MMTVB_P03365_WS	VQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLDTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDIM KDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDL RAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRD KYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKL TTGELKPLFEILNGDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIIK GRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGRE PIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSL TRILTA	4514
MMTVB_P03365_WS	VQEISDSRPMLHIYLNGRRFLGLLDTGADKTCIAGRDWPANWPIHQTESSLQGLGMACGVARSSQPLRWQHEDKSGIIHPFVIPTLPFTLWGRDIM KDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKWRLLQDL RAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDKAILTVRD KYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWIRPFLKL TTGELKPLFEILNGDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIFCTQLIIK GRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVTYIQGRE PIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGNAYADSL TRILTA	4514

【０１２１】

【表２－１１】

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
MMTVB_P03365-Pro	GRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKW RLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDK AILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWI RPFLKLTTGELKPLFEILNGDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIF CTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVT YIQGREPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGN AYADSLTRILT	4515
MMTVB_P03365-Pro	GRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKW RLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDK AILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWI RPFLKLTTGELKPLFEILNGDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIF CTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVT YIQGREPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGN AYADSLTRILT	4515
MMTVB_P03365-Pro_2mut	GRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKW RLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDK AILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWI RPFLKLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIF CTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVT YIQGREPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGN AYADSLTRILT	4516
MMTVB_P03365-Pro_2mut	GRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKW RLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDK AILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWI RPFLKLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIF CTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVT YIQGREPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGN AYADSLTRILT	4516
MMTVB_P03365-Pro_2mutB	GRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKW RLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDK AILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWI RPFLKLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIF CTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVT YIQGREPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGN AYADSLTRILT	4517
MMTVB_P03365-Pro_2mutB	GRDIMKDIKVRLMTDSPDDSQDLMIGAIESNLFADQISWKSDQPVWLNQWPLKQEKLQALQQLVTEQLQLGHLEESNSPWNTPVFVIKKKSGKW RLLQDLRAVNATMHDMGALQPGLPSPVAVPKGWEIIIIDLQDCFFNIKLHPEDCKRFAFSVPSPNFKRPYQRFQWKVLPQGMKNSPTLCQKFVDK AILTVRDKYQDSYIVHYMDDILLAHPSRSIVDEILTSMIQALNKHGLVVSTEKIQKYDNLKYLGTHIQGDSVSYQKLQIRTDKLRTLNDFQKLLGNINWI RPFLKLTTGELKPLFEILNPDSNPISTRKLTPEACKALQLMNERLSTARVKRLDLSQPWSLCILKTEYTPTACLWQDGVVEWIHLPHISPKVITPYDIF CTQLIIKGRHRSKELFSKDPDYIVVPYTKVQFDLLLQEKEDWPISLLGFLGEVHFHLPKDPLLTFTLQTAIIFPHMTSTTPLEKGIVIFTDGSANGRSVT YIQGREPIIKENTQNTAQQAEIVAVITAFEEVSQPFNLYTDSKYVTGLFPEIETATLSPRTKIYTELKHLQRLIHKRQEKFYIGHIRGHTGLPGPLAQGN AYADSLTRILT	4517
MPMV_P07572	LTAAIDILAPQQCAEPITWKSDEPVWVDQWPLTNDKLAAAQQLVQEQLEAGHITESSSPWNTPIFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMVLMGALQP GLPSPVAIPQGYLKIIIDLKDCFFSIPLHPSDQKRFAFSLPSTNFKEPMQRFQWKVLPQGMANSPTLCQKYVATAIHKVRHAWKQMYIIHYMDDILIA GKDGQQVLQCFDQLKQELTAAGLHIAPEKVQLQDPYTYLGFELNGPKITNQKAVIRKDKLQTLNDFQKLLGDINWLRPYLKLTTGDLKPLFDTLKG DSDPNSHRSLSKEALASLEKVETAIAEQFVTHINYSLPLIFLIFNTALTPTGLFWQDNPIMWIHLPASPKKVLLPYYDAIADLIILGRDHSKKYFGIEPST IIQPYSKSQIDWLMQNTEMWPIACASFVGILDNHYPPNKLIQFCKLHTFVFPQIISKTPLNNALLVFTDGSSTGMAAYTLTDTTIKFQTNLNSAQLVEL QALIAVLSAFPNQPLNIYTDSAYLAHSIPLLETVAQIKHISETAKLFLQCQQLIYNRSIPFYIGHVRAHSGLPGPIAQGNQRADLATKIVASNINT	4518
MPMV_P07572_2mutB	LTAAIDILAPQQCAEPITWKSDEPVWVDQWPLTNDKLAAAQQLVQEQLEAGHITESSSPWNTPIFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMVLMGALQP GLPSPVAPPQGYLKIIIDLKDCFFSIPLHPSDQKRFAFSLPSTNFKEPMQRFQWKVLPQGMANSPTLCQKYVATAIHKVRHAWKQMYIIHYMDDILIA GKDGQQVLQCFDQLKQELTAAGLHIAPEKVQLQDPYTYLGFELNGPKITNQKAVIRKDKLQTLNDFQKLLGDINWLRPYLKLTTGDLKPLFDTLKP DSDPNSHRSLSKEALASLEKVETAIAEQFVTHINYSLPLIFLIFNTALTPTGLFWQDNPIMWIHLPASPKKVLLPYYDAIADLIILGRDHSKKYFGIEPST IIQPYSKSQIDWLMQNTEMWPIACASFVGILDNHYPPNKLIQFCKLHTFVFPQIISKTPLNNALLVFTDGSSTGMAAYTLTDTTIKFQTNLNSAQLVEL QALIAVLSAFPNQPLNIYTDSAYLAHSIPLLETVAQIKHISETAKLFLQCQQLIYNRSIPFYIGHVRAHSGLPGPIAQGNQRADLATKIVASNINT	4519
PERV_Q4VFZ2	TLQLDDEYRLYSPLVKPDQNIQFWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASATPVSVRQYPLSKEAQEGIRPHVQRLIQQGILVPVQSPWNT PLLPVRKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLCALPPQRSWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGTGRTGQLTWTRLPQ GFKNSPTIFDEALHRDLANFRIQHPQVTLLQYVDDLLLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREVTYLGYSLRDGQRWLTEARKK TVVQIPAPTTAKQVREFLGTAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAPEHQKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQ TLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLTLGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNP ATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLTDIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGTRTIWASSLPEGTSAQKAELMALTQALRLAEG KSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGREIKNKEEILSLLEALHLPKRLAIIHCPGHQKADPISRGNQMADRVAKQAAQGVNLL	4520
PERV_Q4VFZ2	TLQLDDEYRLYSPLVKPDQNIQFWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASATPVSVRQYPLSKEAQEGIRPHVQRLIQQGILVPVQSPWNT PLLPVRKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLCALPPQRSWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGTGRTGQLTWTRLPQ GFKNSPTIFDEALHRDLANFRIQHPQVTLLQYVDDLLLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREVTYLGYSLRDGQRWLTEARKK TVVQIPAPTTAKQVREFLGTAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKEKGEFSWAPEHQKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQ TLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLTLGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNP ATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLTDIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGTRTIWASSLPEGTSAQKAELMALTQALRLAEG KSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGLLTSAGREIKNKEEILSLLEALHLPKRLAIIHCPGHQKADPISRGNQMADRVAKQAAQGVNLL	4520

【０１２２】

【表２－１２】

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
PERV_Q4V FZ2_3mut	TLQLDDEYRLYSPLVKPDQNIQFWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASATPVSVRQYPLSKEAQEGIRPHVQRLIQQGILVPVQSPWNT PLLPVRKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLCALPPQRSWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGTGRTGQLTWTRLPQ GFKNSPTIFNEALHRDLANFRIQHPQVTLLQYVDDLLLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREVTYLGYSLRDGQRWLTEARKK TVVQIPAPTTAKQVREFLGTAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKPKGEFSWAPEHQKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQ TLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLTLGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNP ATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLTDIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGTRTIWASSLPEGTSAQKAELMALTQALRLAEG KSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGREIKNKEEILSLLEALHLPKRLAIIHCPGHQKAKDPISRGNQMADRVAKQAAQGVNLL 4521	
PERV_Q4V FZ2_3mut	TLQLDDEYRLYSPLVKPDQNIQFWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASATPVSVRQYPLSKEAQEGIRPHVQRLIQQGILVPVQSPWNT PLLPVRKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLCALPPQRSWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGTGRTGQLTWTRLPQ GFKNSPTIFNEALHRDLANFRIQHPQVTLLQYVDDLLLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREVTYLGYSLRDGQRWLTEARKK TVVQIPAPTTAKQVREFLGTAGFCRLWIPGFATLAAPLYPLTKPKGEFSWAPEHQKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQ TLGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLTLGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNP ATLLPEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLTDIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGTRTIWASSLPEGTSAQKAELMALTQALRLAEG KSINIYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGREIKNKEEILSLLEALHLPKRLAIIHCPGHQKAKDPISRGNQMADRVAKQAAQGVNLL 4521	
PERV_Q4V FZ2_3mutA _WS	LDDEYRLYSPLVKPDQNIQFWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASATPVSVRQYPLSKEAQEGIRPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLL PVRKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLCALPPQRSWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFK NSPTIFNEALHRDLANFRIQHPQVTLLQYVDDLLLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREVTYLGYSLRDGQRWLTEARKKTVV QIPAPTTAKQVREFLGKAGFCRLFIPGFATLAAPLYPLTKPKGEFSWAPEHQKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLG PWRRPVAYLSKKLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLTLGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLL PEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLTDIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGTRTIWASSLPEGTSAQKAELMALTQALRLAEGKSIN IYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGREIKNKEEILSLLEALHLPKRLAIIHCPGHQKAKDPISRGNQMADRVAKQAAQGVNLLP 4522	
PERV_Q4V FZ2_3mutA _WS	LDDEYRLYSPLVKPDQNIQFWLEQFPQAWAETAGMGLAKQVPPQVIQLKASATPVSVRQYPLSKEAQEGIRPHVQRLIQQGILVPVQSPWNTPLL PVRKPGTNDYRPVQDLREVNKRVQDIHPTVPNPYNLLCALPPQRSWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPGTGRTGQLTWTRLPQGFK NSPTIFNEALHRDLANFRIQHPQVTLLQYVDDLLLAGATKQDCLEGTKALLLELSDLGYRASAKKAQICRREVTYLGYSLRDGQRWLTEARKKTVV QIPAPTTAKQVREFLGKAGFCRLFIPGFATLAAPLYPLTKPKGEFSWAPEHQKAFDAIKKALLSAPALALPDVTKPFTLYVDERKGVARGVLTQTLG PWRRPVAYLSKKLDPVASGWPVCLKAIAAVAILVKDADKLTLGQNITVIAPHALENIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLTERVTFAPPAALNPATLL PEETDEPVTHDCHQLLIEETGVRKDLTDIPLTGEVLTWFTDGSSYVVEGKRMAGAAVVDGTRTIWASSLPEGTSAQKAELMALTQALRLAEGKSIN IYTDSRYAFATAHVHGAIYKQRGWLTSAGREIKNKEEILSLLEALHLPKRLAIIHCPGHQKAKDPISRGNQMADRVAKQAAQGVNLLP 4522	
SFV1_P23 074	MDPLQLLQPLEAEIKGTKLKAHWNSGATITCVPEAFLEDERPIQTMLIKTIHGEKQQDVYYLTFKVQGRKVEAEVLASPYDYILLNPSDVPWLMKKP LQLTVLVPLHEYQERLLQQTALPKEQKELLQKLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHNIATGTLAPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLIQQ NSTMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIYRGKYKTTLDLTNGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFL NSPALFTADVVDLLKEIPNVQAYVDDIYISHDDPQEHLEQLEKIFSILLNAGYVVSLKKSEIAQREVEFLGFNITKEGRGLTDTFKQKLLNITPPKDLKQ LQSILGLLNFARNFIPNYSELVKPLYTIVANANGKFISWTEDNSNQLQHIISVLNQADNLEERNPETRLIIKVNSSPSAGYIRYYNEGSKRPIMYVNYIF SKAEAKFTQTEKLLTTMHKGLIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQRTPLPERKALPVRWITWMTYLEDPRIQFHYDKSLPELQQIPNVTEDVIAKTK HPSEFAMVFYTDGSAIKHPDVNKSHSAGMGIAQVQFIPEYKIVHQWSIPLGDHTAQLAEIAAVEFACKKALKISGPVLIVTDSFYVAESANKELPYW KSNGFLNNKKKPLRHVSKWKSIAECLQLKPDIIIMHEKGHQQPMTTLHTEGNNLADKLATQGSYVVH 4523	
SFV1_P23 074_2mut	MDPLQLLQPLEAEIKGTKLKAHWNSGATITCVPEAFLEDERPIQTMLIKTIHGEKQQDVYYLTFKVQGRKVEAEVLASPYDYILLNPSDVPWLMKKP LQLTVLVPLHEYQERLLQQTALPKEQKELLQKLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHNIATGTLAPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLIQQ NSTMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIYRGKYKTTLDLTNGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFL NSPALFNADVVDLLKEIPNVQAYVDDIYISHDDPQEHLEQLEKIFSILLNAGYVVSLKKSEIAQREVEFLGFNITKEGRGLTDTFKQKLLNITPPKDLK QLQSILGLLNFARNFIPNYSELVKPLYTIVAPANGKFISWTEDNSNQLQHIISVLNQADNLEERNPETRLIIKVNSSPSAGYIRYYNEGSKRPIMYVNYI FSKAEAKFTQTEKLLTTMHKGLIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQRTPLPERKALPVRWITWMTYLEDPRIQFHYDKSLPELQQIPNVTEDVIAKT KHPSEFAMVFYTDGSAIKHPDVNKSHSAGMGIAQVQFIPEYKIVHQWSIPLGDHTAQLAEIAAVEFACKKALKISGPVLIVTDSFYVAESANKELPY WKSNGFLNNKKKPLRHVSKWKSIAECLQLKPDIIIMHEKGHQQPMTTLHTEGNNLADKLATQGSYVVH 4524	
SFV1_P23 074_2mutA	MDPLQLLQPLEAEIKGTKLKAHWNSGATITCVPEAFLEDERPIQTMLIKTIHGEKQQDVYYLTFKVQGRKVEAEVLASPYDYILLNPSDVPWLMKKP LQLTVLVPLHEYQERLLQQTALPKEQKELLQKLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHNIATGTLAPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLIQQ NSTMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIYRGKYKTTLDLTNGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFL NSPALFNADVVDLLKEIPNVQAYVDDIYISHDDPQEHLEQLEKIFSILLNAGYVVSLKKSEIAQREVEFLGFNITKEGRGLTDTFKQKLLNITPPKDLK QLQSILGKLNFARNFIPNYSELVKPLYTIVAPANGKFISWTEDNSNQLQHIISVLNQADNLEERNPETRLIIKVNSSPSAGYIRYYNEGSKRPIMYVNYI FSKAEAKFTQTEKLLTTMHKGLIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQRTPLPERKALPVRWITWMTYLEDPRIQFHYDKSLPELQQIPNVTEDVIAKT KHPSEFAMVFYTDGSAIKHPDVNKSHSAGMGIAQVQFIPEYKIVHQWSIPLGDHTAQLAEIAAVEFACKKALKISGPVLIVTDSFYVAESANKELPY WKSNGFLNNKKKPLRHVSKWKSIAECLQLKPDIIIMHEKGHQQPMTTLHTEGNNLADKLATQGSYVVH 4525	
SFV1_P23 074-Pro	VPWLMKKPLQLTVLVPLHEYQERLLQQTALPKEQKELLQKLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHNIATGTLAPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLL KQGVLIQQNSTMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIYRGKYKTTLDLTNGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCW TRLPQGFLNSPALFTADVVDLLKEIPNVQAYVDDIYISHDDPQEHLEQLEKIFSILLNAGYVVSLKKSEIAQREVEFLGFNITKEGRGLTDTFKQKLLNI TPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNYSELVKPLYTIVANANGKFISWTEDNSNQLQHIISVLNQADNLEERNPETRLIIKVNSSPSAGYIRYYNEGSKR PIMYVNYIFSKAEAKFTQTEKLLTTMHKGLIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQRTPLPERKALPVRWITWMTYLEDPRIQFHYDKSLPELQQIPNV TEDVIAKTKHPSEFAMVFYTDGSAIKHPDVNKSHSAGMGIAQVQFIPEYKIVHQWSIPLGDHTAQLAEIAAVEFACKKALKISGPVLIVTDSFYVAES ANKELPYWKSNGFLNNKKKPLRHVSKWKSIAECLQLKPDIIIMHEKGHQQPMTTLHTEGNNLADKLATQGSYVVH 4526	
SFV1_P23 074-Pro_2mut	VPWLMKKPLQLTVLVPLHEYQERLLQQTALPKEQKELLQKLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHNIATGTLAPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLL KQGVLIQQNSTMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIYRGKYKTTLDLTNGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCW TRLPQGFLNSPALFNADVVDLLKEIPNVQAYVDDIYISHDDPQEHLEQLEKIFSILLNAGYVVSLKKSEIAQREVEFLGFNITKEGRGLTDTFKQKLLNI TPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNYSELVKPLYTIVAPANGKFISWTEDNSNQLQHIISVLNQADNLEERNPETRLIIKVNSSPSAGYIRYYNEGSKR PIMYVNYIFSKAEAKFTQTEKLLTTMHKGLIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQRTPLPERKALPVRWITWMTYLEDPRIQFHYDKSLPELQQIPNV TEDVIAKTKHPSEFAMVFYTDGSAIKHPDVNKSHSAGMGIAQVQFIPEYKIVHQWSIPLGDHTAQLAEIAAVEFACKKALKISGPVLIVTDSFYVAES ANKELPYWKSNGFLNNKKKPLRHVSKWKSIAECLQLKPDIIIMHEKGHQQPMTTLHTEGNNLADKLATQGSYVVH 4527	
SFV1_P23 074-Pro_2mutA	VPWLMKKPLQLTVLVPLHEYQERLLQQTALPKEQKELLQKLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHNIATGTLAPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLL KQGVLIQQNSTMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIYRGKYKTTLDLTNGFWAHPITPESYWLTAFTWQGKQYCW TRLPQGFLNSPALFNADVVDLLKEIPNVQAYVDDIYISHDDPQEHLEQLEKIFSILLNAGYVVSLKKSEIAQREVEFLGFNITKEGRGLTDTFKQKLLNI	4528

【０１２３】

【表２－１３】

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
	TPPKDLKQLQSILGKLNFARNFIPNYSELVKPLYTIVAPANGKFISWTEDNSNQLQHIISVLNQADNLEERNPETRLIIKVNSSPSAGYIRYYNEGSKR PIMYVNYIFSKAEAKFTQTEKLLTTMHKGLIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQRTPLPERKALPVRWITWMTYLEDPRIQFHYDKSLPELQQIPNV TEDVIAKTKHPSEFAMVFYTDGSAIKHPDVNKSHSAGMGIAQVQFIPEYKIVHQWSIPLGDHTAQLAEIAAVEFACKKALKISGPVLIVTDSFYVAES ANKELPYWKSNGFLNNKKKPLRHVSKWKSIAECLQLKPDIIIIMHEKGHQQPMTTLHTEGNNLADKLATQGSYVVH	
SFV3L_P27401	MDPLQLLQPLEAEIKGTKLKAHWNSGATITCVPQAFLEEEVPIKNIWIKTIHGEKEQPVYYLTFKIQGRKVEAEVISSPYDYILVSPSDIPWLMKKPLQ LTTLVPLQEYEERLLKQTMLTGSYKEKLQSLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHHIATGTVNPRPQKQYPINPKAKASIQTVINDLLKQGVLIQQNS IMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIFRGKYKTTLDLSNGFWAHSITPESYWLTAFTWLGQQYCWTRLPQGFLNS PALFTADVVDLLKEVPNVQVYVDDIYISHDDPREHLEQLEKVFSLLLNAGYVVSLKKSEIAQHEVEFLGFNITKEGRGLTETFKQKLLNITPPRDLKQ LQSILGLLNFARNFIPNFSELVKPLYNIIATANGKYITWTTDNSQQLQNIISMLNSAENLEERNPEVRLIMKVNTSPSAGYIRFYNEFAKRPIMYLNYVY TKAEVKFTNTEKLLTTIHKGLIKALDLGMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMSYLEDPRIQFHYDKTLPELQQVPTVTDDIIAKIKHP SEFSMVFYTDGSAIKHPNVNKSHNAGMGIAQVQFKPEFTVINTWSIPLGDHTAQLAEVAAVEFACKKALKIDGPVLIVTDSFYVAESVNKELPYWQ SNGFFNNKKKPLKHVSKWKSIADCIQLKPDIIIIHEKGHQPTASTFHTEGNNLADKLATQGSYVVN	4529
SFV3L_P27401_2mut	MDPLQLLQPLEAEIKGTKLKAHWNSGATITCVPQAFLEEEVPIKNIWIKTIHGEKEQPVYYLTFKIQGRKVEAEVISSPYDYILVSPSDIPWLMKKPLQ LTTLVPLQEYEERLLKQTMLTGSYKEKLQSLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHHIATGTVNPRPQKQYPINPKAKASIQTVINDLLKQGVLIQQNS IMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIFRGKYKTTLDLSNGFWAHSITPESYWLTAFTWLGQQYCWTRLPQGFLNS PALFNADVVDLLKEVPNVQVYVDDIYISHDDPREHLEQLEKVFSLLLNAGYVVSLKKSEIAQHEVEFLGFNITKEGRGLTETFKQKLLNITPPRDLKQ LQSILGLLNFARNFIPNFSELVKPLYNIIATAPGKYITWTTDNSQQLQNIISMLNSAENLEERNPEVRLIMKVNTSPSAGYIRFYNEFAKRPIMYLNYVY TKAEVKFTNTEKLLTTIHKGLIKALDLGMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMSYLEDPRIQFHYDKTLPELQQVPTVTDDIIAKIKHP SEFSMVFYTDGSAIKHPNVNKSHNAGMGIAQVQFKPEFTVINTWSIPLGDHTAQLAEVAAVEFACKKALKIDGPVLIVTDSFYVAESVNKELPYWQ SNGFFNNKKKPLKHVSKWKSIADCIQLKPDIIIIHEKGHQPTASTFHTEGNNLADKLATQGSYVVN	4530
SFV3L_P27401_2mutA	MDPLQLLQPLEAEIKGTKLKAHWNSGATITCVPQAFLEEEVPIKNIWIKTIHGEKEQPVYYLTFKIQGRKVEAEVISSPYDYILVSPSDIPWLMKKPLQ LTTLVPLQEYEERLLKQTMLTGSYKEKLQSLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHHIATGTVNPRPQKQYPINPKAKASIQTVINDLLKQGVLIQQNS IMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIFRGKYKTTLDLSNGFWAHSITPESYWLTAFTWLGQQYCWTRLPQGFLNS PALFNADVVDLLKEVPNVQVYVDDIYISHDDPREHLEQLEKVFSLLLNAGYVVSLKKSEIAQHEVEFLGFNITKEGRGLTETFKQKLLNITPPRDLKQ LQSILGKLNFARNFIPNFSELVKPLYNIIATAPGKYITWTTDNSQQLQNIISMLNSAENLEERNPEVRLIMKVNTSPSAGYIRFYNEFAKRPIMYLNYVY TKAEVKFTNTEKLLTTIHKGLIKALDLGMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMSYLEDPRIQFHYDKTLPELQQVPTVTDDIIAKIKHP SEFSMVFYTDGSAIKHPNVNKSHNAGMGIAQVQFKPEFTVINTWSIPLGDHTAQLAEVAAVEFACKKALKIDGPVLIVTDSFYVAESVNKELPYWQ SNGFFNNKKKPLKHVSKWKSIADCIQLKPDIIIIHEKGHQPTASTFHTEGNNLADKLATQGSYVVN	4531
SFV3L_P27401-Pro	IPWLMKKPLQLTTLVPLQEYEERLLKQTMLTGSYKEKLQSLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHHIATGTVNPRPQKQYPINPKAKASIQTVINDLL KQGVLIQQNSIMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIFRGKYKTTLDLSNGFWAHSITPESYWLTAFTWLGQQYCW TRLPQGFLNSPALFTADVVDLLKEVPNVQVYVDDIYISHDDPREHLEQLEKVFSLLLNAGYVVSLKKSEIAQHEVEFLGFNITKEGRGLTETFKQKLL NITPPRDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFSELVKPLYNIIATANGKYITWTTDNSQQLQNIISMLNSAENLEERNPEVRLIMKVNTSPSAGYIRFYNEFAK RPIMYLNYVYTKAEVKFTNTEKLLTTIHKGLIKALDLGMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMSYLEDPRIQFHYDKTLPELQQVPTV TDDIIAKIKHPSEFSMVFYTDGSAIKHPNVNKSHNAGMGIAQVQFKPEFTVINTWSIPLGDHTAQLAEVAAVEFACKKALKIDGPVLIVTDSFYVAES VNKELPYWQSNGFFNNKKKPLKHVSKWKSIADCIQLKPDIIIIHEKGHQPTASTFHTEGNNLADKLATQGSYVVN	4532
SFV3L_P27401-Pro_2mut	IPWLMKKPLQLTTLVPLQEYEERLLKQTMLTGSYKEKLQSLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHHIATGTVNPRPQKQYPINPKAKASIQTVINDLL KQGVLIQQNSIMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIFRGKYKTTLDLSNGFWAHSITPESYWLTAFTWLGQQYCW TRLPQGFLNSPALFNADVVDLLKEVPNVQVYVDDIYISHDDPREHLEQLEKVFSLLLNAGYVVSLKKSEIAQHEVEFLGFNITKEGRGLTETFKQKLL NITPPRDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFSELVKPLYNIIATAPGKYITWTTDNSQQLQNIISMLNSAENLEERNPEVRLIMKVNTSPSAGYIRFYNEFAK RPIMYLNYVYTKAEVKFTNTEKLLTTIHKGLIKALDLGMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMSYLEDPRIQFHYDKTLPELQQVPTV TDDIIAKIKHPSEFSMVFYTDGSAIKHPNVNKSHNAGMGIAQVQFKPEFTVINTWSIPLGDHTAQLAEVAAVEFACKKALKIDGPVLIVTDSFYVAES VNKELPYWQSNGFFNNKKKPLKHVSKWKSIADCIQLKPDIIIIHEKGHQPTASTFHTEGNNLADKLATQGSYVVN	4533
SFV3L_P27401-Pro_2mutA	IPWLMKKPLQLTTLVPLQEYEERLLKQTMLTGSYKEKLQSLFLKYDALWQHWENQVGHRRIKPHHIATGTVNPRPQKQYPINPKAKASIQTVINDLL KQGVLIQQNSIMNTPVYPVPKPDGKWRMVLDYREVNKTIPLIAAQNQHSAGILSSIFRGKYKTTLDLSNGFWAHSITPESYWLTAFTWLGQQYCW TRLPQGFLNSPALFNADVVDLLKEVPNVQVYVDDIYISHDDPREHLEQLEKVFSLLLNAGYVVSLKKSEIAQHEVEFLGFNITKEGRGLTETFKQKLL NITPPRDLKQLQSILGKLNFARNFIPNFSELVKPLYNIIATAPGKYITWTTDNSQQLQNIISMLNSAENLEERNPEVRLIMKVNTSPSAGYIRFYNEFAK RPIMYLNYVYTKAEVKFTNTEKLLTTIHKGLIKALDLGMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMSYLEDPRIQFHYDKTLPELQQVPTV TDDIIAKIKHPSEFSMVFYTDGSAIKHPNVNKSHNAGMGIAQVQFKPEFTVINTWSIPLGDHTAQLAEVAAVEFACKKALKIDGPVLIVTDSFYVAES VNKELPYWQSNGFFNNKKKPLKHVSKWKSIADCIQLKPDIIIIHEKGHQPTASTFHTEGNNLADKLATQGSYVVN	4534
SFVCP_Q87040	MNPLQLLQPLPAEVKGTKLLAHWNSGATITCIPESFLEDEQPIKQTLIKTIHGEKQQNVYYLTFKVKGRKVEAEVIASPYEYILLSPTDVPWLTQQPL QLTILVPLQEYQDRILNKTALPEEQKQQLKALFTKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLTPQN STMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPDSYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFL NSPALFTADAVDLLKEVPNVQVYVDDIYLSHDNPHEHIQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQRTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNVTPPKDL KQLQSILGLLNFARNFIPNFAELVQTLYNLIASSKGKYIEWTEDNTKQLNKVIEALNTASNLEERLPDQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNESGKKPIMYL NYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYTSSIP PLKHPSQYEGVFCTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHAIYNPEYKILNQWSIPLGHHTAQMAEIAAVEFACKKALKVPGPVLVITDSFYVAESANKEL PYWKSNGFVNNKKEPLKHISKWKSIAECLSIKPDITIQHEKGHQPINTSIHTEGNALADKLATQGSYVVN	4535
SFVCP_Q87040_2mut	MNPLQLLQPLPAEVKGTKLLAHWNSGATITCIPESFLEDEQPIKQTLIKTIHGEKQQNVYYLTFKVKGRKVEAEVIASPYEYILLSPTDVPWLTQQPL QLTILVPLQEYQDRILNKTALPEEQKQQLKALFTKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLTPQN STMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPDSYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFL NSPALFNADAVDLLKEVPNVQVYVDDIYLSHDNPHEHIQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQRTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNVTPPKDL KQLQSILGLLNFARNFIPNFAELVQTLYNLIASSPGKYIEWTEDNTKQLNKVIEALNTASNLEERLPDQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNESGKKPIMYL NYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYTSSIP PLKHPSQYEGVFCTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHAIYNPEYKILNQWSIPLGHHTAQMAEIAAVEFACKKALKVPGPVLVITDSFYVAESANKEL PYWKSNGFVNNKKEPLKHISKWKSIAECLSIKPDITIQHEKGHQPINTSIHTEGNALADKLATQGSYVVN	4536
SFVCP_Q87040_2mutA	MNPLQLLQPLPAEVKGTKLLAHWNSGATITCIPESFLEDEQPIKQTLIKTIHGEKQQNVYYLTFKVKGRKVEAEVIASPYEYILLSPTDVPWLTQQPL QLTILVPLQEYQDRILNKTALPEEQKQQLKALFTKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLLKQGVLTPQN STMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPDSYWLTAFTWQGKQYCWTRLPQGFL NSPALFNADAVDLLKEVPNVQVYVDDIYLSHDNPHEHIQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQRTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTKLLNVTPPKDL	4537

【０１２４】

【表２－１４】

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
	KQLQSILGKLNFARNFIPNFAELVQTLYNLIASSPGKYIEWTEDNTKQLNKVIEALNTASNLEERLPDQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNESGKKPIMYL NYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHIPDVYTSSIP PLKHPSQYEGVFCTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHAIYNPEYKILNQWSIPLGHHTAQMAEIAAVEFACKKALKVPGPVLVITDSFYVAESANKEL PYWKSNGFVNNKKEPLKHISKWKSIAECLSIKPDITIQHEKGHQPINTSIHTEGNALADKLATQGSYVVN	
SFVCP_Q87040-Pro	VPWLTQQPLQLTILVPLQEYQDRILNKTALPEEQKQQLKALFTKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLL KQGVLTPQNSTMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPDSYWLTAFTWQGKQYC WTRLPQGFLNSPALFTADAVDLLKEVPNVQVYVDDIYLSHDNPHEHIQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQRTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTK LLNVTPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFAELVQTLYNLIASSKGKYIEWTEDNTKQLNKVIEALNTASNLEERLPDQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNE SGKKPIMYLNYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHI PDVYTSSIPPLKHPSQYEGVFCTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHAIYNPEYKILNQWSIPLGHHTAQMAEIAAVEFACKKALKVPGPVLVITDSFYV AESANKELPYWKSNGFVNNKKEPLKHISKWKSIAECLSIKPDITIQHEKGHQPINTSIHTEGNALADKLATQGSYVVN	4538
SFVCP_Q87040-Pro_2mut	VPWLTQQPLQLTILVPLQEYQDRILNKTALPEEQKQQLKALFTKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLL KQGVLTPQNSTMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPDSYWLTAFTWQGKQYC WTRLPQGFLNSPALFNADAVDLLKEVPNVQVYVDDIYLSHDNPHEHIQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQRTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTK LLNVTPPKDLKQLQSILGLLNFARNFIPNFAELVQTLYNLIASSPGKYIEWTEDNTKQLNKVIEALNTASNLEERLPDQRLVIKVNTSPSAGYVRYYNE SGKKPIMYLNYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELKHI PDVYTSSIPPLKHPSQYEGVFCTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHAIYNPEYKILNQWSIPLGHHTAQMAEIAAVEFACKKALKVPGPVLVITDSFYV AESANKELPYWKSNGFVNNKKEPLKHISKWKSIAECLSIKPDITIQHEKGHQPINTSIHTEGNALADKLATQGSYVVN	4539
SFVCP_Q87040-Pro_2mutA	VPWLTQQPLQLTILVPLQEYQDRILNKTALPEEQKQQLKALFTKYDNLWQHWENQVGHRKIRPHNIATGDYPPRPQKQYPINPKAKPSIQIVIDDLL KQGVLTPQNSTMNTPVYPVPKPDGRWRMVLDYREVNKTIPLTAAQNQHSAGILATIVRQKYKTTLDLANGFWAHPITPDSYWLTAFTWQGKQYC WTRLPQGFLNSPALFNADAVDLLKEVPNVQVYVDDIYLSHDNPHEHIQQLEKVFQILLQAGYVVSLKKSEIGQRTVEFLGFNITKEGRGLTDTFKTK LLNVTPPKDLKQLQSILGKLNFARNFIPNFAELVQTLYNLIASSPGKYIEWTEDNTKQLNKVIEALNTASNLEERLPDQRLVIKVNTSPSAGYVRYYN ESGKKPIMYLNYVFSKAELKFSMLEKLLTTMHKALIKAMDLAMGQEILVYSPIVSMTKIQKTPLPERKALPIRWITWMTYLEDPRIQFHYDKTLPELK HIPDVYTSSIPPLKHPSQYEGVFCTDGSAIKSPDPTKSNNAGMGIVHAIYNPEYKILNQWSIPLGHHTAQMAEIAAVEFACKKALKVPGPVLVITDSF YVAESANKELPYWKSNGFVNNKKEPLKHISKWKSIAECLSIKPDITIQHEKGHQPINTSIHTEGNALADKLATQGSYVVN	4540
SMRVH_P03364	PRSRAIDIPVPHADKISWKITDPVWVDQWPLTYEKTLAAIALVQEQLAAGHIEPTNSPWNTPIFIIKKKSGSWRLLQDLRAVNKVMVPMGALQPGLP SPVAIPLNYHKIVIDLKDCFFTIPLHPEDRPYFAFSVPQINFQSPMPRYQWKVLPQGMANSPTLCQKFVAAAIAPVRSQWPEAYILHYMDDILLACD SAEAAKACYAHIISCLTSYGLKIAPDKVQVSEPFSYLGFELHHQQVFTPRVCLKTDHLKTLNDFQKLLGDIQWLRPYLKLPTSALVPLNNILKPDPNP LSVRALTPEAKQSLALINKAIQNQSVQQISYNLPLVLLLLPTPHTPTAVFWQPNGTDPTKNGSPLLWLHLPASPSKVLLTYPSLLAMLIIKGRYTGRQ LFGRDPHSIIIPYTQDQLTWLLQTSDEWAIALSSFTGDIDNHYPSDPVIQFAKLHQFIFPKITKCAPIPQATLVFTDGSSNGIAAYVIDNQPISIKSPYLS AQLVELYAILQVFTVLAHQPFNLYTDSAYIAQSVPLLETVPFIKSSTNATPLFSKLQQLILNRQHPFFIGHLRAHLNLPGPLAEGNALADAATQIFPIIS D	4541
SMRVH_P03364_2mut	PRSRAIDIPVPHADKISWKITDPVWVDQWPLTYEKTLAAIALVQEQLAAGHIEPTNSPWNTPIFIIKKKSGSWRLLQDLRAVNKVMVPMGALQPGLP SPVAIPLNYHKIVIDLKDCFFTIPLHPEDRPYFAFSVPQINFQSPMPRYQWKVLPQGMANSPTLCQKFVAAAIAPVRSQWPEAYILHYMDDILLACD SAEAAKACYAHIISCLTSYGLKIAPDKVQVSEPFSYLGFELHHQQVFTPRVCLKTDHLKTLNDFQKLLGDIQWLRPYLKLPTSALVPLNNILKPDPNP LSVRALTPEAKQSLALINKAIQNQSVQQISYNLPLVLLLLPTPHTPTAVFWQPNGTDPTKNGSPLLWLHLPASPSKVLLTYPSLLAMLIIKGRYTGRQ LFGRDPHSIIIPYTQDQLTWLLQTSDEWAIALSSFTGDIDNHYPSDPVIQFAKLHQFIFPKITKCAPIPQATLVFTDGSSNGIAAYVIDNQPISIKSPYLS AQLVELYAILQVFTVLAHQPFNLYTDSAYIAQSVPLLETVPFIKSSTNATPLFSKLQQLILNRQHPFFIGHLRAHLNLPGPLAEGNALADAATQIFPIIS D	4542
SMRVH_P03364_2mutB	PRSRAIDIPVPHADKISWKITDPVWVDQWPLTYEKTLAAIALVQEQLAAGHIEPTNSPWNTPIFIIKKKSGSWRLLQDLRAVNKVMVPMGALQPGLP SPVAPPLNYHKIVIDLKDCFFTIPLHPEDRPYFAFSVPQINFQSPMPRYQWKVLPQGMANSPTLCQKFVAAAIAPVRSQWPEAYILHYMDDILLACD SAEAAKACYAHIISCLTSYGLKIAPDKVQVSEPFSYLGFELHHQQVFTPRVCLKTDHLKTLNDFQKLLGDIQWLRPYLKLPTSALVPLNNILKPDPNP LSVRALTPEAKQSLALINKAIQNQSVQQISYNLPLVLLLLPTPHTPTAVFWQPNGTDPTKNGSPLLWLHLPASPSKVLLTYPSLLAMLIIKGRYTGRQ LFGRDPHSIIIPYTQDQLTWLLQTSDEWAIALSSFTGDIDNHYPSDPVIQFAKLHQFIFPKITKCAPIPQATLVFTDGSSNGIAAYVIDNQPISIKSPYLS AQLVELYAILQVFTVLAHQPFNLYTDSAYIAQSVPLLETVPFIKSSTNATPLFSKLQQLILNRQHPFFIGHLRAHLNLPGPLAEGNALADAATQIFPIIS D	4543
SRV2_P51517	LATAVDILAPQRYADPITWKSDEPVWVDQWPLTQEKLAAAQQLVQEQLQAGHIIESNSPWNTPIFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMVLMGALQP GLPSPVAIPQGYFKIVIDLKDCFFTIPLQPVDQKRFAFSLPSTNFKQPMKRYQWKVLPQGMANSPTLCQKYVAAAIEPVRKSWAQMYIIHYMDDILI AGKLGEQVLQCFAQLKQALTTTGLQIAPEKVQLQDPYTYLGFQINGPKITNQKAVIRRDKLQTLNDFQKLLGDINWLRPYLHLTTGDLKPLFDILKG DSNPNSPRSLSEAALASLQKVETAIAEQFVTQIDYTQPLTFLIFNTTLTPTGLFWQNNPVMWVHLPASPKKVLLPYYDAIADLIILGRDNSKKYFGLE PSTIIQPYSKSQIHWLMQNTETWPIACASYAGNIDNHYPPNKLIQFCKLHAVVFPRIISKTPLDNALLVFTDGSSTGIAAYTFEKTTVRFKTSHTSAQL VELQALIAVLSAFPHRALNVYTDSAYLAHSIPLLETVSHIKHISDTAKFFLQCQQLIYNRSIPFYLGHIRAHSGLPGPLSQGNHITDLATKVVATTLTT	4544
SRV2_P51517_2mutB	LATAVDILAPQRYADPITWKSDEPVWVDQWPLTQEKLAAAQQLVQEQLQAGHIIESNSPWNTPIFVIKKKSGKWRLLQDLRAVNATMVLMGALQP GLPSPVAPPQGYFKIVIDLKDCFFTIPLQPVDQKRFAFSLPSTNFKQPMKRYQWKVLPQGMANSPTLCQKYVAAAIEPVRKSWAQMYIIHYMDDILI AGKLGEQVLQCFAQLKQALTTTGLQIAPEKVQLQDPYTYLGFQINGPKITNQKAVIRRDKLQTLNDFQKLLGDINWLRPYLHLTTGDLKPLFDILKG DSNPNSPRSLSEAALASLQKVETAIAEQFVTQIDYTQPLTFLIFNTTLTPTGLFWQNNPVMWVHLPASPKKVLLPYYDAIADLIILGRDNSKKYFGLE PSTIIQPYSKSQIHWLMQNTETWPIACASYAGNIDNHYPPNKLIQFCKLHAVVFPRIISKTPLDNALLVFTDGSSTGIAAYTFEKTTVRFKTSHTSAQL VELQALIAVLSAFPHRALNVYTDSAYLAHSIPLLETVSHIKHISDTAKFFLQCQQLIYNRSIPFYLGHIRAHSGLPGPLSQGNHITDLATKVVATTLTT	4545
WDSV_O92815	SCQTKNTLNIDEYLLQFPDQLWASLPTDIGRMLVPPITIKIKDNASLPSIRQYPLPKDKTEGLRPLISSLENQGILIKCHSPCNTPIFPIKKAGRDEYRMI HDLRAINNIVAPLTAVVASPTTVLSNLAPSLHWFTVIDLSNAFFSVPIHKDSQYLFAFTFEGHQYTWTVLPQGFIHSPTLFSQALYQSLHKIKFKISSEI CIYMDDVLIASKDRDTNLKDTAVMLQHLASEGHKVSKKKLQLCQQEVVYLGQLLTPEGRKILPDRKVTVSQFQQPTTIRQIRAFLGLVGYCRHWIP EFSIHSKFLEKQLKKDTAEPFQLDDQQVEAFNKLKHAITTAPVLVVPDPAKPFQLYTSHSEHASIAVLTQKHAGRTRPIAFLSSKFDAIESGLPPCLK ACASIHRSLTQADSFILGAPLIIYTTHAICTLLQRDRSQLVTASRFSKWEADLLRPELTFVACSAVSPAHLYMQSCENNIPPHDCVLLTHTISRPRPDL SDLPIPDPDMTLFSDGSYTTGRGGAAVVMHRPVTDDFIIIHQQPGGASAQTAELLALAAACHLATDKTVNIYTDSRYAYGVVHDFGHLWMHRGFV TSAGTPIKNHKEIEYLLKQIMKPKQVSVIKIEAHTKGVSMEVRGNAAADEAAKNAVFLVQR	4546
WDSV_O92815_2mut	SCQTKNTLNIDEYLLQFPDQLWASLPTDIGRMLVPPITIKIKDNASLPSIRQYPLPKDKTEGLRPLISSLENQGILIKCHSPCNTPIFPIKKAGRDEYRMI HDLRAINNIVAPLTAVVASPTTVLSNLAPSLHWFTVIDLSNAFFSVPIHKDSQYLFAFTFEGHQYTWTVLPQGFIHSPTLFNQALYQSLHKIKFKISSEI CIYMDDVLIASKDRDTNLKDTAVMLQHLASEGHKVSKKKLQLCQQEVVYLGQLLTPEGRKILPDRKVTVSQFQQPTTIRQIRAFLGLVGYCRHWIP EFSIHSKFLEKQLKPDTAEPFQLDDQQVEAFNKLKHAITTAPVLVVPDPAKPFQLYTSHSEHASIAVLTQKHAGRTRPIAFLSSKFDAIESGLPPCLK	4547

【０１２５】

【表２－１５】

RT名	RTアミノ酸配列	配列番号
	ACASIHRSLTQADSFILGAPLIIYTTHAICTLLQRDRSQLVTASRFSKWEADLLRPELTFVACSAVSPAHLYMQSCENNIPPHDCVLLTHTISRPRPDL SDLPIPDPDMTLFSDGSYTTGRGGAAVVMHRPVTDDFIIIHQQPGGASAQTAELLALAAACHLATDKTVNIYTDSRYAYGVVHDFGHLWMHRGFV TSAGTPIKNHKEIEYLLKQIMKPKQVSVIKIEAHTKGVSMEVRGNAAADEAAKNAVFLVQR	
WDSV_O92815_2mutA	SCQTKNTLNIDEYLLQFPDQLWASLPTDIGRMLVPPITIKIKDNASLPSIRQYPLPKDKTEGLRPLISSLENQGIILIKCHSPCNTPIFPIKKAGRDEYRMI HDLRAINNIVAPLTAVVASPTTVLSNLAPSLHWFTVIDLSNAFFSVPIHKDSQYLFAFTFEGHQYTWTVLPQGFIHSPTLFNQALYQSLHKIKFKISSEI CIYMDDVLIASKDRDTNLKDTAVMLQHLASEGHKVSKKKLQLCQQEVVYLGQLLTPEGRKILPDRKVTVSQFQQPTTIRQIRAFLGKVGYCRHFIPE FSIHSKFLEKQLKPDTAEPFQLDDQQVEAFNKLKHAITTAPVLVVPDPAKPFQLYTSHSEHASIAVLTQKHAGRTRPIAFLSSKFDAIESGLPPCLKA CASIHRSLTQADSFILGAPLIIYTTHAICTLLQRDRSQLVTASRFSKWEADLLRPELTFVACSAVSPAHLYMQSCENNIPPHDCVLLTHTISRPRPDLS DLPIPDPDMTLFSDGSYTTGRGGAAVVMHRPVTDDFIIIHQQPGGASAQTAELLALAAACHLATDKTVNIYTDSRYAYGVVHDFGHLWMHRGFVT SAGTPIKNHKEIEYLLKQIMKPKQVSVIKIEAHTKGVSMEVRGNAAADEAAKNAVFLVQR	4548
WMSV_P03359	VLNLEEEYRLHEKPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPVAVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGVLVPCQSPWNT PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQG FKNSPTLFDEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQKEVTYLGYLLKEGKRWLTPARKA TVMKIPPPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKESIPFIWTEEHQKAFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQT LGPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLTLGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNP ATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQPLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQALRLAEG KDINIYTDSRYAFATAHIHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKP	4549
WMSV_P03359_3mut	VLNLEEEYRLHEKPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPVAVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGVLVPCQSPWNT PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQKEVTYLGYLLKEGKRWLTPARKA TVMKIPPPTTPRQVREFLGTAGFCRLWIPGFASLAAPLYPLTKPSIPFIWTEEHQKAFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTL GPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLTLGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPA ATLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQPLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQALRLAEG KDINIYTDSRYAFATAHIHGAIYKQRGLLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKP	4550
WMSV_P03359_3mutA	VLNLEEEYRLHEKPVPSSIDPSWLQLFPTVWAERAGMGLANQVPPVVVELRSGASPVAVRQYPMSKEAREGIRPHIQRFLDLGVLVPCQSPWNT PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREINKRVQDIHPTVPNPYNLLSSLPPSHTWYSVLDLKDAFFCLKLHPNSQPLFAFEWRDPEKGNTGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLAPFRALNPQVVLLQYVDDLLVAAPTYRDCKEGTQKLLQELSKLGYRVSAKKAQLCQKEVTYLGYLLKEGKRWLTPARKA TVMKIPPPTTPRQVREFLGKAGFCRLFIPGFASLAAPLYPLTKPSIPFIWTEEHQKAFDRIKEALLSAPALALPDLTKPFTLYVDERAGVARGVLTQTL GPWRRPVAYLSKKLDPVASGWPTCLKAVAAVALLLKDADKLTLGQNVTVIASHSLESIVRQPPDRWMTNARMTHYQSLLLNERVSFAPPAVLNPA TLLPVESEATPVHRCSEILAEETGTRRDLKDQPLPGVPAWYTDGSSFIAEGKRRAGAAIVDGKRTVWASSLPEGTSAQKAELVALTQALRLAEGK DINIYTDSRYAFATAHIHGAIYKQRGWLTSAGKDIKNKEEILALLEAIHLPKRVAIIHCPGHQKGNDPVATGNRRADEAAKQAALSTRVLAETTKP	4551
XMRV6_A1Z651	TLNIEDEYRLHETSKEPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSEQDCQRGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET VMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPV VALNPATLPLPEKEAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADYTWYTDGSSFLQEGQRRAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALK MAEGKKLNVYTDSRYAFATAHVHGEIYRRRGLLTSEGREIKNKNEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNSAEARGNRMADQAAREAAMKAVLET STLL	4552
XMRV6_A1Z651_3mut	TLNIEDEYRLHETSKEPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSEQDCQRGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET VMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPV VALNPATLLPLPEKEAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADYTWYTDGSSFLQEGQRRAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALK MAEGKKLNVYTDSRYAFATAHVHGEIYRRRGLLTSEGREIKNKNEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNSAEARGNRMADQAAREAAMKAVLET STLL	4553
XMRV6_A1Z651_3mutA	TLNIEDEYRLHETSKEPDVPLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSEQDCQRGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET VMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLT QKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQAMLLDTDRVQFGPV VALNPATLLPLPEKEAPHDCLEILAETHGTRPDLTDQPIPDADYTWYTDGSSFLQEGQRRAGAAVTTETEVIWARALPAGTSAQRAELIALTQALK MAEGKKLNVYTDSRYAFATAHVHGEIYRRRGWLTSEGREIKNKNEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGNSAEARGNRMADQAAREAAMKAVLET STLL	4554

【０１２６】

一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、例えば、部位特異的突然変異によって修飾される。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、改善された特性を有するように改変され、例えば、ＭＭＬＶ　ＲＴ由来のＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＶ（ＳＳＩＶ）逆転写酵素が挙げられる。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２００１０６８８９５号パンフレットに記載のように、より低いエラー率を有するように改変され得る。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、熱安定性が高まるように改変され得る。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、加工性が高まるように改変され得る。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、阻害剤に対する耐性を有するように改変され得る。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、より高速であるように改変され得る。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、ＲＮＡ鋳型における修飾ヌクレオチドに対する耐性が高まるように改変され得る。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、修飾ＤＮＡヌクレオチドを挿入するように改変され得る。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、鋳型ＲＮＡに結合するように改変される。一部の実施形態では、１つ又は複数の突然変異は、マウス白血病ウイルス逆転写酵素のＲＴドメイン内のＤ２００Ｎ、Ｌ６０３Ｗ、Ｔ３３０Ｐ、Ｄ５２４Ｇ、Ｅ５６２Ｑ、Ｄ５８３Ｎ、Ｐ５１Ｌ、Ｓ６７Ｒ、Ｅ６７Ｋ、Ｔ１９７Ａ、Ｈ２０４Ｒ、Ｅ３０２Ｋ、Ｆ３０９Ｎ、Ｗ３１３Ｆ、Ｌ４３５Ｇ、Ｎ４５４Ｋ、Ｈ５９４Ｑ、Ｌ６７１Ｐ、Ｅ６９Ｋ若しくはＤ６５３Ｎ、又は別のＲＴドメインの対応する位置での対応する突然変異から選択される。

【０１２７】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、レトロウイルス逆転写酵素からのＲＴドメイン、例として、例えば、以下の配列を含む野生型Ｍ－ＭＬＶ　ＲＴを含む。

Ｍ－ＭＬＶ（ＷＴ）：

【化２】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSI
KQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNK
RVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGIS
GQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQG
TRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKT
PRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAP
ALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRM
VAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDR
VQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSL
LQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRY
AFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEAR
GNRMADQAARKAAITETPDTSTLLI (配列番号 : 4012)

【０１２８】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、レトロウイルス逆転写酵素からのＲＴドメイン、例として、例えば、以下の配列を含むＭ－ＭＬＶ　ＲＴを含む。

【化３】

TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSI
KQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNK
RVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGIS
GQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQG
TRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKT
PRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAP
ALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRM
VAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDR
VQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSL
LQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRY
AFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEAR
GNRMADQAARKAAITETPDTSTLL (配列番号 : 4013)

【０１２９】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＮＰ＿０５７９３３のアミノ酸６５９～１３２９の配列を含むレトロウイルス逆転写酵素からのＲＴドメインを含む。複数の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、例えば、以下に示される、ＮＰ＿０５７９３３のアミノ酸６５９～１３２９の配列のＮ末端に、１つの更なるアミノ酸を更に含む。

【化４】

TLNIEDEHRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSI
KQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLP**VKKPGTNDYRPVQDLREVN**
KRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDP
EMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAAT
SELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKE
TVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAY
QEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPV
AAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTH
YQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDAD
HTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGK
KLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPG
HQKGHSAEARGNRMADQAARKAA (配列番号 : 4014)

コアＲＴ（太字）、上記の注釈
ＲＮＡｓｅＨ（下線部）、上記の注釈

【０１３０】

実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＮＰ＿０５７９３３のアミノ酸６５９～１３２９の配列のＣ末端に、１つの更なるアミノ酸を更に含む。複数の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＲＮａｓｅＨ１ドメイン（例えば、ＮＰ＿０５７９３３のアミノ酸１１７８～１３１８）を含む。

【０１３１】

一部の実施形態では、レトロウイルス逆転写酵素ドメイン、例えば、Ｍ－ＭＬＶ　ＲＴは、ＲＴの特徴、例えば、熱安定性、処理能力、及び／又は鋳型結合を改善し得る、野生型配列からの１つ又は複数の突然変異を含み得る。一部の実施形態では、Ｍ－ＭＬＶ　ＲＴドメインは、上のＭ－ＭＬＶ（ＷＴ）配列に対して、例えば、Ｄ２００Ｎ、Ｌ６０３Ｗ、Ｔ３３０Ｐ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｄ５２４Ｇ、Ｅ５６２Ｑ、Ｄ５８３Ｎ、Ｐ５１Ｌ、Ｓ６７Ｒ、Ｅ６７Ｋ、Ｔ１９７Ａ、Ｈ２０４Ｒ、Ｅ３０２Ｋ、Ｆ３０９Ｎ、Ｌ４３５Ｇ、Ｎ４５４Ｋ、Ｈ５９４Ｑ、Ｄ６５３Ｎ、Ｒ１１０Ｓ、Ｋ１０３Ｌから選択される１つ又は複数の突然変異、例えば、任意選択でＴ３０６Ｋ及びＷ３１３Ｆを更に含む、Ｄ２００Ｎ、Ｌ６０３Ｗ、及びＴ３３０Ｐなどの突然変異の組合せを含む。一部の実施形態では、本明細書で用いられるＭ－ＭＬＶ　ＲＴは、突然変異Ｄ２００Ｎ、Ｌ６０３Ｗ、Ｔ３３０Ｐ、Ｔ３０６Ｋ及びＷ３１３Ｆを含む。複数の実施形態では、突然変異体Ｍ－ＭＬＶ　ＲＴは、以下のアミノ酸配列を含む。

Ｍ－ＭＬＶ（ＰＥ２）：

【化５】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSI
KQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNK
RVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGIS
GQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQG
TRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKT
PRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAP
ALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRM
VAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDR
VQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSL
LQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRY
AFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEAR
GNRMADQAARKAAITETPDTSTLLI (配列番号 : 4015)

【０１３２】

一部の実施形態では、ライティングドメイン（例えば、ＲＴドメイン）は、例えば、ＲＮＡ配列に特異的に結合するＲＮＡ結合ドメインを含む。一部の実施形態では、鋳型ＲＮ

Ａは、ライティングドメインのＲＮＡ結合ドメインによって特異的に結合されるＲＮＡ配列を含む。

【０１３３】

一部の実施形態では、逆転写ドメインは、単に、システムの特定の鋳型、例えば、鋳型ＲＮＡを認識し、逆転写する。一部の実施形態では、鋳型は、逆転写ドメインによって認識及び逆転写を可能にする配列又は構造を含む。一部の実施形態では、鋳型は、本明細書に記載されるゲノム改変システムのポリペプチド成分のＲＮＡ結合ドメインとの会合を可能にする配列又は構造を含む。一部の実施形態では、ゲノム改変システムは、会合配列を欠く鋳型より、会合配列を含む鋳型を好ましくは逆転写する。

【０１３４】

ライティングドメインは、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性も含み得、例えば、ＤＮＡを鋳型ＤＮＡ配列からのゲノムにライティングする能力がある酵素活性を含む。一部の実施形態では、ＤＮＡ依存性ＤＮＡ重合が、標的部位編集の第２の鎖合成を完了するのに用いられる。一部の実施形態では、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性は、ポリペプチド中のＤＮＡポリメラーゼドメインによって提供される。一部の実施形態では、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性は、ＤＮＡ依存性ＤＮＡ重合、例えば、第２の鎖合成も可能である逆転写酵素ドメインによって提供される。一部の実施形態では、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性は、システムの第２のポリペプチドによって提供される。一部の実施形態では、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性は、任意選択で、ゲノム改変システムの成分により、標的部位に動員される内因性宿主細胞ポリメラーゼによって提供される。

【０１３５】

一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、インビトロで、参照逆転写酵素ドメインと比較してより低い確率で不十分な終結率（Ｐｏｆｆ）を有する。一部の実施形態では、参照逆転写酵素ドメインは、ウイルス逆転写酵素ドメイン、例えば、Ｍ－ＭＬＶからのＲＴドメインである。

【０１３６】

一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、例えば、１０９４ｎｔのＲＮＡでの測定によると、インビトロで、約５×１０$^{-3}$／ｎｔ、５×１０$^{-4}$／ｎｔ、又は５×１０$^{-6}$／ｎｔ未満の、より低い確率での不十分な終結率（Ｐｏｆｆ）を有する。複数の実施形態では、インビトロでの不十分な終結率は、Ｂｉｂｉｌｌｏ ａｎｄ Ｅｉｃｋｂｕｓｈ（２００２）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７７（３８）：３４８３６－３４８４５（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように決定される。

【０１３７】

一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、細胞における組み込みの少なくとも約３０％又は５０％を完了することができる。完全な組み込みのパーセントは、実質的に完全長の組み込み事象（例えば、予想された組み込み配列の少なくとも９８％を含むゲノム部位）の数をｂｙ細胞集団内の（実質的に完全長及び部分を含む）全体の組み込み事象の数で除することによって測定され得る。複数の実施形態では、細胞における組み込みは、例えば、Ｋａｒｓｔ ｅｔ ａｌ．（２０２０）ｂｉｏＲｘｉｖ ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／６４５９０３（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ロングリードアンプリコン配列決定を用いて（例えば、組み込み部位を通じて）決定される。

【０１３８】

複数の実施形態では、細胞における組み込みの定量化は、鋳型ＲＮＡ（例えば、少なくとも０．０５、０．１、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、１．５、２、３、４若しくは５ｋｂの長さ、例えば、０．５～０．６、０．６～０．７、０．７～０．８、０．８～０．９、１．０～１．２、１．２～１．４、１．４～１．６、１．６～１．８、１．８～２．０、２～３、３～４若しくは４～５ｋｂの長さを有する鋳型ＲＮＡ）に対応するＤＮＡ配列の少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％を含む組み込みの割合を計数することを含む。

【０１３９】
一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、インビトロでｄＮＴＰを重合可能である。複数の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、０．１～５０ｎｔ／秒（例えば、０．１～１、１～１０若しくは１０～５０ｎｔ／秒）の速度で、インビトロでｄＮＴＰを重合可能である。複数の実施形態では、逆転写酵素ドメインによるｄＮＴＰの重合は、例えば、Ｓｃｈｗａｒｔｚ ａｎｄ Ｑｕａｋｅ（２００９）ＰＮＡＳ １０６（４８）：２０２９４－２０２９９（その全体が参照により組み込まれる）に記載のように、単一分子アッセイによって測定される。
【０１４０】
一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、例えば、Ｙａｓｕｋａｗａ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ４９２（２）：１４７－１５３（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、1×10^{-3}～1×10^{-4}又は1×10^{-4}～1×10^{-5}個の置換／ｎｔのインビトロエラー率（例えば、ヌクレオチドの誤取り込み）を有する。一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、例えば、Ｋａｒｓｔ ｅｔ ａｌ．（２０２０）ｂｉｏＲｘｉｖ ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／６４５９０３（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、例えば、ロングリードアンプリコン配列決定により、細胞（例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞）内で1×10^{-3}～1×10^{-4}又は1×10^{-4}～1×10^{-5}個の置換／ｎｔのエラー率（例えば、ヌクレオチドの誤取り込み）を有する。
【０１４１】
一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、インビトロで標的ＲＮＡの逆転写を実施することが可能である。一部の実施形態では、逆転写酵素は、鋳型の逆転写を開始するため、少なくとも３ヌクレオチドのプライマーを必要とする。一部の実施形態では、標的ＲＮＡの逆転写は、例えば、Ｂｉｂｉｌｌｏ ａｎｄ Ｅｉｃｋｂｕｓｈ（２００２）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７７（３８）：３４８３６－３４８４５（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、（例として、例えば、３’末端に少なくとも３、４、５、６、７、８、９若しくは１０ｎｔを有する標的にアニールする、ｓｓＤＮＡプライマーが提供されるとき）標的ＲＮＡからのｃＤＮＡの検出によって判定される。
【０１４２】
一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、例えば、そのＲＮＡ鋳型をｃＤＮＡに変換する場合、逆転写を、例えば、タンパク質結合モチーフ（例えば、３’ＵＴＲ）が欠如したＲＮＡ鋳型と比較して、（例えば、ｃＤＮＡ生成により）少なくとも５倍又は１０倍より効率的に実施する。複数の実施形態では、逆転写の効率は、Ｙａｓｕｋａｗａ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ４９２（２）：１４７－１５３（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように測定される。
【０１４３】
一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、例えば、細胞（例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞）内で発現されるとき、任意の内因性細胞ＲＮＡより高い頻度（例えば、約５倍又は１０倍高い頻度）で、特定のＲＮＡ鋳型に特異的に結合する。複数の実施形態では、逆転写酵素ドメインと鋳型ＲＮＡとの間の特異的結合の頻度は、例えば、Ｌｉｎ ａｎｄ Ｍｉｌｅｓ（２０１９）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４７（１１）：５４９０－５５０１（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ＣＬＩＰ－ｓｅｑによって測定される。
【０１４４】
鋳型核酸結合ドメイン
遺伝子組換えポリペプチドは、典型的に、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）と会合することが可能な領域を有する。一部の実施形態では、鋳型核酸結合ドメインは、ＲＮＡ結合ドメインである。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、特定のシグネチャー、例えば構造モチーフを含むＲＮＡ分子と会合し得るモジュラードメインである。他の実施形

態では、鋳型核酸結合ドメイン（例えば、ＲＮＡ結合ドメイン）は、逆転写ドメイン内に含まれ、例えば、逆転写酵素由来の成分は、ＲＮＡの優先性についての既知のシグネチャーを有する。

【０１４５】

他の実施形態では、鋳型核酸結合ドメイン（例えば、ＲＮＡ結合ドメイン）は、標的ＤＮＡ結合ドメイン内に含まれる。例えば、一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、ｇＲＮＡを含む鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の構造を認識するＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質である。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＤＮＡ結合ドメインが標的ゲノムＤＮＡ配列に結合することを可能にする、ｇＲＮＡスカフォールドと会合するＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質を含むＤＮＡ結合ドメインを含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡスカフォールド及びｇＲＮＡスペーサーは、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）内部に含まれることで、ＤＮＡ結合ドメインは、鋳型核酸結合ドメインでもある。一部の実施形態では、ポリペプチドは、複数のドメイン内にＲＮＡ結合機能を有し、例えば、ＣＲＩＳＰＲ関連ＤＮＡ結合ドメイン内のｇＲＮＡ構造及び逆転写酵素ドメイン内の追加の配列又は構造に結合し得る。

【０１４６】

一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、標準ＲＮＡ結合ドメインよりも高い親和性で、鋳型ＲＮＡに結合することができる。一部の実施形態では、標準ＲＮＡ結合ドメインは、化膿性レンサ球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）のＣａｓ９由来のＲＮＡ結合ドメインである。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、１００ｐＭ～１０ｎＭ（例えば、１００ｐＭ～１ｎＭ又は１ｎＭ～１０ｎＭ）の親和性で、鋳型ＲＮＡに結合することができる。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインの、その鋳型ＲＮＡに対する親和性は、例えば、Ａｓｍａｒｉ ｅｔ ａｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １４６：１０７－１１９（２０１８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、例えば、熱泳動によりインビトロで測定される。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインの、その鋳型ＲＮＡに対する親和性は、細胞中で（例えば、ＦＲＥＴ又はＣＬＩＰ－Ｓｅｑにより）測定される。

【０１４７】

一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、鋳型ＲＮＡと、インビトロでスクランブルＲＮＡよりも少なくとも約５倍又は１０倍高い頻度で会合する。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインと鋳型ＲＮＡ又はスクランブルＲＮＡとの間の会合の頻度は、例えば、Ｌｉｎ ａｎｄ Ｍｉｌｅｓ（２０１９）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４７（１１）：５４９０－５５０１（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ＣＬＩＰ－ｓｅｑによって測定される。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインは、細胞内（例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞内）の鋳型ＲＮＡと、スクランブルＲＮＡよりも少なくとも約５倍又は１０倍高い頻度で会合する。一部の実施形態では、ＲＮＡ結合ドメインと鋳型ＲＮＡ又はスクランブルＲＮＡとの間の会合の頻度は、例えば、Ｌｉｎ ａｎｄ Ｍｉｌｅｓ（２０１９）（前掲）に記載のように、ＣＬＩＰ－ｓｅｑによって測定される。

【０１４８】

エンドヌクレアーゼドメイン及びＤＮＡ結合ドメイン

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、エンドヌクレアーゼドメインを介したＤＮＡ標的部位切断の機能を有する。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、例えば、標的核酸に結合するためのＤＮＡ結合ドメインを含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドのドメイン（例えば、Ｃａｓドメイン）は、２つ以上のより小さいドメイン、例えば、ＤＮＡ結合ドメイン及びエンドヌクレアーゼドメインを含む。ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、Ｃａｓドメイン）が、標的核酸配列に結合すると記載される場合、一部の実施形態では、結合は、ｇＲＮＡによって媒介されることが理解される。

【０１４９】

一部の実施形態では、ドメインは、２つの機能を有する。例えば、一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ＤＮＡ結合ドメインでもある。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）結合ドメインでもある。例えば、一部の実施形態では、ポリペプチドは、ｇＲＮＡを含む鋳型ＲＮＡに結合し、標的ＤＮＡ配列（例えば、ｇＲＮＡの一部に対する相補性を有する）に結合し、且つ標的ＤＮＡ配列を切断する、ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼドメインを含む。一部の実施形態では、異種の源に由来するエンドヌクレアーゼドメイン又はエンドヌクレアーゼ／ＤＮＡ結合ドメインは、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムにおいて、使用され得るか又は（例えば、１つ又は複数の残基の挿入、欠失又は置換によって）修飾され得る。

【０１５０】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はエンドヌクレアーゼ／ＤＮＡ結合ドメインをコードする核酸は、例えばヒト細胞について改善された、改変されたコドン使用を有するように、その天然配列から改変される。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼエレメントは、異種エンドヌクレアーゼエレメント、例えば、Ｃａｓエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）、ＩＩ型制限エンドヌクレアーゼ（例えば、Ｆｏｋ１）、メガヌクレアーゼ（例えば、Ｉ－ＳｃｅＩ）、又は他のエンドヌクレアーゼドメインである。

【０１５１】

特定の態様では、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドのＤＮＡ結合ドメインは、所望の宿主ＤＮＡ標的配列への結合のため、選択、設計、又は構築される。特定の実施形態では、ポリペプチドのＤＮＡ結合ドメインは、異種ＤＮＡ結合因子である。一部の実施形態では、異種ＤＮＡ結合因子は、ジンクフィンガー因子又はＴＡＬエフェクター因子、例えば、ジンクフィンガー又はＴＡＬポリペプチド又はその機能的フラグメントである。一部の実施形態では、異種ＤＮＡ結合因子は、エンドヌクレアーゼ活性を有しないように改変されている、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、又は他のＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質などの配列誘導性のＤＮＡ結合因子である。一部の実施形態では、異種ＤＮＡ結合因子は、エンドヌクレアーゼ活性を保持する。一部の実施形態では、異種ＤＮＡ結合因子は、ｓｓＤＮＡを切断するような部分的なエンドヌクレアーゼ活性を保持し、例えば、ニッカーゼ活性を有する。特定の実施形態では、異種ＤＮＡ結合ドメインは、Ｃａｓ９、ＴＡＬドメイン、ＺＦドメイン、Ｍｙｂドメイン、それらの組合せ、又はそれらの複合体のいずれか１つ又は複数であり得る。

【０１５２】

一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、例えば、部位特異的突然変異によって修飾されることで、ＤＮＡ結合因子（例えば、ジンクフィンガーの数及び／又は特異性）などを増加又は減少させ、ＤＮＡ－結合特異性及び親和性を改変する。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインをコードする核酸配列は、例えばヒト細胞について改善された、改変されたコドン使用を有するように、その天然配列から改変される。複数の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、野生型ＤＮＡ結合ドメインに対して１つ又は複数の修飾、例えば、指向性進化、例えば、ファージ支援連続進化（ＰＡＣＥ）による修飾を含む。

【０１５３】

一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、メガヌクレアーゼドメイン（例えば、エンドヌクレアーゼドメイン部分における、例えば、本明細書に記載されるもの）、又はその機能的フラグメントを含む。一部の実施形態では、メガヌクレアーゼドメインは、エンドヌクレアーゼ活性、例えば、二本鎖切断及び／又はニッカーゼ活性を有する。他の実施形態では、メガヌクレアーゼドメインは、低下した活性を有し、例えば、エンドヌクレアーゼ活性が欠失しており、例えば、メガヌクレアーゼは、触媒的に不活性である。一部の実施形態では、触媒的に不活性なメガヌクレアーゼは、例えば、Ｆｏｎｆａｒａ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４０（２）：８４７－８６０（２０１２）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ＤＮＡ結合ドメイン

として使用される。

【０１５４】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、例えば、野生型ポリペプチドと比べて、ＤＮＡ結合ドメインに対する修飾を含む。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、元のＤＮＡ結合ドメインのアミノ酸配列に対する付加、欠失、置換、又は修飾を含む。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、目的の標的核酸（例えば、ＤＮＡ）配列に特異的に結合する異種機能ドメインを含むように修飾される。一部の実施形態では、機能ドメインは、ポリペプチドの先のＤＮＡ結合ドメインの少なくとも一部（例えば、その全体）で置換する。一部の実施形態では、機能ドメインは、ジンクフィンガー（例えば、目的の標的核酸（例えば、ＤＮＡ）配列に特異的に結合するジンクフィンガーを含む。一部の実施形態では、機能ドメインは、Ｃａｓドメイン（例えば、目的の標的核酸（例えば、ＤＮＡ）配列に特異的に結合するＣａｓドメインを含む。一部の実施形態では、Ｃａｓドメインは、Ｃａｓ９又はその突然変異体若しくは変異体（例えば、本明細書に記載される）を含む。複数の実施形態では、Ｃａｓドメインは、例えば、本明細書に記載されるように、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）と会合する。複数の実施形態では、Ｃａｓドメインは、ｇＲＮＡにより、目的の標的核酸（例えば、ＤＮＡ）配列に導かれる。複数の実施形態では、Ｃａｓドメインは、ｇＲＮＡと同じ核酸（例えば、ＲＮＡ）分子においてコードされる。複数の実施形態では、Ｃａｓドメインは、ｇＲＮＡと異なる核酸（例えば、ＲＮＡ）分子においてコードされる。

【０１５５】

一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、標準ＤＮＡ結合ドメインよりも高い親和性で、標的配列（例えば、ｄｓＤＮＡ標的配列）に結合することができる。一部の実施形態では、標準ＤＮＡ結合ドメインは、化膿性レンサ球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）のＣａｓ９由来のＤＮＡ結合ドメインである。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、１００ｐＭ～１０ｎＭ（例えば、１００ｐＭ～１ｎＭ又は１ｎＭ～１０ｎＭ）の親和性で、標的配列（例えば、ｄｓＤＮＡ標的配列）に結合することができる。

【０１５６】

一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインの、その標的配列（例えば、ｄｓＤＮＡ標的配列）に対する親和性は、例えば、Ａｓｍａｒｉ ｅｔ ａｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １４６：１０７－１１９（２０１８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、例えば、熱泳動によりインビトロで測定される。

【０１５７】

実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、モル過剰の、例えば、約１００倍モル過剰のスクランブル配列競合ｄｓＤＮＡの存在下で、例えば、１００ｐＭ～１０ｎＭ（例えば、１００ｐＭ～１ｎＭ又は１ｎＭ～１０ｎＭ）の親和性で、その標的配列（例えば、ｄｓＤＮＡ標的配列）に結合することができる。

【０１５８】

一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、例えば、Ｈｅ ａｎｄ Ｐｕ（２０１０）Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ Ｃｈａｐｔｅｒ ２１（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、例えば、ＣｈＩＰ－ｓｅｑ（例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞中で）により測定して、標的細胞、例えば、ヒト標的細胞のゲノム中のいずれか他の配列よりも高い頻度で、その標的配列（例えば、ｄｓＤＮＡ標的配列）と結合していることが認められる。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、例えば、Ｈｅ ａｎｄ Ｐｕ（２０１０）（前掲）に記載のように、例えば、ＣｈＩＰ－ｓｅｑ（例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ中で）により測定して、標的細胞のゲノム中のいずれか他の配列よりも少なくとも約５倍又は１０倍高い頻度で、その標的配列（例えば、ｄｓＤＮＡ標的配列）と結合していることが認められる。

【０１５９】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ニッカーゼ活性を有し、標的ＤＮＡの１つの鎖を切断する。一部の実施形態では、ニッカーゼ活性は、標的部位における

二本鎖切断の形成を減少させる。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、標的ＤＮＡの第１の鎖及び第２の鎖におけるねじれ型のニック構造を生成する。一部の実施形態では、ねじれ型のニック構造は、標的部位における遊離３’オーバーハングを生成する。一部の実施形態では、標的部位における遊離３’オーバーハングは、例えば、鋳型核酸の３’相同性領域のアクセス及びアニーリングを強化することによって編集効率を改善する。一部の実施形態では、ねじれ型のニック構造は、標的部位における二本鎖切断の形成を減少させる。

【０１６０】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、標的ＤＮＡの両方の鎖を切断し、例えば、切断部位のいずれの側にもｓｓＤＮＡオーバーハングを有さない標的の平滑末端切断をもたらす。本明細書に記載される遺伝子組換えシステムのエンドヌクレアーゼドメインのアミノ酸配列は、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼドメインのアミノ酸配列と、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％同一であり得る。

【０１６１】

特定の実施形態では、異種エンドヌクレアーゼは、Ｆｏｋ１又はその機能性断片である。特定の実施形態では、異種エンドヌクレアーゼは、ホリデイジャンクションリゾルバーゼ又はその相同体、例えば、スルホロブス・ソルファタリカス（Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ ｓｏｌｆａｔａｒｉｃｕｓ）からのホリデイジャンクション切断酵素（Ｓｓｏｌ Ｈｊｅ）である（Ｇｏｖｉｎｄａｒａｊｕ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ４４：７，２０１６）。特定の実施形態では、異種エンドヌクレアーゼは、Ｐｒｐ８などのスプライセオソームタンパク質の大きい断片のエンドヌクレアーゼである（Ｍａｈｂｕｂ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｂｉｌｅ ＤＮＡ ８：１６，２０１７）。特定の実施形態では、異種エンドヌクレアーゼは、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質、例えば、Ｃａｓ９に由来する。特定の実施形態では、異種エンドヌクレアーゼは、ｓｓＤＮＡ切断活性のみ、例えば、ニッカーゼ活性のみを有するように、例えば、Ｃａｓ９ニッカーゼ、例えば、Ｄ１０Ａ、Ｈ８４０Ａ、又はＮ８６３Ａ突然変異を有するＳｐＣａｓ９であるように改変される。表３は、例示的なＣａｓタンパク質及びニッカーゼ活性に関連する突然変異を示す。更に他の実施形態では、相同エンドヌクレアーゼドメインは、例えば、部位特異的突然変異によって修飾されることで、ＤＮＡエンドヌクレアーゼ活性を改変する。更に他の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、例えば、ＤＮＡ配列特異性を付与する領域を不活性化するために、ＤＮＡ配列特異性又は突然変異を付与するドメインを除去するための切断により、ＤＮＡ配列特異性を低下させるように修飾される。

【０１６２】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ニッカーゼ活性を有し、二本鎖切断を形成しない。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、二本鎖切断より高い頻度で一本鎖切断を形成し、例えば、切断の少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％は、一本鎖切断であり、又は切断の１０％、５％、４％、３％、２％若しくは１％未満は、二本鎖切断である。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼは、二本鎖切断を実質的に形成しない。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼは、検出可能なレベルの二本鎖切断を形成しない。

【０１６３】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、第１の鎖の標的部位ＤＮＡに切れ目を入れるニッカーゼ活性を有し；例えば、一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ライティングドメインによって伸長されることになる鎖上の改変部位近傍の標的部位のゲノムＤＮＡを切断する。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、第１の鎖の標的部位ＤＮＡに切れ目を入れ、第２の鎖の標的部位ＤＮＡに切れ目を入れないニッカーゼ活性を有する。例えば、ポリペプチドが、ニッカーゼ活性を有するＣＲ

ＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼドメインを含むとき、一部の実施形態では、前記ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼドメインは、ＰＡＭ部位を含む標的部位ＤＮＡ鎖に切れ目を入れる（例えば、そしてＰＡＭ部位を含まない標的部位ＤＮＡ鎖に切れ目を入れない）。更なる例として、ポリペプチドが、ニッカーゼ活性を有するＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼドメインを含むとき、一部の実施形態では、前記ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼドメインは、ＰＡＭ部位を含まない標的部位ＤＮＡ鎖に切れ目を入れる（例えば、そしてＰＡＭ部位を含む標的部位ＤＮＡ鎖に切れ目を入れない）。

【０１６４】

いくつかの他の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、第１の鎖及び第２の鎖の標的部位ＤＮＡに切れ目を入れるニッカーゼ活性を有する。特定の理論に束縛されることを意図しないが、本明細書に記載のポリペプチドのライティングドメイン（例えば、ＲＴドメイン）が鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列から重合（例えば、逆転写）後、細胞ＤＮＡ修復機構は、第１のＤＮＡ鎖上のニックを修復しなければならない。標的部位ＤＮＡはここで、第１のＤＮＡ鎖に対して２つの異なる配列を含み：１番目は元のゲノムＤＮＡ（例えば、自由５’末端を有する）に対応し、２番目は異種目的配列（例えば、自由３’末端を有する）から重合されたものに対応する。２つの異なる配列が互いに平衡化し、まず一方、次いで他方が第２の鎖とハイブリダイズすると考えられ、ここで細胞ＤＮＡ修復装置のその修復標的部位への組み込みの順序は確率過程であると考えられる。特定の理論に束縛されることを意図しないが、更なるニックの第２の鎖への導入が、異種目的配列に基づく配列を元のゲノム配列よりも頻繁に用いるように、細胞ＤＮＡ修復機構をバイアスし得ると考えられる（Ａｎｚａｌｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　５７６：１４９－１５７（２０１９））。一部の実施形態では、更なるニックは、標的部位修飾（例えば、挿入、欠失又は置換）の５’若しくは３’又は第１の鎖上のニックに対して、少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５若しくは１５０ヌクレオチドに位置づけられる。

【０１６５】

代替的に又は追加的に、特定の理論に束縛されることを意図しないが、第２の鎖に対する更なるニックが第２の鎖合成を促進し得ると考えられる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムが第１の鎖の一部を挿入又は置換している場合、第２の鎖における挿入／置換に対応する新しい配列の合成が必要である。

【０１６６】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、エンドヌクレアーゼ活性を有する単一ドメイン（例えば、単一エンドヌクレアーゼドメイン）を含み、前記ドメインは、第１の鎖及び第２の鎖の両方に切れ目を入れる。例えば、こうした実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ＣＲＩＳＰＲ関連エンドヌクレアーゼドメインであり得、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、第１の鎖のニッキングを導くｇＲＮＡスペーサー及び第２の鎖のニッキングを導く更なるｇＲＮＡスペーサーを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、エンドヌクレアーゼ活性を有する複数のドメインを含み、第１のエンドヌクレアーゼドメインは、第１の鎖に切れ目を入れ、且つ第２のエンドヌクレアーゼドメインは、第２の鎖に切れ目を入れる（任意選択で、第１のエンドヌクレアーゼドメインは、第２の鎖に切れ目を入れず（例えば、それができず）、且つ第２のエンドヌクレアーゼドメインは、第１の鎖に切れ目を入れない（例えば、それができない））。

【０１６７】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、第１の鎖及び第２の鎖に切れ目を入れることができる。一部の実施形態では、第１の鎖及び第２の鎖ニックは、標的部位における同じ位置で起こるが、逆鎖上では起きない。一部の実施形態では、第２の鎖ニックは、例えば、第１ニックから上流又は下流の、ねじれた位置で起こる。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、第２の鎖ニックが第１の鎖ニックの上流にある場

合、標的部位の欠失を生成する。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、第２の鎖ニックが第１の鎖ニックの下流にある場合、標的部位の重複を生成する。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、第１及び第２の鎖ニックが標的部位の同じ位置で起こる場合、重複及び／又は欠失を生成しない。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、例えば、（例えば、Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２００６に記載のとおり；その全体は参照により本明細書に組み込まれる）第１の鎖又は第２の鎖のニッキングを促進する、タンパク質立体構造又はＲＮＡ結合状態に応じた、改変された活性を有する。

【０１６８】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、メガヌクレアーゼ、又はその機能性断片を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ホーミングエンドヌクレアーゼ、又はその機能性断片を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、例えばファミリー名に示されるとおり、例えば、保存されたアミノ酸モチーフを有する、ＬＡＧＬＩＤＡＤＧ（配列番号４５５５）、ＧＩＹ－ＹＩＧ、ＨＮＨ、Ｈｉｓ－Ｃｙｓ　Ｂｏｘ、又はＰＤ－（Ｄ／Ｅ）ＸＫファミリーからのメガヌクレアーゼ、又はその機能性断片若しくは変異体を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、例えば、Ｉ－ＳｍａＭＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｆ７ＷＤ４２）、Ｉ－ＳｃｅＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｐ０３８８２）、Ｉ－ＡｎｉＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｐ０３８８０）、Ｉ－ＤｍｏＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｐ２１５０５）、Ｉ－ＣｒｅＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｐ０５７２５）、Ｉ－ＴｅｖＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｐ１３２９９）、Ｉ－ＯｎｕＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｑ４ＶＷＷ５）、又はＩ－ＢｍｏＩ（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｑ９ＡＮＲ６）から選択されるメガヌクレアーゼ、又はその断片を含む。一部の実施形態では、メガヌクレアーゼは、天然には、その機能的形態において、単量体、例えば、Ｉ－ＳｃｅＩ、Ｉ－ＴｅｖＩ、又は二量体、例えば、Ｉ－ＣｒｅＩである。例えば、ＬＡＧＬＩＤＡＤＧ（配列番号４５５５）モチーフの単一コピーを有するＬＡＧＬＩＤＡＤＧ（配列番号４５５５）メガヌクレアーゼは、一般にホモ二量体を形成する一方、ＬＡＧＬＩＤＡＤＧ（配列番号４５５５）モチーフの２つのコピーを有するメンバーは、一般に単量体として見出される。一部の実施形態では、通常は二量体として形成するメガヌクレアーゼは、融合体として発現され、例えば、２つのサブユニットは、単一のＯＲＦとして、任意選択で、リンカーによって連結された、例えばＩ－ＣｒｅＩ二量体融合体として発現される（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ－Ｆｏｒｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　２０２０；その全体は参照により本明細書に組み込まれる）。一部の実施形態では、メガヌクレアーゼ、又はその機能性断片は、二本鎖ＤＮＡ分子、例えば、Ｉ－ＳｃｅＩ（Ｋ１２２Ｉ及び／又はＫ２２３Ｉ）（Ｎｉｕ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２００８）、Ｉ－ＡｎｉＩ（Ｋ２２７Ｍ）（ＭｃＣｏｎｎｅｌｌ　Ｓｍｉｔｈ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２００９）、Ｉ－ＤｍｏＩ（Ｑ４２Ａ及び／又はＫ１２０Ｍ）（Ｍｏｌｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２０１５）の一方の鎖においてニッカーゼ活性を優先するように改変される。一部の実施形態では、一本鎖切断についてのこの優先性を有するメガヌクレアーゼ又はその機能性断片は、例えばニッカーゼ活性を有するエンドヌクレアーゼドメインとして使用される。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、安全な港湾部位、例えば、Ｉ－ＣｒｅＩを標的にするＳＨ６部位を天然に標的にする、又は標的にするように改変された、メガヌクレアーゼ、又はその機能性断片を含む（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ－Ｆｏｒｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．、上記）。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、配列耐性触媒ドメインを有する、メガヌクレアーゼ、又はその機能性断片、例えば、最小モチーフＣＮＮＮＧを認識するＩ－ＴｅｖＩを含む（Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２０１２）。一部の実施形態では、標的配列耐性触媒ドメインは、ＤＮＡ結合ドメインに融合され、例として、例えば、Ｉ－ＴｅｖＩを、（ｉ）Ｔｅｖ－ＺＦＥを作出するためのＺｎフィンガー（Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２０１２）、（ｉｉ）ＭｅｇａＴｅｖを作出するための他のメガヌクレアーゼ（Ｗｏｌｆｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　２０１４）、及び／又は（ｉｉｉ）ＴｅｖＣ

ａｓ９を作出するためのＣａｓ９（Ｗｏｌｆｓ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２０１６）に融合させることによって活性を誘導する。

【０１６９】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、制限酵素、例えば、タイプＩＩＳ又はタイプＩＩＰ制限酵素を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、タイプＩＩＳ制限酵素、例えば、ＦｏｋＩ又はその断片若しくは変異体を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、タイプＩＩＰ制限酵素、例えば、ＰｖｕＩＩ又はその断片若しくは変異体を含む。一部の実施形態では、二量体制限酵素は、それが一本鎖として機能するように、融合体、例えば、ＦｏｋＩ二量体融合体として発現される（Ｍｉｎｃｚｕｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　３６（１２）：３９２６－３９３８（２００８））。

【０１７０】

更なるエンドヌクレアーゼドメインの使用は、例えば、Ｇｕｈａ　ａｎｄ　Ｅｄｇｅｌｌ　Ｉｎｔ　Ｊ　Ｍｏｌ　Ｓｃｉ　１８（２２）：２５６５（２０１７）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０１７１】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、例えば、野生型Ｃａｓタンパク質と比べて、エンドヌクレアーゼドメインに対する修飾を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、野生型Ｃａｓタンパク質のアミノ酸配列に対する付加、欠失、置換、又は修飾を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、目的の標的核酸（例えば、ＤＮＡ）配列に特異的に結合し、且つ／又はそのエンドヌクレアーゼ切断を誘導する異種機能ドメインを含むように修飾される。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ジンクフィンガーを含む。複数の実施形態では、Ｃａｓドメインを含むエンドヌクレアーゼドメインは、例えば、本明細書に記載される、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）と会合する。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、特定の標的核酸（例えば、ＤＮＡ）配列を標的にしない機能ドメインを含むように修飾される。複数の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、Ｆｏｋ１ドメインを含む。

【０１７２】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、標的ｄｓＤＮＡと、インビトロでスクランブルｄｓＤＮＡよりも少なくとも約５倍又は１０倍高い頻度で会合する。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、例えば、細胞（例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞）内で、標的ｄｓＤＮＡと、インビトロでスクランブルｄｓＤＮＡよりも少なくとも約５倍又は１０倍高い頻度で会合する。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインと標的ＤＮＡ又はスクランブルＤＮＡとの間の会合の頻度は、例えば、Ｈｅ　ａｎｄ　Ｐｕ（２０１０）Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈａｐｔｅｒ　２１（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ＣｈＩＰ－ｓｅｑによって測定される。

【０１７３】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、標的配列でのニックの形成を、例えば、非標的配列と比較して（例えば、標的細胞のゲノム中の任意の他のゲノム配列と比較して）、少なくとも約５倍又は１０倍の増加まで触媒し得る。一部の実施形態では、ニック形成のレベルは、例えば、Ｅｌａｃｑｕａ　ｅｔ　ａｌ．（２０１９）ｂｉｏＲｘｉｖ　ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／８６７９３７（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ニックＳｅｑを用いて測定される。

【０１７４】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、インビトロでのＤＮＡのニッキングが可能である。複数の実施形態では、ニックは、露出された塩基をもたらす。複数の実施形態では、露出された塩基は、例えば、Ｃｈａｕｄｈｒｙ　ａｎｄ　Ｗｅｉｎｆｅｌｄ（１９９５）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　２３（１９）：３８０５－３８０９（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、ヌクレアーゼ感受

性アッセイを用いて検出され得る。複数の実施形態では、（例えば、ヌクレアーゼ感受性アッセイによって検出された）露出された塩基のレベルは、参照エンドヌクレアーゼドメインと比較して、少なくとも１０％、５０％若しくはそれ以上増加する。一部の実施形態では、参照エンドヌクレアーゼドメインは、化膿性レンサ球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）のＣａｓ９由来のエンドヌクレアーゼドメインである。

【０１７５】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、細胞内のＤＮＡのニッキングが可能である。複数の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞内のＤＮＡのニッキングが可能である。複数の実施形態では、Ｒａｄ５１の非存在下で複製を受ける未修復のニックは、例えば、Ｂｏｔｈｍｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ ８：１３９０５（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載の、例えば、Ｒａｄ５１阻害アッセイを用いることによって検出可能である、ニックの部位でのＮＨＥＪ率の増加をもたらす。複数の実施形態では、ＮＨＥＪ率は、０～５％超増加する。複数の実施形態では、ＮＨＥＪ率は、例えば、Ｒａｄ５１阻害時、２０～７０％（例えば、３０％～６０％又は４０～５０％）まで増加する。

【０１７６】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、切断後、標的を放出する。一部の実施形態では、標的の放出は、例えば、Ｙｏｕｒｉｋ ａｔ ａｌ．ＲＮＡ ２５（１）：３５－４４（２０１９）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、また図２に示すように、酵素による複数のターンオーバーについて評価することによって間接的に示される。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインのk_{exp}は、こうした方法により測定して、1×10^{-3}～1×10^{-5}分－１である。

【０１７７】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、インビトロで約$1\times10^{8}s^{-1}M^{-1}$を超える触媒効率（$k_{cat}/K_m$）を有する。複数の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、インビトロで約1×10^{5}、1×10^{6}、1×10^{7}、又は$1\times10^{8}s^{-1}M^{-1}$を超える触媒効率を有する。複数の実施形態では、触媒効率は、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．（２０１８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ３６０（６３８７）：４３６－４３９（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように決定される。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、細胞内で約$1\times10^{8}s^{-1}M^{-1}$を超える触媒効率（$k_{cat}/K_m$）を有する。複数の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメインは、細胞内で約1×10^{5}、1×10^{6}、1×10^{7}、又は$1\times10^{8}s^{-1}M^{-1}$を超える触媒効率を有する。

【０１７８】

Ｃａｓドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド

一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドは、Ｃａｓドメインを含む。一部の実施形態では、Ｃａｓドメインは、遺伝子組換えポリペプチドを、ｇＲＮＡスペーサーによって特定される標的部位に導き、それにより、「ｃｉｓ」における標的核酸配列を修飾し得る。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、Ｃａｓドメインに融合される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメイン（本明細書においてＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質とも呼ばれる）を含む。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）システムに関与するタンパク質、例えば、Ｃａｓタンパク質を含み、任意選択で、ガイドＲＮＡ、例えば単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に結合する。

【０１７９】

ＣＲＩＳＰＲシステムは、最初に細菌及び古細菌において発見された適応防御システムである。ＣＲＩＳＰＲシステムは、外来ＤＮＡを切断するため、ＣＲＩＳＰＲ関連又は「Ｃａｓ」エンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９又はＣｐｆ１）と称されるＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼを使用する。例えば、典型的なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムにおいて、エ

ンドヌクレアーゼは、一本鎖又は二本鎖ＤＮＡ配列を標的にする、配列特異的な非コード「ガイドＲＮＡ」により、標的ヌクレオチド配列（例えば、配列編集対象のゲノム中の部位）に導かれる。ＣＲＩＳＰＲシステムの３つのクラス（Ｉ～ＩＩＩ）は、同定されている。クラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲシステムは、（複数のＣａｓタンパク質ではなく）単一のＣａｓエンドヌクレアーゼを使用する。１つのクラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲシステムは、Ｃａｓ９、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（「ｃｒＲＮＡ」）、及びトランス活性化ｃｒＲＮＡ（「ｔｒａｃｒＲＮＡ」）などのＩＩ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼを含む。ｃｒＲＮＡは、典型的に、標的ＤＮＡ配列に対応する約２０ヌクレオチドのＲＮＡ配列である「スペーサー」配列（プロトスペーサー）を含む。野生型システムにおいて、またいくつかの改変システムにおいて、ｃｒＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡに結合し、リボヌクレアーゼＩＩＩによって切断される、部分的に二本鎖の構造を形成し、ｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒＲＮＡハイブリッド分子をもたらす領域も含む。次に、ｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒＲＮＡハイブリッドは、ＣａｓエンドヌクレアーゼをＤＮＡ配列を認識し、切断するように導く。標的ＤＮＡ配列は、一般に、所与のＣａｓエンドヌクレアーゼに特異的であり、ｃｒＲＮＡのスペーサーに一致する標的部位における切断活性に必要とされる「プロトスペーサー隣接モチーフ」（「ＰＡＭ」）に隣接する。様々な原核生物種から同定されたＣＲＩＳＰＲエンドヌクレアーゼは、例えば、表３中の例示的なＣａｓ酵素について列挙される、固有のＰＡＭ配列の要件を有し；ＰＡＭ配列の例として、５’－ＮＧＧ（化膿レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ））、５’－ＮＮＡＧＡＡ（ストレプトコッカス・サーモフィラス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ１）、５’－ＮＧＧＮＧ（ストレプトコッカス・サーモフィラス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ３）、及び５’－ＮＮＮＧＡＴＴ（髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ　ｍｅｎｉｎｇｉｄｉｔｉｓ））が挙げられる。いくつかのエンドヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、ＧリッチＰＡＭ部位、例えば５’－ＮＧＧと会合し、ＰＡＭ部位から上流（から５’側）の３つのヌクレオチドの位置で標的ＤＮＡの平滑末端切断を実施する。別のクラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲシステムは、Ｃａｓ９より小さいＶ型エンドヌクレアーゼＣｐｆ１を含み；例として、ＡｓＣｐｆ１（アシダミノコッカス種（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．）由来）及びＬｂＣｐｆ１（ラクノスピラセアエ種（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｓｐ．）由来）が挙げられる。Ｃｐｆ１関連ＣＲＩＳＰＲアレイは、ｔｒａｃｒＲＮＡを必要とせず、成熟ｃｒＲＮＡに処理され；換言すれば、Ｃｐｆ１システムは、一部の実施形態において、標的ＤＮＡ配列を切断するため、専らＣｐｆ１ヌクレアーゼ及びｃｒＲＮＡを含む。Ｃｐｆ１エンドヌクレアーゼは、典型的に、ＴリッチＰＡＭ部位、例えば５’－ＴＴＮと会合する。Ｃｐｆ１は、５’－ＣＴＡ　ＰＡＭモチーフも認識し得る。Ｃｐｆ１は、典型的に、オフセット又はねじれ型の二本鎖切断を４－又は５－ヌクレオチドの５’オーバーハングに導入し、例えば、コード鎖上のＰＡＭ部位から１８ヌクレオチド下流（３’側）及び相補鎖上のＰＡＭ部位から２３ヌクレオチド下流に位置する、５－ヌクレオチドのオフセット又はねじれ型切断によって標的ＤＮＡを切断することによって標的ＤＮＡを切断し；こうしたオフセット切断から得られる５－ヌクレオチドのオーバーハングは、平滑末端切断ＤＮＡでの挿入ではなく、相同組換えによるＤＮＡ挿入により、より正確なゲノム編集を可能にする。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｃｅｌｌ，１６３：７５９－７７１を参照されたい。

【０１８０】

種々のＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）遺伝子又はタンパク質は、本開示によって提供される技術において使用することができ、Ｃａｓタンパク質の選択は、その方法の特定条件に依存することになる。Ｃａｓタンパク質の具体例として、Ｃａｓ１、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１０、Ｃｐｆ１、Ｃ２Ｃ１、又はＣ２Ｃ３を含むクラスＩＩシステムが挙げられる。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質、例えば、Ｃａｓ９タンパク質は、種々の原核生物種のいずれに由来し得る。一部の実施形態では、特定のＣａｓタンパク質、例えば、特定のＣａｓ９タン

パク質は、特定のプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列を認識するように選択される。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメイン又はエンドヌクレアーゼドメインは、Ｃａｓタンパク質、例えば、Ｃａｓ９などの配列標的化ポリペプチドを含む。特定の実施形態では、Ｃａｓタンパク質、例えばＣａｓ９タンパク質は、細菌若しくは古細菌から得ることができるか、又は公知の方法を用いて合成され得る。特定の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、グラム陽性細菌又はグラム陰性細菌に由来し得る。特定の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）（例えば、化膿性連鎖球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、又はＳ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ））、フランシセラ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ）（例えば、Ｆ．ノビシダ（Ｆ．ｎｏｖｉｃｉｄａ））、ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）（例えば、黄色ブドウ球菌（Ｓ．ａｕｒｅｕｓ））、アシダミノコッカス（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ）（例えば、アシダミノコッカス種ＢＶ３Ｌ６（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６））、ナイセリア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）（例えば、髄膜炎菌（Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ））、クリプトコッカス（ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ヘモフィルス（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ）、真正細菌（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、パスツレラ（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ）、プレボテーラ（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ）、ベイロネラ（Ｖｅｉｌｌｏｎｅｌｌａ）、又はマリノバクター（Ｍａｒｉｎｏｂａｃｔｅｒ）に由来し得る。

【０１８１】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、表３若しくは４に列挙されるＣａｓドメイン又はその機能的フラグメント、又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％の同一性を有する配列を含み得る。

【０１８２】

【表３】

表 3. CRISPR/Cas タンパク質、種、及び突然変異

名称	*酵素*	*種*	*AA の数*	*PAM*	*PAM 認識を改変するための突然変異*	*触媒不活性化のための突然変異*
FnCas9	Cas9	*フランシセラ・ノビシダ(Francisella novicida)*	1629	5'-NGG-3'	Wt	D11A/H969A/N995A
FnCas9 RHA	Cas9	*フランシセラ・ノビシダ(Francisella novicida)*	1629	5'-YG-3'	E1369R/E1449H/R1556A	D11A/H969A/N995A
SaCas9	Cas9	*黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)*	1053	5'-NNGRRT-3'	Wt	D10A/H557A
SaCas9 KKH	Cas9	*黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)*	1053	5'-NNNRRT-3'	E782K/N968K/R1015H	D10A/H557A
SpCas9	Cas9	*化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)*	1368	5'-NGG-3'	Wt	D10A/D839A/H840A/N863A
SpCas9 VQR	Cas9	*化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)*	1368	5'-NGA-3'	D1135V/R1335Q/T1337R	D10A/D839A/H840A/N863A
AsCpf1 RR	Cpf1	*アシダミノコッカス属 (Acidaminococcus sp.)BV3L6*	1307	5'-TYCV-3'	S542R/K607R	E993A
AsCpf1 RVR	Cpf1	*アシダミノコッカス属 (Acidaminococcus sp.)BV3L6*	1307	5'-TATV-3'	S542R/K548V/N552R	E993A
FnCpf1	Cpf1	*フランシセラ・ノビシダ(Francisella novicida)*	1300	5'-NTTN-3'	Wt	D917A/E1006A/D1255A
NmCas9	Cas9	*髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis)*	1082	5'-NNNGATT-3'	Wt	D16A/D587A/H588A/N611A

【０１８３】

【表４－１】

表4 CRISPR/Casタンパク質、種、及び突然変異のアミノ酸配列

変異体	親宿主	タンパク質配列	ニッカーゼ (HNH)	ニッカーゼ (HNH)	ニッカーゼ (RuvC)	配列番号
Nme2Cas9	髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis)	MAAFKPNPINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRARRLLKREGVLQAADFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVANNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRGDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSSELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRVQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLVRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKECNLNDTRYVNRFLCQFVADHILLTGKGKRRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGKVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGAHKDTLRSAKRFVKHNEKISVKRVWLTEIKLADLENMVNYKNGREIELYEALKARLEAYGGNAKQAFDPKDNPFYKKGGQLVKAVRVEKTQESGVLLNKKNAYTIADNGDMVRVDVFCKVDKKGKNQYFIVPIYAWQVAENILPDIDCKGYRIDDSYTFCFSLHKYDLIAFQKDEKSKVEFAYYINCDSSNGRFYLAWHDKGSKEQQFRISTQNLVLIQKYQVNELGKEIRPCRLKKRPPVR	N611A	H588A	D16A	4556
PpnCas9	肺パスツレラ菌 (Pasteurella pneumotropica)	MQNNPLNYILGLDLGIASIGWAVVEIDEESSPIRLIDVGVRTFERAEVAKTGESLALSRRLARSSRRLIKRRAERLKKAKRLLKAEKILHSIDEKLPINVWQLRVKGLKEKLERQEWAAVLLHLSKHRGYLSQRKNEGKSDNKELGALLSGIASNHQMLQSSEYRTPAEIAVKKFQVEEGHIRNQRGSYTHTFSRLDLLAEMELLFQRQAELGNSYTSTTLLENLTALLMWQKPALAGDAILKMLGKCTFEPSEYKAAKNSYSA	N605A	H582A	D13A	4557

【０１８４】

【表４－２】

		ERFVWLTKLNNLRILENGTERALNDNERFALLEQPYEKSKLTYAQVRAMLAL SDNAIFKGVRYLGEDKKTVESKTTLIEMKFYHQIRKTLGSAELKKEWNELKGN SDLLDEIGTAFSLYKTDDDICRYLEGKLPERVLNALLENLNFDKFIQLSLKALHQ ILPLMLQGQRYDEAVSAIYGDHYGKKSTETTRLLPTIPADEIRNPVVLRTLTQA RKVINAVVRLYGSPARIHIETAREVGKSYQDRKKLEKQQEDNRKQRESAVKK FKEMFPHFVGEPKGKDILKMRLYELQQAKCLYSGKSLELHRLLEKGYVEVDH ALPFSRTWDDSFNNKVLVLANENQNKGNLTPYEWLDGKNNSERWQHFVV RVQTSGFSYAKKQRILNHKLDEKGFIERNLNDTRYVARFLCNFIADNMLLVG KGKRNVFASNGQITALLRHRWGLQKVREQNDRHHALDAVVVACSTVAMQ QKITRFVRYNEGNVFSGERIDRETGEIIPLHFPSPWAFFKENVEIRIFSENPKLE LENRLPDYPQYNHEWVQPLFVSRMPTRKMTGQGHMETVKSAKRLNEGLS VLKVPLTQLKLSDLERMVNRDREIALYESLKARLEQFGNDPAKAFAEPFYKKG GALVKAVRLEQTQKSGVLVRDGNGVADNASMVRVDVFTKGGKYFLVPIYT WQVAKGILPNRAATQGKDENDWDIMDEMATFQFSLCQNDLIKLVTKKKTI FGYFNGLNRATSNINIKEHDLDKSKGKLGIYLEVGVKLAISLEKYQVDELGKNI RPCRPTKRQHVR				
SauCas9	黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSA ALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK DGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYE GPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLN NLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTST GKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSE LTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKV DLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYS LEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQ YLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNL VDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKG YKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQ EYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVN NLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPL YKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKL SLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQA EFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPP RIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG	N580A	H557A	D10A	4558
SauCas9-KKH	黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSA ALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK DGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYE GPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLN NLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTST GKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSE LTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKV DLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYS LEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQ YLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNL VDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKG YKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQ EYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIV NNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNP LYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVK LSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQ AEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRP PHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG	N580A	H557A	D10A	4559
SauriCas9	スタフィロコッカス・アウリクラリス (Staphylococcus	MQENQQKQNYILGLDIGITSVGYGLIDSKTREVIDAGVRLFPEADSENNSNR RSKRGARRLKRRRIHRLNRVKDLLADYQMIDLNNVPKSTDPYTIRVKGLREPL TKEEFAIALLHIAKRRGLHNISVSMGDEEQDNELSTKQQLQKNAQQLQDKY	N588A	H565A	D15A	4560

【０１８５】

【表４－３】

	auricularis)	VCELQLERLTNINKVRGEKNRFKTEDFVKEVKQLCETQRQYHNIDDQFIQQY IDLVSTRREYFEGPGNGSPYGWDGDLLKWYEKLMGRCTYFPEELRSVKYAYS ADLFNALNDLNNLVVTRDDNPKLEYYEKYHIIENVFKQKKNPTLKQIAKEIGV QDYDIRGYRITKSGKPQFTSFKLYHDLKNIFEQAKYLEDVEMLDEIAKILTIYQ DEISIKKALDQLPELLTESEKSQIAAQLTGYTGTHRLSLKCIHIVIDELWESPENQ MEIFTRLNLKPKKVEMSEIDSIPTTLVDEFILSPVVKRAFIQSIKVINAVINRFGL PEDIIIELAREKNSKDRRKFINKLQKQNEATRKKIEQLLAKYGNTNAKYMIEKI KLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLSNPTHYEVDHIIPRSVSFDNSLNNKVLVKQ SENSKKGNRTPYQYLSSNESKISYNQFKQHILNLSKAKDRISKKKRDMLLEER DINKFEVQKEFINRNLVDTRYATRELSNLLKTYFSTHDYAVKVKTINGGFTNH LRKVWDFKKHRNHGYKHHAEDALVIANADFLFKTHKALRRTDKILEQPGLE VNDTTVKVDTEEKYQELFETPKQVKNIKQFRDFKYSHRVDKKPNRQLINDTL YSTREIDGETYVVQTLKDLYAKDNEKVKKLFTERPQKILMYQHDPKTFEKLM TILNQYAEAKNPLAAYYEDKGEYVTKYAKKGNGPAIHKIKYIDKKLGSYLDVS NKYPETQNKLVKLSLKSFRFDIYKCEQGYKMVSIGYLDVLKKDNYYYIPKDKYE AEKQKKKIKESDLFVGSFYYNDLIMYEDELFRVIGVNSDINNLVELNMVDITY KDFCEVNNVTGEKRIKKTIGKRVVLIEKYTTDILGNLYKTPLPKKPQLIFKRGEL				
SauriCas9-KKH	スタフィロコッカス・アウリクラリス (Staphylococcus auricularis)	MQENQQKQNYILGLDIGITSVGYGLIDSKTREVIDAGVRLFPEADSENNSNR RSKRGARRLKRRRIHRLNRVKDLLADYQMIDLNNVPKSTDPYTIRVKGLREPL TKEEFAIALLHIAKRRGLHNISVSMGDEEQDNELSTKQQLQKNAQQLQDKY VCELQLERLTNINKVRGEKNRFKTEDFVKEVKQLCETQRQYHNIDDQFIQQY IDLVSTRREYFEGPGNGSPYGWDGDLLKWYEKLMGRCTYFPEELRSVKYAYS ADLFNALNDLNNLVVTRDDNPKLEYYEKYHIIENVFKQKKNPTLKQIAKEIGV QDYDIRGYRITKSGKPQFTSFKLYHDLKNIFEQAKYLEDVEMLDEIAKILTIYQ DEISIKKALDQLPELLTESEKSQIAAQLTGYTGTHRLSLKCIHIVIDELWESPENQ MEIFTRLNLKPKKVEMSEIDSIPTTLVDEFILSPVVKRAFIQSIKVINAVINRFGL PEDIIIELAREKNSKDRRKFINKLQKQNEATRKKIEQLLAKYGNTNAKYMIEKI KLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLSNPTHYEVDHIIPRSVSFDNSLNNKVLVKQ SENSKKGNRTPYQYLSSNESKISYNQFKQHILNLSKAKDRISKKKRDMLLEER DINKFEVQKEFINRNLVDTRYATRELSNLLKTYFSTHDYAVKVKTINGGFTNH LRKVWDFKKHRNHGYKHHAEDALVIANADFLFKTHKALRRTDKILEQPGLE VNDTTVKVDTEEKYQELFETPKQVKNIKQFRDFKYSHRVDKKPNRKLINDTL YSTREIDGETYVVQTLKDLYAKDNEKVKKLFTERPQKILMYQHDPKTFEKLM TILNQYAEAKNPLAAYYEDKGEYVTKYAKKGNGPAIHKIKYIDKKLGSYLDVS NKYPETQNKLVKLSLKSFRFDIYKCEQGYKMVSIGYLDVLKKDNYYYIPKDKYE AEKQKKKIKESDLFVGSFYKNDLIMYEDELFRVIGVNSDINNLVELNMVDITY KDFCEVNNVTGEKHIKKTIGKRVVLIEKYTTDILGNLYKTPLPKKPQLIFKRGEL	N588A	H565A	D15A	4561
ScaCas9-Sc++	ストレプトコッカス・カニス (Streptococcus canis)	MEKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKFKVLGNTNRKSIKKNLMGALL FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRIRYLQEIFANEMAKLDDSFFQRLEESF LVEEDKKNERHPIFGNLADEVAYHRNYPTIYHLRKKLADSPEKADLRLIYLALA HIIKFRGHFLIEGKLNAENSDVAKLFYQLIQTYNQLFEESPLDEIEVDAKGILSA RLSKSKRLEKLIAVFPNEKKNGLFGNIIALALGLTPNFKSNFDLTEDAKLQLSKD TYDDDLDELLGQIGDQYADLFSAAKNLSDAILLSDILRSNSEVTKAPLSASMV KRYDEHHQDLALLKTLVRQQFPEKYAEIFKDDTKNGYAGYVGADKKLRKRS GKLATEEEFYKFIKPILEKMDGAEELLAKLNRDDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLK ELHAILRRQEEFYPFLKENREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWLTRKSEEA ITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDEQLPNKKVLPKHSLLYEYFTVYNEL TKVKYVTERMRKPEFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS VEIIGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRHYTGWGRLSRKMINGIRDKQSGKTILDFLKS DGFSNRNFMQLIHDDSLTFKEEIEKAQVSGQGDSLHEQIADLAGSPAIKKGIL QTVKIVDELVKVMGHKPENIVIEMARENQTTTKGLQQSRERKKRIEEGIKELE SQILKENPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVP QSFIKDDSIDNKVLTRSVENRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ RKFDNLTKAERGGLSEADKAGFIKRQLVETRQITKHVARILDSRMNTKRDKN DKPIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQLYKVRDINNYHHAHDAYLNAVVGTALIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKRFFYSNIMNFFKTEVKL ANGEIRKRPLIETNGETGEVVWNKEKDFATVRKVLAMPQVNIVKKTEVQTG GFSKESILSKRESAKLIPRKKGWDTRKYGGFGSPTVAYSILVVAKVEKGKAKKL KSVKVLVGITIMEKGSYEKDPIGFLEAKGYKDIKKELIFKLPKYSLFELENGRRR	N872A	H849A	D10A	4562

【０１８６】

【表４－４】

		MLASAKELQKANELVLPQHLVRLLYYTQNISATTGSNNLGYIEQHREEFKEIF EKIIDFSEKYILKNKVNSNLKSSFDEQFAVSDSILLSNSFVSLLKYTSFGASGGFT FLDLDVKQGRLRYQTVTEVLDATLIYQSITGLYETRTDLSQLGGD				
SpyCas9	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA GELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A	4563
SpyCas9- NG	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES IRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA RFLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPRAF KYFDTTIDRKVYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A	4564
SpyCas9- SpRY	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAERTRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS	N863A	H840A	D10A	4565

【０１８７】

【表４－５】

		ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES IRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFLWPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVK ELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AKQLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDE IIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTRLGAPRAF KYFDTTIDPKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD				
St1Cas9	ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)	MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTNRQG RRLARRKKHRRVRLNRLFEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFI ALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSKQLETKTPGQIQLER YQTYGQLRGDFTVEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEF INRYLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEF RAAKASYTAQEFNLLNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAK LFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETL DKLAYVLTLNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGW HNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIY NPVVAKSVRQAIKIVNAAIKEYGDFDNIVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKAN KDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYT GKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQEKGQRTPYQ ALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLV DTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDTYH HHAVDALIIAASSQLNLWKKQKNTLVSYSEDQLLDIETGELISDDEYKESVFK APYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATIYATRQAKVGKDKADE TYVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPILENYPN KQINEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYDSKLGNHIDIT PKDSNNKVVLQSVSPWRADVYFNKTTGKYEILGLKYADLQFEKGTGTYKISQ EKYNDIKKKEGVDSDSEFKFTLYKNDLLLVKDTETKEQQLFRFLSRTMPKQKH YVELKPYDKQKFEGGEALIKVLGNVANSGQCKKGLGKSNISIYKVRTDVLGN QHIIKNEGDKPKLDF	N622A	H599A	D9A	4566
BlatCas9	ブレビバチルス・ラテロスポルス (Brevibacillus laterosporus)	MAYTMGIDVGIASCGWAIVDLERQRIIDIGVRTFEKAENPKNGEALAVPRRE ARSSRRRLRRKKHRIERLKHMFVRNGLAVDIQHLEQTLRSQNEIDVWQLRV DGLDRMLTQKEWLRVLIHLAQRRGFQSNRKTDGSSEDGQVLVNVTENDRL MEEKDYRTVAEMMVKDEKFSDHKRNKNGNYHGVVSRSSLLVEIHTLFETQ RQHHNSLASKDFELEYVNIWSAQRPVATKDQIEKMIGTCTFLPKEKRAPKAS WHFQYFMLLQTINHIRITNVQGTRSLNKEEIEQVVNMALTKSKVSYHDTRKI LDLSEEYQFVGLDYGKEDEKKKVESKETIIKLDDYHKLNKIFNEVELAKGETWE ADDYDTVAYALTFFKDDEDIRDYLQNKYKDSKNRLVKNLANKEYTNELIGKV STLSFRKVGHLSLKALRKIIPFLEQGMTYDKACQAAGFDFQGISKKKRSVVLP VIDQISNPVVNRALTQTRKVINALIKKYGSPETIHIETARELSKTFDERKNITKD YKENRDKNEHAKKHLSELGIINPTGLDIVKYKLWCEQQGRCMYSNQPISFER LKESGYTEVDHIIPYSRSMNDSYNNRVLVMTRENREKGNQTPFEYMGNDT QRWYEFEQRVTTNPQIKKEKRQNLLLKGFTNRRELEMLERNLNDTRYITKYL SHFISTNLEFSPSDKKKKVVNTSGRITSHLRSRWGLEKNRGQNDLHHAMDAI VIAVTSDSFIQQVTNYYKRKERRELNGDDKFPLPWKFFREEVIARLSPNPKEQ IEALPNHFYSEDELADLQPIFVSRMPKRSITGEAHQAQFRRVVGKTKEGKNIT	N607A	H584A	D8A	4567

【０１８８】

【表４－６】

		AKKTALVDISYDKNGDFNMYGRETDPATYEAIKERYLEFGGNVKKAFSTDLH KPKKDGTKGPLIKSVRIMENKTLVHPVNKGKGVVYNSSIVRTDVFQRKEKYY LLPVYVTDVTKGKLPNKVIVAKKGYHDWIEVDDSFTFLFSLYPNDLIFIRQNPK KKISLKKRIESHSISDSKEVQEIHAYYKGVDSSTAAIEFIIHDGSYYAKGVGVQN LDCFEKYQVDILGNYFKVKGEKRLELETSDSNHKGKDVNSIKSTSR				
cCas9-v16	黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSA ALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK DGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYE GPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLN NLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTST GKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSE LTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKV DLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYS LEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQ YLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNL VDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKG YKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQ EYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIV NNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNP LYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVK LSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQ AEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNSDKNNLIEVNMIDITYREYLENMNDKRP PHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG	N580A	H557A	D10A	4568
cCas9-v17	黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSA ALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK DGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYE GPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLN NLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTST GKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSE LTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKV DLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYS LEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQ YLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNL VDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKG YKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQ EYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIV NNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNP LYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVK LSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQ AEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNSTRNIVELNMIDITYREYLENMNDKRP PHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG	N580A	H557A	D10A	4569
cCas9-v21	黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSA ALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK DGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYE GPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLN NLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTST GKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSE LTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKV DLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYS LEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQ YLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNL VDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKG YKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQ	N580A	H557A	D10A	4570

【０１８９】

【表４－７】

		EYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIV NNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNP LYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVK LSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQ AEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNSDDRNIIELNMIDITYREYLENMNDKRP PHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG				
cCas9-v42	黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus)	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSA ALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKK DGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYE GPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLN NLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTST GKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSE LTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKV DLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYS LEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQ YLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNL VDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKG YKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQ EYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIV NNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNP LYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVK LSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQ AEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNNRLNKIELNMIDITYREYLENMNDKRP PHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG	N580A	H557A	D10A	4571
CdiCas9	ジフテリア菌 (Corynebacterium diphtheriae)	MKYHVGIDVGTFSVGLAAIEVDDAGMPIKTLSLVSHIHDSGLDPDEIKSAVT RLASSGIARRTRRLYRRKRRRLQQLDKFIQRQGWPVIELEDYSDPLYPWKVR AELAASYIADEKERGEKLSVALRHIARHRGWRNPYAKVSSLYLPDGPSDAFK AIREEIKRASGQPVPETATVGQMVTLCELGTLKLRGEGGVLSARLQQSDYAR EIQEICRMQEIGQELYRKIIDVVFAAESPKGSASSRVGKDPLQPGKNRALKAS DAFQRYRIAALIGNLRVRVDGEKRILSVEEKNLVFDHLVNLTPKKEPEWVTIA EILGIDRGQLIGTATMTDDGERAGARPPTHDTNRSIVNSRIAPLVDWWKTA SALEQHAMVKALSNAEVDDFDSPEGAKVQAFFADLDDDVHAKLDSLHLPV GRAAYSEDTLVRLTRRMLSDGVDLYTARLQEFGIEPSWTPPTPRIGEPVGNP AVDRVLKTVSRWLESATKTWGAPERVIIEHVREGFVTEKRAREMDGDMRR RAARNAKLFQEMQEKLNVQGKPSRADLWRYQSVQRQNCQCAYCGSPITF SNSEMDHIVPRAGQGSTNTRENLVAVCHRCNQSKGNTPFAIWAKNTSIEG VSVKEAVERTRHWVTDTGMRSTDFKKFTKAVVERFQRATMDEEIDARSME SVAWMANELRSRVAQHFASHGTTVRVYRGSLTAEARRASGISGKLKFFDGV GKSRLDRRHHAIDAAVIAFTSDYVAETLAVRSNLKQSQAHRQEAPQWREFT GKDAEHRAAWRVWCQKMEKLSALLTEDLRDDRVVVMSNVRLRLGNGSA HKETIGKLSKVKLSSQLSVSDIDKASSEALWCALTREPGFDPKEGLPANPERHI RVNGTHVYAGDNIGLFPVSAGSIALRGGYAELGSSFHHARVYKITSGKKPAF AMLRVYTIDLLPYRNQDLFSVELKPQTMSMRQAEKKLRDALATGNAEYLG WLVVDDELVVDTSKIATDQVKAVEAELGTIRRWRVDGFFSPSKLRLRPLQM SKEGIKKESAPELSKIIDRPGWLPAVNKLFSDGNVTVVRRDSLGRVRLESTAH LPVTWKVQ	N597A	H573A	D8A	4572
CjeCas9	カンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni)	MARILAFDIGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGESLALPRRLARSA RKRLARRKARLNHLKHLIANEFKLNYEDYQSFDESLAKAYKGSLISPYELRFRA LNELLSKQDFARVILHIAKRRGYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLANYQS VGEYLYKEYFQKFKENSKEFTNVRNKKESYERCIAQSFLKDELKLIFKKQREFG FSFSKKFEEEVLSVAFYKRALKDFSHLVGNCSFFTDEKRAPKNSPLAFMFVAL TRIINLLNNLKNTEGILYTKDDLNALLNEVLKNGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFK GEKGTYFIEFKKYKEFIKALGEHNLSQDDLNEIAKDITLIKDEIKLKKALAKYDLN QNQIDSLSKLEFKDHLNISFKALKLVTPLMLEGKKYDEACNELNLKVAINEDK KDFLPAFNETYYKDEVTNPVVLRAIKEYRKVLNALLKKYGKVHKINIELAREVG KNHSQRAKIEKEQNENYKAKKDAELECEKLGLKINSKNILKLRLFKEQKEFCAY SGEKIKISDLQDEKMLEIDHIYPYSRSFDDSYMNKVLVFTKQNQEKLNQTPFE	N582A	H559A	D8A	4573

【０１９０】

【表４－８】

		AFGNDSAKWQKIEVLAKNLPTKKQKRILDKNYKDKEQKNFKDRNLNDTRYI ARLVLNYTKDYLDFLPLSDDENTKLNDTQKGSKVHVEAKSGMLTSALRHTW GFSAKDRNNHLHHAIDAVIIAYANNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISELD YKNKRKFFEPFSGFRQKVLDKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEEFYQSY GGKEGVLKALELGKIRKVNGKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNKFYAVPIYTMDF ALKVLPNKAVARSKKGEIKDWILMDENYEFCFSLYKDSLILIQTKDMQEPEFV YYNAFTSSTVSLIVSKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGIQNLKVFEK YIVSALGEVTKAEFRQREDFKK				
GeoCas9	ゲオバチルス・ステアロサーモフィラス (Geobacillus stearothermophilus)	MRYKIGLDIGITSVGWAVMNLDIPRIEDLGVRIFDRAENPQTGESLALPRRLA RSARRRLRRRKHRLERIRRLVIREGILTKEELDKLFEEKHEIDVWQLRVEALDR KLNNDELARVLLHLAKRRGFKSNRKSERSNKENSTMLKHIEENRAILSSYRTV GEMIVKDPKFALHKRNKGENYTNTIARDDLEREIRLIFSKQREFGNMSCTEEF ENEYITIWASQRPVASKDDIEKKVGFCTFEPKEKRAPKATYTFQSFIAWEHIN KLRLISPSGARGLTDEERRLLYEQAFQKNKITYHDIRTLLHLPDDTYFKGIVYDR GESRKQNENIRFLELDAYHQIRKAVDKVYGKGKSSSFLPIDFDTFGYALTLFKD DADIHSYLRNEYEQNGKRMPNLANKVYDNELIEELLNLSFTKFGHLSLKALRS ILPYMEQGEVYSSACERAGYTFTGPKKKQKTMLLPNIPPIANPVVMRALTQA RKVVNAIIKKYGSPVSIHIELARDLSQTFDERRKTKKEQDENRKKNETAIRQL MEYGLTLNPTGHDIVKFKLWSEQNGRCAYSLQPIEIERLLEPGYVEVDHVIPY SRSLDDSYTNKVLVLTRENREKGNRIPAEYLGVGTERWQQFETFVLTNKQFS KKKRDRLLRLHYDENEETEFKNRNLNDTRYISRFFANFIREHLKFAESDDKQK VYTVNGRVTAHLRSRWEFNKNREESDLHHAVDAVIVACTTPSDIAKVTAFY QRREQNKELAKKTEPHFPQPWPHFADELRARLSKHPKESIKALNLGNYDDQ KLESLQPVFVSRMPKRSVTGAAHQETLRRYVGIDERSGKIQTVVKTKLSEIKL DASGHFPMYGKESDPRTYEAIRQRLLEHNNDPKKAFQEPLYKPKKNGEPGP VIRTVKIIDTKNQVIPLNDGKTVAYNSNIVRVDVFEKDGKYYCVPVYTMDIM KGILPNKAIEPNKPYSEWKEMTEDYTFRFSLYPNDLIRIELPREKTVKTAAGEE INVKDVFVYYKTIDSANGGLELISHDHRFSLRGVGSRTLKRFEKYQVDVLGNI YKVRGEKRVGLASSAHSKPGKTIRPLQSTRD	N605A	H582A	D8A	4574
iSpyMacCas9	連鎖球菌 (Streptococcus spp.)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRKLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLKREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEIQTVGQNGG LFDDNPKSPLEVTPSKLVPLKKELNPKKYGGYQKPTTAYPVLLITDTKQLIPISV MNKKQFEQNPVKFLRDRGYQQVGKNDFIKLPKYTLVDIGDGIKRLWASSKEI HKGNQLVVSKKSQILLYHAHHLDSDLSNDYLQNHNQQFDVLFNEIISFSKKC KLGKEHIQKIENVYSNKKNSASIEELAESFIKLLGFTQLGATSPFNFLGVKLNQ KQYKGKKDYILPCTEGTLIRQSITGLYETRVDLSKIGEDSGGSGGSKRTADGSE FES	N863A	H840A	D10A	4575
NmeCas9	髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis)	MAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPK TGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRTRRLLKREGVLQAANFDENGLIKS LPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELG	N611A	H588A	D16A	4576

【０１９１】

【表４－９】

		ALLKGVAGNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRSDYSHTFSRKDL QAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTF EPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKS KLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGL KDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEILEALLKHISFDKFV QISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNP VVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRK DREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLGRLNEK GYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSRE WQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVA DRMRLTGKGKKRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVA CSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQ EVMIRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAP NRKMSGQGHMETVKSAKRLDEGVSVLRVPLTQLKLKDLEKMVNREREPKL YEALKARLEAHKDDPAKAFAEPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQKTGVW VRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYYLVPIYSWQVAKGILPDRAVVQGKD EEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMFGYFASCHRGTGNINIRIHD LDHKIGKNGILEGIGVKTALSFQKYQIDELGKEIRPCRLKKRPPVR				
ScaCas9	ストレプトコッカス・カニス (Streptococcus canis)	MEKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKFKVLGNTNRKSIKKNLMGALL FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRIRYLQEIFANEMAKLDDSFFQRLEESF LVEEDKKNERHPIFGNLADEVAYHRNYPTIYHLRKKLADSPEKADLRLIYLALA HIIKFRGHFLIEGKLNAENSDVAKLFYQLIQTYNQLFEESPLDEIEVDAKGILSA RLSKSKRLEKLIAVFPNEKKNGLFGNIIALALGLTPNFKSNFDLTEDAKLQLSKD TYDDDLDELLGQIGDQYADLFSAAKNLSDAILLSDILRSNSEVTKAPLSASMV KRYDEHHQDLALLKTLVRQQFPEKYAEIFKDDTKNGYAGYVGIGIKHRKRTT KLATQEEFYKFIKPILEKMDGAEELLAKLNRDDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLKE LHAILRRQEEFYPFLKENREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWLTRKSEEAI TPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDEQLPNKKVLPKHSLLYEYFTVYNELT KVKYVTERMRKPEFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSV EIIGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEE RLKTYAHLFDDKVMKQLKRRHYTGWGRLSRKMINGIRDKQSGKTILDFLKS DGFSNRNFMQLIHDDSLTFKEEIEKAQVSGQGDSLHEQIADLAGSPAIKKGIL QTVKIVDELVKVMGHKPENIVIEMARENQTTTKGLQQSRERKKRIEEGIKELE SQILKENPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVP QSFIKDDSIDNKVLTRSVENRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ RKFDNLTKAERGGLSEADKAGFIKRQLVETRQITKHVARILDSRMNTKRDKN DKPIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQLYKVRDINNYHHAHDAYLNAVVGTALIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKRFFYSNIMNFFKTEVKL ANGEIRKRPLIETNGETGEVVWNKEKDFATVRKVLAMPQVNIVKKTEVQTG GFSKESILSKRESAKLIPRKKGWDTRKYGGFGSPTVAYSILVVAKVEKGKAKKL KSVKVLVGITIMEKGSYEKDPIGFLEAKGYKDIKKELIFKLPKYSLFELENGRRR MLASATELQKANELVLPQHLVRLLYYTQNISATTGSNNLGYIEQHREEFKEIF EKIIDFSEKYILKNKVNSNLKSSFDEQFAVSDSILLSNSFVSLLKYTSFGASGGFT FLDLDVKQGRLRYQTVTEVLDATLIYQSITGLYETRTDLSQLGGD	N872A	H849A	D10A	4577
ScaCas9-HiFi-Sc++	ストレプトコッカス・カニス (Streptococcus canis)	MEKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKFKVLGNTNRKSIKKNLMGALL FDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRIRYLQEIFANEMAKLDDSFFQRLEESF LVEEDKKNERHPIFGNLADEVAYHRNYPTIYHLRKKLADSPEKADLRLIYLALA HIIKFRGHFLIEGKLNAENSDVAKLFYQLIQTYNQLFEESPLDEIEVDAKGILSA RLSKSKRLEKLIAVFPNEKKNGLFGNIIALALGLTPNFKSNFDLTEDAKLQLSKD TYDDDLDELLGQIGDQYADLFSAAKNLSDAILLSDILRSNSEVTKAPLSASMV KRYDEHHQDLALLKTLVRQQFPEKYAEIFKDDTKNGYAGYVGADKKLRKRS GKLATEEEFYKFIKPILEKMDGAEELLAKLNRDDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLK ELHAILRRQEEFYPFLKENREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWLTRKSEEA ITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDEQLPNKKVLPKHSLLYEYFTVYNEL TKVKYVTERMRKPEFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS VEIIGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRHYTGWGRLSRKMINGIRDKQSGKTILDFLKS DGFSNANFMQLIHDDSLTFKEEIEKAQVSGQGDSLHEQIADLAGSPAIKKGIL QTVKIVDELVKVMGHKPENIVIEMARENQTTTKGLQQSRERKKRIEEGIKELE SQILKENPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVP	N872A	H849A	D10A	4578

【０１９２】

【表４－１０】

		QSFIKDDSIDNKVLTRSVENRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQ RKFDNLTKAERGGLSEADKAGFIKRQLVETRQITKHVARILDSRMNTKRDKN DKPIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQLYKVRDINNYHHAHDAYLNAVVGTALIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKRFFYSNIMNFFKTEVKL ANGEIRKRPLIETNGETGEVVWNKEKDFATVRKVLAMPQVNIVKKTEVQTG GFSKESILSKRESAKLIPRKKGWDTRKYGGFGSPTVAYSILVVAKVEKGKAKKL KSVKVLVGITIMEKGSYEKDPIGFLEAKGYKDIKKELIFKLPKYSLFELENGRRR MLASAKELQKANELVLPQHLVRLLYYTQNISATTGSNNLGYIEQHREEFKEIF EKIIDFSEKYILKNKVNSNLKSSFDEQFAVSDSILLSNSFVSLLKYTSFGASGGFT FLDLDVKQGRLRYQTVTEVLDATLIYQSITGLYETRTDLSQLGGD				
SpyCas9-3var-NRRH	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MVKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEE FYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGIIPHQIHLGELHAILRRQ GDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRLRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGGHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQI LKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKGNSDKLIARKKDWDPKKYGGFNSPTAAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVK ELLGITIMERSSFEKNPIGFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGVLHKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDE IIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGVPAA FKYFDTTIDKKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A	4579
SpyCas9-3var-NRTH	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MVKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEE FYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGIIPHQIHLGELHAILRRQ GDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRLRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGGHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQI LKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKGNSDKLIARKKDWDPKKYGGFNSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVK ELLGITIMERSSFEKNPIGFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS ASVLHKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSSEDNKQKQLFVEQHKHYLDEI	N863A	H840A	D10A	4580

【０１９３】

【表４－１１】

		IEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGASAAF KYFDTTIGRKLYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD				
SpyCas9-3var-NRCH	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MVKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEE FYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGIIPHQIHLGELHAILRRQ GDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRLRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGGHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQI LKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKGNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVK ELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGVLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDE IIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTINRKQYNTTKEVLDATLIRQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A	4581
SpyCas9-HF1	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA GELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A	4563
SpyCas9-QQR1	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS	N863A	H840A	D10A	4582

【０１９４】

【表４－１２】

		KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA RELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADAQLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTFKQKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD				
SpyCas9-SpG	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFLWPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVK ELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AKQLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDE IIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A	4583
SpyCas9-VQR	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR	N863A	H840A	D10A	4584

【０１９５】

【表４－１３】

		NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA GELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD				
SpyCas9-VRER	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQ EDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA RELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKEYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A	4585
SpyCas9-xCas	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDTKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKLYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGIIPHQIHLGELHAILRRQE DFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEK VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGDQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFIQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQI LKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES	N863A	H840A	D10A	4586

【０１９６】

【表４－１４】

		iLPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA GVLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD				
SpyCas9-xCas-NG	化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFL VEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAH MIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDTKLQLS KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS MIKLYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGIIPHQIHLGELHAILRRQE DFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEK VVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGDQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFIQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQI LKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPK LESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEI RKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKES IRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKE LLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA RFLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPRAF KYFDTTIDRKVYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	N863A	H840A	D10A	4587
St1Cas9-CNRZ1066	ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)	MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTNRQG RRLARRKKHRRVRLNRLFEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFI ALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSKQLETKTPGQIQLER YQTYGQLRGDFTVEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEF INRYLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEF RAAKASYTAQEFNLLNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAK LFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETL DKLAYVLTLNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGW HNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIY NPVVAKSVRQAIKIVNAAIKEYGDFDNIVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKAN KDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYT GKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQEKGQRTPYQ ALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLV DTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDTYH HHAVDALIIAASSQLNLWKKQKNTLVSYSEEQLLDIETGELISDDEYKESVFKA PYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATIYATRQAKVGKDKKDET YVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPILENYPNK QMNEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYDSKLLGNPIDI TPENSKNKVVLQSLKPWRTDVYFNKATGKYEILGLKYADLQFEKGTGTYKIS QEKYNDIKKKEGVDSDSEFKFTLYKNDLLLVKDTETKEQQLFRFLSRTLPKQK HYVELKPYDKQKFEGGEALIKVLGNVANGGQCIKGLAKSNISIYKVRTDVLG NQHIIKNEGDKPKLDF	N622A	H599A	D9A	4588
St1Cas9-LMG1831	ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)	MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTNRQG RRLARRKKHRRVRLNRLFEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFI ALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSKQLETKTPGQIQLER YQTYGQLRGDFTVEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEF INRYLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEF RAAKASYTAQEFNLLNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAK	N622A	H599A	D9A	4589

【０１９７】

【表４－１５】

		LFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETL DKLAYVLTLNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGW HNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIY NPVVAKSVRQAIKIVNAAIKEYGDFDNIVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKAN KDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYT GKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQEKGQRTPYQ ALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLV DTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDTYH HHAVDALIIAASSQLNLWKKQKNTLVSYSEEQLLDIETGELISDDEYKESVFKA PYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATIYATRQAKVGKDKKDET YVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPILENYPNK QMNEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYDSKLLGNPIDI TPENSKNKVVLQSLKPWRTDVYFNKNTGKYEILGLKYADLQFEKKTGTYKISQ EKYNGIMKEEGVDSDSEFKFTLYKNDLLLVKDTETKEQQLFRFLSRTMPNVK YYVELKPYSKDKFEKNESLIEILGSADKSGRCIKGLGKSNISIYKVRTDVLGNQH IIKNEGDKPKLDF				
St1Cas9-MTH17CL396	ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)	MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTNRQG RRLARRKKHRRVRLNRLFEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFI ALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSKQLETKTPGQIQLER YQTYGQLRGDFTVEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEF INRYLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEF RAAKASYTAQEFNLLNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAK LFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETL DKLAYVLTLNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGW HNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIY NPVVAKSVRQAIKIVNAAIKEYGDFDNIVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKAN KDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYT GKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQEKGQRTPYQ ALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLV DTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDTYH HHAVDALIIAASSQLNLWKKQKNTLVSYSEDQLLDIETGELISDDEYKESVFK APYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATIYATRQAKVGKDKADE TYVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPILENYPN KQINEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYDSKLGNHIDIT PKDSNNKVVLQSLKPWRTDVYFNKNTGKYEILGLKYSDMQFEKGTGKYSISK EQYENIKVREGVDENSEFKFTLYKNDLLLLKDSENGEQILLRFTSRNDTSKHYV ELKPYNRQKFEGSEYLIKSLGTVAKGGQCIKGLGKSNISIYKVRTDVLGNQHII KNEGDKPKLDF	N622A	H599A	D9A	4590
St1Cas9-TH1477	ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)	MSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENNLVRRTNRQG RRLARRKKHRRVRLNRLFEESGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFI ALKNMVKHRGISYLDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSKQLETKTPGQIQLER YQTYGQLRGDFTVEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEF INRYLEILTGKRKYYHGPGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEF RAAKASYTAQEFNLLNDLNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAK LFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDKSGKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETL DKLAYVLTLNTEREGIQEALEHEFADGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGW HNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIY NPVVAKSVRQAIKIVNAAIKEYGDFDNIVIEMARETNEDDEKKAIQKIQKAN KDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLYT GKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQEKGQRTPYQ ALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTLSNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLV DTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDTYH HHAVDALIIAASSQLNLWKKQKNTLVSYSEDQLLDIETGELISDDEYKESVFK APYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDSKFNRKISDATIYATRQAKVGKDKADE TYVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPILENYPN KQINEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYDSKLGNHIDIT PKDSNNKVVLQSLKPWRTDVYFNKNTGKYEILGLKYSDMQFEKGTGKYSISK EQYENIKVREGVDENSEFKFTLYKNDLLLLKDSENGEQILLRFTSRNDTSKHYV	N622A	H599A	D9A	4591

【０１９８】

【表４－１６】

		ELKPYNRQKFEGSEYLIKSLGTVVKGGRCIKGLGKSNISIYKVRTDVLGNQHIIK NEGDKPKLDF				
sRGN3.1	スタフィロコッカス属 (Staphylococcus spp.)	MNQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGS RRLKRRRIHRLERVKLLLTEYDLINKEQIPTSNNPYQIRVKGLSEILSKDELAIAL LHLAKRRGIHNVDVAADKEETASDSLSTKDQINKNAKFLESRYVCELQKERLE NEGHVRGVENRFLTKDIVREAKKIIDTQMQYYPEIDETFKEKYISLVETRREYF EGPGQGSPFGWNGDLKKWYEMLMGHCTYFPQELRSVKYAYSADLFNALN DLNNLIIQRDNSEKLEYHEKYHIIENVFKQKKKPTLKQIAKEIGVNPEDIKGYRI TKSGTPEFTSFKLFHDLKKVVKDHAILDDIDLLNQIAEILTIYQDKDSIVAELGQ LEYLMSEADKQSISELTGYTGTHSLSLKCMNMIIDELWHSSMNQMEVFTYL NMRPKKYELKGYQRIPTDMIDDAILSPVVKRTFIQSINVINKVIEKYGIPEDIIIE LARENNSDDRKKFINNLQKKNEATRKRINEIIGQTGNQNAKRIVEKIRLHDQ QEGKCLYSLESIPLEDLLNNPNHYEVDHIIPRSVSFDNSYHNKVLVKQSENSK KSNLTPYQYFNSGKSKLSYNQFKQHILNLSKSQDRISKKKKEYLLEERDINKFE VQKEFINRNLVDTRYATRELTNYLKAYFSANNMNVKVKTINGSFTDYLRKV WKFKKERNHGYKHHAEDALIIANADFLFKENKKLKAVNSVLEKPEIETKQLDI QVDSEDNYSEMFIIPKQVQDIKDFRNFKYSHRVDKKPNRQLINDTLYSTRKK DNSTYIVQTIKDIYAKDNTTLKKQFDKSPEKFLMYQHDPRTFEKLEVIMKQYA NEKNPLAKYHEETGEYLTKYSKKNNGPIVKSLKYIGNKLGSHLDVTHQFKSST KKLVKLSIKNYRFDVYLTEKGYKFVTIAYLNVFKKDNYYYIPKDKYQELKEKKKI KDTDQFIASFYKNDLIKLNGDLYKIIGVNSDDRNIIELDYYDIKYKDYCEINNIK GEPRIKKTIGKKTESIEKFTTDVLGNLYLHSTEKAPQLIFKRGL	N585A	H562A	D10A	4592
sRGN3.3	スタフィロコッカス属 (Staphylococcus spp.)	MNQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGS RRLKRRRIHRLERVKLLLTEYDLINKEQIPTSNNPYQIRVKGLSEILSKDELAIAL LHLAKRRGIHNVDVAADKEETASDSLSTKDQINKNAKFLESRYVCELQKERLE NEGHVRGVENRFLTKDIVREAKKIIDTQMQYYPEIDETFKEKYISLVETRREYF EGPGQGSPFGWNGDLKKWYEMLMGHCTYFPQELRSVKYAYSADLFNALN DLNNLIIQRDNSEKLEYHEKYHIIENVFKQKKKPTLKQIAKEIGVNPEDIKGYRI TKSGTPEFTSFKLFHDLKKVVKDHAILDDIDLLNQIAEILTIYQDKDSIVAELGQ LEYLMSEADKQSISELTGYTGTHSLSLKCMNMIIDELWHSSMNQMEVFTYL NMRPKKYELKGYQRIPTDMIDDAILSPVVKRTFIQSINVINKVIEKYGIPEDIIIE LARENNSDDRKKFINNLQKKNEATRKRINEIIGQTGNQNAKRIVEKIRLHDQ QEGKCLYSLESIPLEDLLNNPNHYEVDHIIPRSVSFDNSYHNKVLVKQSENSK KSNLTPYQYFNSGKSKLSYNQFKQHILNLSKSQDRISKKKKEYLLEERDINKFE VQKEFINRNLVDTRYATRELTSYLKAYFSANNMDVKVKTINGSFTNHLRKV WRFDKYRNHGYKHHAEDALIIANADFLFKENKKLQNTNKILEKPTIENNTKK VTVEKEEDYNNVFETPKLVEDIKQYRDYKFSHRVDKKPNRQLINDTLYSTRM KDEHDYIVQTITDIYGKDNTNLKKQFNKNPEKFLMYQNDPKTFEKLSIIMKQ YSDEKNPLAKYYEETGEYLTKYSKKNNGPIVKKIKLLGNKVGNHLDVTNKYEN STKKLVKLSIKNYRFDVYLTEKGYKFVTIAYLNVFKKDNYYYIPKDKYQELKEKK KIKDTDQFIASFYKNDLIKLNGDLYKIIGVNSDDRNIIELDYYDIKYKDYCEINNI KGEPRIKKTIGKKTESIEKFTTDVLGNLYLHSTEKAPQLIFKRGL	N585A	H562A	D10A	4593

【０１９９】

一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）が、Ｃａｓタンパク質が結合及び／又は機能する対象の標的ＤＮＡ配列内に存在するか又はそれに隣接することが求められる。一部の実施形態では、ＰＡＭは、５’から３’にかけて、ＮＧＧ、ＹＧ、ＮＮＧＲＲＴ、ＮＮＮＲＲＴ、ＮＧＡ、ＴＹＣＶ、ＴＡＴＶ、ＮＴＴＮ、又はＮＮＮＧＡＴＴであるか又はそれらを含み、ここでＮは任意のヌクレオチドを表し、ＹはＣ又はＴを表し、ＲはＡ又はＧを表し、ＶはＡ又はＣ又はＧを表す。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、表３又は４に列記されるタンパク質である。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、そのＰＡＭを改変する、１つ又は複数の突然変異を含む。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｅ１３６９Ｒ、Ｅ１４４９Ｈ、及びＲ１５５６Ａの突然変異又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｅ７８２Ｋ、Ｎ９６８Ｋ、及びＲ１０１５Ｈの突然変異又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｄ１１３５Ｖ、Ｒ１３３５Ｑ、及びＴ１３３７Ｒの突然変異又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｓ５４２Ｒ及びＫ６０７Ｒの突然変異又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｓ５４２Ｒ、Ｋ５４８Ｖ、及びＮ５５２Ｒの突然変異又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。改変されたＰＡＭ配列を認識するためのＣａｓ酵素の改変の例示的な進歩が、全体が参照により本明細書に組み込まれるＣｏｌｌｉａｓ ｅｔ ａｌ Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ １２：５５５（２０２１）において概説される。

【０２００】

一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、触媒的に活性であり、標的ＤＮＡ部位の一方又は両方の鎖を切断する。一部の実施形態では、標的ＤＮＡ部位の切断に続いて、改変、例えば、挿入又は欠失が、例えば、細胞修復機構によって形成される。

【０２０１】

一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、例えば、ヌクレアーゼ欠損Ｃａｓ９のよう

に、ヌクレアーゼを非活性化又は部分的に非活性化するように修飾される。野生型Ｃａｓ９が、ｇＲＮＡによって標的にされる特定のＤＮＡ配列で二本鎖切断（ＤＳＢ）を生成する一方、修飾された機能性を有するいくつかのＣＲＩＳＰＲエンドヌクレアーゼが利用可能であり、例えば部分的に非活性化されているＣａｓ９の「ニッカーゼ」バージョンは、一本鎖切断のみを生成し；触媒的に不活性であるＣａｓ９（「ｄＣａｓ９」）は、標的ＤＮＡを切断しない。一部の実施形態では、ｄＣａｓ９のＤＮＡ配列への結合は、立体障害によってその部位で転写に干渉し得る。一部の実施形態では、ｄＣａｓ９のアンカー配列への結合は、ゲノム複合体（例えば、ＡＳＭＣ）の形成及び／又は維持に干渉（例えば、それを低減又は阻止）し得る。一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、触媒的に不活性なＣａｓ９、例えば、ｄＣａｓ９を含む。多数の触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質は、当技術分野で公知である。一部の実施形態では、ｄＣａｓ９は、Ｃａｓタンパク質の各エンドヌクレアーゼドメイン内に、突然変異、例えば、Ｄ１０Ａ及びＨ８４０Ａ又はＮ８６３Ａ突然変異を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性な又は部分的に不活性なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインは、１つ又は複数の突然変異、例えば、表３に列記される突然変異の１つ又は複数を含むＣａｓタンパク質を含む。一部の実施形態では、表３の所与の行に記載されるＣａｓタンパク質は、表３の同じ行に列記される突然変異の１つ、２つ、３つ、又は全部を含む。一部の実施形態では、例えば、表３に記載されていないＣａｓタンパク質は、表３のある行に列記される突然変異の１つ、２つ、３つ若しくは全部又はそのＣａｓタンパク質中の対応する部位での対応する突然変異を含む。

【０２０２】

一部の実施形態では、触媒的に不活性な、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｄ１１突然変異（例えば、Ｄ１１Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｈ９６９突然変異（例えば、Ｈ９６９Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｎ９９５突然変異（例えば、Ｎ９９５Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９は、Ｄ１１、Ｈ９６９、及びＮ９９５の位置の１つ、２つ若しくは３つでの突然変異（例えば、Ｄ１１Ａ、Ｈ９６９Ａ、及びＮ９９５Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。

【０２０３】

一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｄ１０突然変異（例えば、Ｄ１０Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｈ５５７突然変異（例えば、Ｈ５５７Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９は、Ｄ１０突然変異（例えば、Ｄ１０Ａ突然変異）及びＨ５５７突然変異（例えば、Ｈ５５７Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。

【０２０４】

一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｄ８３９突然変異（例えば、Ｄ８３９Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｈ８４０突然変異（例えば、Ｈ８４０Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパ

ク質は、Ｎ８６３突然変異（例えば、Ｎ８６３Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９は、Ｄ１０突然変異（例えば、Ｄ１０Ａ）、Ｄ８３９突然変異（例えば、Ｄ８３９Ａ）、Ｈ８４０突然変異（例えば、Ｈ８４０Ａ）、及びＮ８６３突然変異（例えば、Ｎ８６３Ａ）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。

【０２０５】

一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｅ９９３突然変異（例えば、Ｅ９９３Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。

【０２０６】

一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｄ９１７突然変異（例えば、Ｄ９１７Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｅ１００６突然変異（例えば、Ｅ１００６Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｄ１２５５突然変異（例えば、Ｄ１２５５Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９は、Ｄ９１７突然変異（例えば、Ｄ９１７Ａ）、Ｅ１００６突然変異（例えば、Ｅ１００６Ａ）、及びＤ１２５５突然変異（例えば、Ｄ１２５５Ａ）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。

【０２０７】

一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｄ１６突然変異（例えば、Ｄ１６Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｄ５８７突然変異（例えば、Ｄ５８７Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、部分的に非活性化されたＣａｓドメインは、ニッカーゼ活性を有する。一部の実施形態では、部分的に非活性化されたＣａｓ９ドメインは、Ｃａｓ９ニッカーゼドメインである。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓドメイン又は不活性Ｃａｓドメインは、検出可能な二本鎖切断を形成しない。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｈ５８８突然変異（例えば、Ｈ５８８Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９、又は部分的に非活性化されたＣａｓ９タンパク質は、Ｎ６１１突然変異（例えば、Ｎ６１１Ａ突然変異）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。一部の実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ９タンパク質、例えばｄＣａｓ９は、Ｄ１６突然変異（例えば、Ｄ１６Ａ）、Ｄ５８７突然変異（例えば、Ｄ５８７Ａ）、Ｈ５８８突然変異（例えば、Ｈ５８８Ａ）、及びＮ６１１突然変異（例えば、Ｎ６１１Ａ）又は前記位置に対応するアミノ酸に対する類似置換を含む。

【０２０８】

一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメイン又はエンドヌクレアーゼドメインは、ｇＲＮＡ（例えば、ｇＲＮＡを含む鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡ）を含むか又はそれに（例えば共有結合的に）連結されたＣａｓ分子を含み得る。

【０２０９】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、化膿性レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）Ｃａｓ９（ＳｐＣａｓ９）又はその機能性断片若しくは変異体を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼ

ドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、修飾ＳｐＣａｓ９を含む。複数の実施形態では、修飾ＳｐＣａｓ９は、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）特異性を改変する修飾を含む。複数の実施形態では、ＰＡＭは、核酸配列５’－ＮＧＴ－３’に対する特異性を有する。複数の実施形態では、修飾ＳｐＣａｓ９は、例えば、Ｌ１１１１、Ｄ１１３５、Ｇ１２１８、Ｅ１２１９、Ａ１３２２、又はＲ１３３５の１つ若しくは複数の位置に、１つ若しくは複数のアミノ酸置換を含み、それは、例えば、Ｌ１１１１Ｒ、Ｄ１１３５Ｖ、Ｇ１２１８Ｒ、Ｅ１２１９Ｆ、Ａ１３２２Ｒ、Ｒ１３３５Ｖから選択される。複数の実施形態では、修飾ＳｐＣａｓ９は、アミノ酸置換Ｔ１３３７Ｒと、Ｌ１１１１、Ｄ１１３５Ｌ、Ｓ１１３６Ｒ、Ｇ１２１８Ｓ、Ｅ１２１９Ｖ、Ｄ１３３２Ａ、Ｄ１３３２Ｓ、Ｄ１３３２Ｔ、Ｄ１３３２Ｖ、Ｄ１３３２Ｌ、Ｄ１３３２Ｋ、Ｄ１３３２Ｒ、Ｒ１３３５Ｑ、Ｔ１３３７、Ｔ１３３７Ｌ、Ｔ１３３７Ｑ、Ｔ１３３７Ｉ、Ｔ１３３７Ｖ、Ｔ１３３７Ｆ、Ｔ１３３７Ｓ、Ｔ１３３７Ｎ、Ｔ１３３７Ｋ、Ｔ１３３７Ｈ、Ｔ１３３７Ｑ、及びＴ１３３７Ｍ、又はそれらに対応するアミノ酸置換から選択される１つ若しくは複数の別のアミノ酸置換を含む。複数の実施形態では、修飾ＳｐＣａｓ９は、（ｉ）Ｄ１１３５Ｌ、Ｓ１１３６Ｒ、Ｇ１２１８Ｓ、Ｅ１２１９Ｖ、Ａ１３２２Ｒ、Ｒ１３３５Ｑ、及びＴ１３３７から選択される１つ若しくは複数のアミノ酸置換；並びに（ｉｉ）Ｌ１１１１Ｒ、Ｇ１２１８Ｒ、Ｅ１２１９Ｆ、Ｄ１３３２Ａ、Ｄ１３３２Ｓ、Ｄ１３３２Ｔ、Ｄ１３３２Ｖ、Ｄ１３３２Ｌ、Ｄ１３３２Ｋ、Ｄ１３３２Ｒ、Ｔ１３３７Ｌ、Ｔ１３３７Ｉ、Ｔ１３３７Ｖ、Ｔ１３３７Ｆ、Ｔ１３３７Ｓ、Ｔ１３３７Ｎ、Ｔ１３３７Ｋ、Ｔ１３３７Ｒ、Ｔ１３３７Ｈ、Ｔ１３３７Ｑ、及びＴ１３３７Ｍ、又はそれらに対応するアミノ酸置換から選択される１つ若しくは複数の別のアミノ酸置換を含む。

【０２１０】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、Ｃａｓドメイン、例えばＣａｓ９ドメインを含む。複数の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、ヌクレアーゼ活性Ｃａｓドメイン、Ｃａｓニッカーゼ（ｎＣａｓ）ドメイン、又はヌクレアーゼ不活性Ｃａｓ（ｄＣａｓ）を含む。複数の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、ヌクレアーゼ活性Ｃａｓ９ドメイン、Ｃａｓ９ニッカーゼ（ｎＣａｓ９）ドメイン、又はヌクレアーゼ不活性Ｃａｓ９（ｄＣａｓ）を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、Ｃａｓ９のＣａｓ９ドメイン（例えば、ｄＣａｓ９及びｎＣａｓ９）、Ｃａｓ１２ａ／Ｃｐｆ１、Ｃａｓ１２ｂ／Ｃ２ｃ１、Ｃａｓ１２ｃ／Ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１２ｄ／ＣａｓＹ、Ｃａｓ１２ｅ／ＣａｓＸ、Ｃａｓ１２ｇ、Ｃａｓ１２ｈ、又はＣａｓ１２ｉを含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、Ｃａｓ９（例えば、ｄＣａｓ９及びｎＣａｓ９）、Ｃａｓ１２ａ／Ｃｐｆ１、Ｃａｓ１２ｂ／Ｃ２ｃ１、Ｃａｓ１２ｃ／Ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１２ｄ／ＣａｓＹ、Ｃａｓ１２ｅ／ＣａｓＸ、Ｃａｓ１２ｇ、Ｃａｓ１２ｈ、又はＣａｓ１２ｉを含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、化膿性レンサ球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）若しくはＳ．サーモフィラス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）Ｃａｓ９、又はその機能性断片を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、例えば、Ｃｈｙｌｉｎｓｋｉ，Ｒｈｕｎ，ａｎｄ Ｃｈａｒｐｅｎｔｉｅｒ（２０１３）ＲＮＡ Ｂｉｏｌｏｇｙ １０：５，７２６－７３７（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、Ｃａｓ９配列を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、Ｃａｓ、例えば、本明細書に記載されるように、Ｃａｓ９、又はその変異体のＨＮＨヌクレアーゼサブドメイン及び／又はＲｕｖＣ１サブドメインを含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、Ｃａｓ１２ａ／Ｃｐｆ１、Ｃａｓ１２ｂ／Ｃ２ｃ１、Ｃａｓ１２ｃ／Ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１２ｄ／ＣａｓＹ、Ｃａｓ１２ｅ／ＣａｓＸ、Ｃａｓ１２ｇ、Ｃａｓ１２ｈ、又はＣａｓ１２ｉを含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、Ｃａｓポリペプチド（例えば、酵素）、又はその機能性断片を含む。複数の実施形態では、Ｃａｓポリペプチド（例えば酵素）は、Ｃ

ａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ５ｄ、Ｃａｓ５ｔ、Ｃａｓ５ｈ、Ｃａｓ５ａ、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ８ａ、Ｃａｓ８ｂ、Ｃａｓ８ｃ、Ｃａｓ９（例えば、Ｃｓｎ１若しくはＣｓｘ１２）、Ｃａｓ１０、Ｃａｓ１０ｄ、Ｃａｓ１２ａ／Ｃｐｆ１、Ｃａｓ１２ｂ／Ｃ２ｃ１、Ｃａｓ１２ｃ／Ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１２ｄ／ＣａｓＹ、Ｃａｓ１２ｅ／ＣａｓＸ、Ｃａｓ１２ｇ、Ｃａｓ１２ｈ、Ｃａｓ１２ｉ、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｙ４、Ｃｓｅ１、Ｃｓｅ２、Ｃｓｅ３、Ｃｓｅ４、Ｃｓｅ５ｅ、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ１、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ１、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘ１、Ｃｓｘ１Ｓ、Ｃｓｘ１１、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、ＣｓＯ、Ｃｓｆ４、Ｃｓｄ１、Ｃｓｄ２、Ｃｓｔ１、Ｃｓｔ２、Ｃｓｈ１、Ｃｓｈ２、Ｃｓａ１、Ｃｓａ２、Ｃｓａ３、Ｃｓａ４、Ｃｓａ５、ＩＩ型Ｃａｓエフェクタータンパク質、Ｖ型Ｃａｓエフェクタータンパク質、ＶＩ型Ｃａｓエフェクタータンパク質、ＣＡＲＦ、ＤｉｎＧ、Ｃｐｆ１、Ｃａｓ１２ｂ／Ｃ２ｃ１、Ｃａｓ１２ｃ／Ｃ２ｃ３、Ｃａｓ１２ｂ／Ｃ２ｃ１、Ｃａｓ１２ｃ／Ｃ２ｃ３、ＳｐＣａｓ９（Ｋ８５５Ａ）、ｅＳｐＣａｓ９（１．１）、ＳｐＣａｓ９－ＨＦ１、超精密（ｈｙｐｅｒ ａｃｃｕｒａｔｅ）Ｃａｓ９変異体（ＨｙｐａＣａｓ９）、それらの相同体、それらの修飾若しくは操作バージョン、及び／又はそれらの機能性断片から選択される。複数の実施形態では、Ｃａｓ９は、例えば、Ｈ８４０Ａ、Ｄ１０Ａ、Ｐ４７５Ａ、Ｗ４７６Ａ、Ｎ４７７Ａ、Ｄ１１２５Ａ、Ｗ１１２６Ａ、及びＤ１１２７Ａから選択される１つ又は複数の置換を含む。複数の実施形態では、Ｃａｓ９は、Ｄ１０、Ｇ１２、Ｇ１７、Ｅ７６２、Ｈ８４０、Ｎ８５４、Ｎ８６３、Ｈ９８２、Ｈ９８３、Ａ９８４、Ｄ９８６、及び／又はＡ９８７から選択される位置に１つ若しくは複数の突然変異、例えばＤ１０Ａ、Ｇ１２Ａ、Ｇ１７Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３Ａ、Ｈ９８２Ａ、Ｈ９８３Ａ、Ａ９８４Ａ、及び／又はＤ９８６Ａから選択される１つ若しくは複数の置換を含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、コリネバクテリウム・ウルセランス（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｕｌｃｅｒａｎｓ）、ジフテリア菌（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ）、スピロプラズマ・シルフィディコーラ（Ｓｐｉｒｏｐｌａｓｍａ ｓｙｒｐｈｉｄｉｃｏｌａ）、プレボテーラ・インターメディア（Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａ）、スピロプラズマ・タイワネンス（Ｓｐｉｒｏｐｌａｓｍａ ｔａｉｗａｎｅｎｓｅ）、ストレプトコッカス・イニエ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｉｎｉａｅ）、ベルリエラ・バルティカ（Ｂｅｌｌｉｅｌｌａ ｂａｌｔｉｃａ）、サイクロフレクサス・トークイス（Ｐｓｙｃｈｒｏｆｌｅｘｕｓ ｔｏｒｑｕｉｓ）、スタフィロコッカス・サーモフィラス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）、リステリア・イノキュア（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｉｎｎｏｃｕａ）、カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ）、髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、化膿性レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）若しくは黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）、又はその機能性断片若しくは変異体に由来するＣａｓ（例えば、Ｃａｓ９）配列を含む。

【０２１１】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、例えば、位置：Ｄ９１７、Ｅ１００６Ａ、Ｄ１２５５又はそれらの任意の組合せに、例えばＤ９１７Ａ、Ｅ１００６Ａ、Ｄ１２５５Ａ、Ｄ９１７Ａ／Ｅ１００６Ａ、Ｄ９１７Ａ／Ｄ１２５５Ａ、Ｅ１００６Ａ／Ｄ１２５５Ａ、及びＤ９１７Ａ／Ｅ１００６Ａ／Ｄ１２５５Ａから選択される、１つ若しくは複数の置換を含む、Ｃｐｆ１ドメインを含む。

【０２１２】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、ｓｐＣａｓ９、ｓｐＣａｓ９－ＶＲＱＲ、ｓｐＣａｓ９－ＶＲＥＲ、ｘＣａｓ９（ｓｐ）、ｓａＣａｓ９、ｓａＣａｓ９－ＫＫＨ、ｓｐＣａｓ９－ＭＱＫＳＥＲ、ｓｐＣａｓ９－ＬＲＫ

ＩＱＫ、又はｓｐＣａｓ９－ＬＲＶＳＱＬを含む。

【０２１３】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、Ｃａｓ９ニッカーゼ、例えば、Ｃａｓ９　Ｈ８４０Ａを含むエンドヌクレアーゼドメインを有する。複数の実施形態では、Ｃａｓ９　Ｈ８４０Ａは、以下のアミノ酸配列を有する。

Ｃａｓ９ニッカーゼ（Ｈ８４０Ａ）：

【化６】

DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEA
TRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGN
IVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV
DKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI
ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAIL
LSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAG
YIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI
LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVV
DKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLS
GEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKII
KDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG
RLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSL
HEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRE
RMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDV
DAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK
FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYK
VYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD
KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGG
FDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKK
DLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPED
NEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHL
FTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD

(配列番号: 4594)

【０２１４】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、Ｄ１０Ａ及び／又はＨ８４０Ａ突然変異を含むｄＣａｓ９配列、例えば、以下の配列を含む。

【化７】

SMDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGET
AEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPI
FGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDN
SDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLF
GNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLS
DAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG
YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGE
LHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE
EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKP
AFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL
LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYT
GWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQK
NSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLS
DYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLI
TQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR
EVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVY
GDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETG
EIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK
KYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYK
EVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKG
SPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAE
NIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD
(配列番号: 4007)

【０２１５】

ＴＡＬエフェクター及びジンクフィンガーヌクレアーゼ

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、ＴＡＬエフェクター分子を含む。ＴＡＬエフェクター分子、例えば、ＤＮＡ配列に特異的に結合するＴＡＬエフェクター分子は、典型的に、複数のＴＡＬエフェクタードメイン又はそれらの断片及び任意選択で天然に存在するＴＡＬエフェクターの１つ又は複数の更なる部分（例えば、複数のＴＡＬエフェクタードメインのＮ末端及び／又はＣ末端）を含む。多くのＴＡＬエフェクターは、当業者に公知であり、例えば、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから市販されている。

【０２１６】

天然に存在するＴＡＬＥは、宿主植物における遺伝子発現を調節し、細菌の定着及び生存を促進する、植物病原体ザントモナス（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ）を含む、極めて多数の細菌性病原体の種によって分泌される天然エフェクタータンパク質である。ＴＡＬエフェクターの特異的結合は、典型的に、３３又は３４アミノ酸のタンデムに配列されたほぼ同一のリピートの中央のリピートドメイン（反復可変二残基、ＲＶＤドメイン）に基づく。

【０２１７】

ＴＡＬエフェクターファミリーのメンバーは、主に、それらのリピートの数及び順序が異なる。リピートの数は、典型的に、１．５～３３．５リピートの範囲であり、Ｃ末端リピートは通常、長さがより短く（例えば、約２０アミノ酸）、一般に「ハーフリピート」と称される。ＴＡＬエフェクターの各リピートは、一般に、異なる塩基対特異性を示す異なるリピート型との１リピート対１塩基対相関を特徴とする（１リピートが標的遺伝子配列上の１塩基対を認識する）。一般に、リピートの数が減少すると、タンパク質－ＤＮＡ相互作用が減弱する。いくつかの６．５リピートが、リポータ遺伝子の転写を活性化するのに十分であることが明らかにされている（Ｓｃｈｏｌｚｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）。

【０２１８】

リピート間の変動は、主にアミノ酸位置１２及び１３で起こり、それ故、例示的な反復可変二残基（ＲＶＤ）及び核酸塩基標的に対するそれらの対応を列記する表５に示すように、「超可変」と称されており、標的ＤＮＡプロモータ配列との相互作用の特異性に関与する。

【０２１９】
【表５】
表 5-RVD 及び核酸塩基特異性

標的	可能な RVD アミノ酸組合せ												
A	NI	NN	CI	HI	KI								
G	NN	GN	SN	VN	LN	DN	QN	EN	HN	RH	NK	AN	FN
C	HD	RD	KD	ND	AD								
T	NG	HG	VG	IG	EG	MG	YG	AA	EP	VA	QG	KG	RG

【０２２０】
従って、ＴＡＬエフェクターのリピートを修飾し、特定のＤＮＡ配列を標的にすることは可能である。更に、試験では、ＲＶＤ　ＮＫがＧを標的にし得ることが明らかにされている。更に、ＴＡＬエフェクターの標的部位は、第１のリピートによって標的にされる５’塩基に隣接するＴを含む傾向があるが、この認識の正確な機構は未知である。１１３を超えるＴＡＬエフェクター配列が、現在まで公知である。ザントモナス（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ）からのＴＡＬエフェクターの非限定的な例として、Ｈａｘ２、Ｈａｘ３、Ｈａｘ４、ＡｖｒＸａ７、ＡｖｒＸａ１０及びＡｖｒＢｓ３が挙げられる。
【０２２１】
従って、本明細書に記載のＴＡＬエフェクター分子のＴＡＬエフェクタードメインは、任意の細菌種（例えば、ザントモナス・オリゼ・パソバー・オリゼ（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ　ｏｒｙｚａｅ　ｐｖ．Ｏｒｙｚａｅ）のアフリカ株（Ｙｕ　ｅｔ　ａｌ．２０１１）、ザントモナス・キャンペストリス・パソバー・ラファニ（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ　ｃａｍｐｅｓｔｒｉｓ　ｐｖ．ｒａｐｈａｎｉ）株７５６Ｃ及びイネ白葉枯病菌（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ　ｏｒｙｚａｅ　ｐｖ．ｏｒｙｚｉｃｏｌａ）ＢＬＳ２５６（Ｂｏｇｄａｎｏｖｅ　ｅｔ　ａｌ．２０１１）などのザントモナス（Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ）種）からのＴＡＬエフェクターに由来し得る。一部の実施形態では、ＴＡＬエフェクタードメインは、やはり天然に存在するＴＡＬエフェクターからのＲＶＤドメイン及び隣接配列（ＲＶＤドメインのＮ末端側及び／又はＣ末端側の配列）を含む。それは、天然に存在するＴＡＬエフェクターのＲＶＤよりも多い又は少ないリピートを含み得る。ＴＡＬエフェクター分子は、当技術分野で公知の上記コードやその他に基づく所与のＤＮＡ配列を標的にするように設計され得る。ＴＡＬエフェクタードメイン（例えば、リピート（単量体又はモジュール））の数及びそれらの特定の配列は、所望のＤＮＡ標的配列に基づいて選択され得る。例えば、ＴＡＬエフェクタードメイン、例えば、リピートは、特定の標的配列に適するように除去又は付加され得る。ある実施形態では、本発明のＴＡＬエフェクター分子は、６．５～３３．５のＴＡＬエフェクタードメイン、例えば、リピートを含む。ある実施形態では、本発明のＴＡＬエフェクター分子は、８～３３．５のＴＡＬエフェクタードメイン、例えば、リピート、例えば、１０～２５のＴＡＬエフェクタードメイン、例えば、リピート、例えば、１０～１４のＴＡＬエフェクタードメイン、例えば、リピートを含む。
【０２２２】
一部の実施形態では、ＴＡＬエフェクター分子は、ＤＮＡ標的配列との完全一致に対応するＴＡＬエフェクタードメインを含む。一部の実施形態では、ＤＮＡ標的配列上のリピートと標的塩基対との間のミスマッチは、ＴＡＬエフェクター分子を含むポリペプチドの機能を可能にする限り、許容される。一般に、ＴＡＬＥ結合は、ミスマッチの数と逆相関する。一部の実施形態では、本発明のポリペプチドのＴＡＬエフェクター分子は、標的ＤＮＡ配列との、多くて７つのミスマッチ、６つのミスマッチ、５つのミスマッチ、４つのミスマッチ、３つのミスマッチ、２つのミスマッチ、又は１つのミスマッチを含み、及び任意選択でミスマッチを含まない。特定の理論に束縛されることを意図しないが、一般に、ＴＡＬエフェクター分子のＴＡＬエフェクタードメインの数の減少に応じて、ミスマッチの数が減少することは、許容されるばかりか、ＴＡＬエフェクター分子を含むポリペプ

チドの機能を可能にすることになる。結合親和性は、一致するリピート－ＤＮＡの組合せの和に依存すると考えられる。例えば、２５又はそれ以上のＴＡＬエフェクタードメインを有するＴＡＬエフェクター分子は、最大で７つのミスマッチを許容可能であり得る。

【０２２３】

ＴＡＬエフェクタードメインに加えて、本発明のＴＡＬエフェクター分子は、天然に存在するＴＡＬエフェクターに由来する更なる配列を含み得る。ＴＡＬエフェクター分子のＴＡＬエフェクタードメイン部分の両側に含まれるＣ末端及び／又はＮ末端配列の長さは、変動し、例えば、Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）の試験に基づき、当業者によって選択され得る。Ｚｈａｎｇらは、Ｈａｘ３由来のＴＡＬエフェクターに基づくタンパク質中のいくつかのＣ末端及びＮ末端の切断変異体を特徴づけており、標的配列との最適な結合、ひいては転写の活性化に寄与する主要な要素を同定している。一般に、転写活性がＮ末端の長さと逆相関することが見出された。Ｃ末端に関しては、Ｈａｘ３配列の最初の６８アミノ酸中のＤＮＡ結合残基における重要な要素が同定された。従って、一部の実施形態では、天然に存在するＴＡＬエフェクターのＴＡＬエフェクタードメインのＣ末端側の最初の６８アミノ酸は、ＴＡＬエフェクター分子中に含まれる。従って、ある実施形態では、ＴＡＬエフェクター分子は、１）天然に存在するＴＡＬエフェクターに由来する１つ又は複数のＴＡＬエフェクタードメイン；２）ＴＡＬエフェクタードメインのＮ末端側の天然に存在するＴＡＬエフェクターからの少なくとも７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１７０、１８０、１９０、２００、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０若しくはそれ以上のアミノ酸；及び／又は３）ＴＡＬエフェクタードメインのＣ末端側の天然に存在するＴＡＬエフェクターからの少なくとも６８、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１７０、１８０、１９０、２００、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０若しくはそれ以上のアミノ酸を含む。

【０２２４】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン又はＤＮＡ結合ドメインは、Ｚｎフィンガー分子であるか又はそれを含む。Ｚｎフィンガー分子は、Ｚｎフィンガータンパク質、例えば、天然に存在するＺｎフィンガータンパク質若しくは改変されたＺｎフィンガータンパク質、又はその断片を含む。多くのＺｎフィンガータンパク質は、当業者に公知であり、例えば、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから市販されている。

【０２２５】

一部の実施形態では、Ｚｎフィンガー分子は、選択される標的ＤＮＡ配列に結合するように改変される、非天然に存在するＺｎフィンガータンパク質を含む。例えば、Ｂｅｅｒｌｉ，ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０：１３５－１４１；Ｐａｂｏ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７０：３１３－３４０；Ｉｓａｌａｎ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９：６５６－６６０；Ｓｅｇａｌ，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１２：６３２－６３７；Ｃｈｏｏ，ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１０：４１１－４１６；米国特許第６，４５３，２４２号明細書；米国特許第６，５３４，２６１号明細書；米国特許第６，５９９，６９２号明細書；米国特許第６，５０３，７１７号明細書；米国特許第６，６８９，５５８号明細書；米国特許第７，０３０，２１５号明細書；米国特許第６，７９４，１３６号明細書；米国特許第７，０６７，３１７号明細書；米国特許第７，２６２，０５４号明細書；米国特許第７，０７０，９３４号明細書；米国特許第７，３６１，６３５号明細書；米国特許第７，２５３，２７３号明細書；及び米国特許出願公開第２００５／００６４４７４号明細書；米国特許出願公開第２００７／０２１８５２８号明細書；米国特許出願公開第２００５／０２６７０６１号明細書（全てはそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０２２６】

改変されたＺｎフィンガータンパク質は、天然に存在するＺｎフィンガータンパク質と

比較して、新規な結合特異性を有し得る。改変方法として、限定はしないが、合理的な設計及び様々なタイプの選択が挙げられる。合理的な設計は、例えば、三つ組（又は四つ組）ヌクレオチド配列及び個別のＺｎフィンガーアミノ酸配列を含むデータベースの使用を含み、それぞれの三つ組又は四つ組ヌクレオチド配列は、特定の三つ組又は四つ組配列に結合するＺｎフィンガーの１つ又は複数のアミノ酸配列と会合する。例えば、米国特許第６，４５３，２４２号明細書及び米国特許第６，５３４，２６１号明細書（それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０２２７】

ファージディスプレイ及びツーハイブリッドシステムを含む例示的な選択方法は、米国特許第５，７８９，５３８号明細書；米国特許第５，９２５，５２３号明細書；米国特許第６，００７，９８８号明細書；米国特許第６，０１３，４５３号明細書；米国特許第６，４１０，２４８号明細書；米国特許第６，１４０，４６６号明細書；米国特許第６，２００，７５９号明細書；及び米国特許第６，２４２，５６８号明細書；並びに国際特許公開の国際公開第９８／３７１８６号パンフレット；国際公開第９８／５３０５７号パンフレット；国際公開第００／２７８７８号パンフレット；並びに国際公開第０１／８８１９７号パンフレット及び英国特許第２，３３８，２３７号明細書に開示されている。更に、Ｚｎフィンガータンパク質における結合特異性の増加については、例えば、国際特許公開の国際公開第０２／０７７２２７号パンフレットに記載されている。

【０２２８】

更に、これらや他の参考文献に開示のとおり、Ｚｎフィンガードメイン及び／又は多指型（ｍｕｌｔｉ－ｆｉｎｇｅｒｅｄ）Ｚｎフィンガータンパク質は、例えば、５又はそれ以上のアミノ酸長のリンカーを含む、任意の好適なリンカー配列を用いて、一緒に連結され得る。６又はそれ以上のアミノ酸長の例示的なリンカー配列については、米国特許第６，４７９，６２６号明細書；米国特許第６，９０３，１８５号明細書；及び米国特許第７，１５３，９４９号明細書も参照されたい。本明細書に記載のタンパク質は、タンパク質の個別のＺｎフィンガー間の好適なリンカーの任意の組合せを含み得る。更に、Ｚｎフィンガー結合ドメインにおける結合特異性の増加については、例えば、共同所有された国際特許公開の国際公開第０２／０７７２２７号パンフレットに記載されている。

【０２２９】

融合タンパク質（及びそれをコードするポリヌクレオチド）の設計及び構築のためのＺｎフィンガーのタンパク質及び方法は、当業者に公知であり、米国特許第６，１４０，０８１５号明細書；米国特許第７８９，５３８号明細書；米国特許第６，４５３，２４２号明細書；米国特許第６，５３４，２６１号明細書；米国特許第５，９２５，５２３号明細書；米国特許第６，００７，９８８号明細書；米国特許第６，０１３，４５３号明細書；及び米国特許第６，２００，７５９号明細書；国際特許公開の国際公開第９５／１９４３１号パンフレット；国際公開第９６／０６１６６号パンフレット；国際公開第９８／５３０５７号パンフレット；国際公開第９８／５４３１１号パンフレット；国際公開第００／２７８７８号パンフレット；国際公開第０１／６０９７０号パンフレット；国際公開第０１／８８１９７号パンフレット；国際公開第０２／０９９０８４号パンフレット；国際公開第９８／５３０５８号パンフレット；国際公開第９８／５３０５９号パンフレット；国際公開第９８／５３０６０号パンフレット；国際公開第０２／０１６５３６号パンフレット；及び国際公開第０３／０１６４９６号パンフレットに詳述されている。

【０２３０】

更に、これらや他の参考文献に開示のとおり、Ｚｎフィンガータンパク質及び／又は多指型Ｚｎフィンガータンパク質は、例えば、５又はそれ以上のアミノ酸長のリンカーを含む、任意の好適なリンカー配列を用いて、例えば、融合タンパク質として、一緒に連結され得る。６又はそれ以上のアミノ酸長の例示的なリンカー配列については、米国特許第６，４７９，６２６号明細書；米国特許第６，９０３，１８５号明細書；及び米国特許第７，１５３，９４９号明細書も参照されたい。本明細書に記載のＺｎフィンガー分子は、Ｚｎフィンガー分子の個別のＺｎフィンガータンパク質及び／又は多指型Ｚｎフィンガータ

ンパク質間の好適なリンカーの任意の組合せを含み得る。

【０２３１】

特定の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメイン又はエンドヌクレアーゼドメインは、標的ＤＮＡ配列に（配列特異的様式で）結合する改変されたＺｎフィンガータンパク質を含むＺｎフィンガー分子を含む。一部の実施形態では、Ｚｎフィンガー分子は、１つのＺｎフィンガータンパク質又はその断片を含む。他の実施形態では、Ｚｎフィンガー分子は、複数のＺｎフィンガータンパク質（又はその断片）、例えば、２、３、４、５、６又はそれ以上のＺｎフィンガータンパク質（及び任意選択で多くて１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、又は２つのＺｎフィンガータンパク質）を含む。一部の実施形態では、Ｚｎフィンガー分子は、少なくとも３つのＺｎフィンガータンパク質を含む。一部の実施形態では、Ｚｎフィンガー分子は、４、５又は６つのフィンガーを含む。一部の実施形態では、Ｚｎフィンガー分子は、８、９、１０、１１又は１２のフィンガーを含む。一部の実施形態では、３つのＺｎフィンガータンパク質を含むＺｎフィンガー分子は、９又は１０ヌクレオチドを含む標的ＤＮＡ配列を認識する。一部の実施形態では、４つのＺｎフィンガータンパク質を含むＺｎフィンガー分子は、１２～１４ヌクレオチドを含む標的ＤＮＡ配列を認識する。一部の実施形態では、６つのＺｎフィンガータンパク質を含むＺｎフィンガー分子は、１８～２１ヌクレオチドを含む標的ＤＮＡ配列を認識する。

【０２３２】

一部の実施形態では、Ｚｎフィンガー分子は、両手式のＺｎフィンガータンパク質を含む。両手式のＺｎフィンガータンパク質は、２つのＺｎフィンガードメインが２つの不連続な標的ＤＮＡ配列に結合するように、Ｚｎフィンガータンパク質の２つのクラスターが介在性アミノ酸によって分離されたタンパク質である。両手型のＺｎフィンガー結合タンパク質の例として、４つのＺｎフィンガータンパク質のクラスターがそのタンパク質のアミノ末端に位置し、３つのＺｎフィンガータンパク質のクラスターがカルボキシル末端に位置する場合のＳＩＰ１が挙げられる（Ｒｅｍａｄｅ，ｅｔ　ａｌ．（１９９９）ＥＭＢＯ　Ｊｏｕｒｎａｌ　１８（１８）：５０７３－５０８４を参照されたい）。これらのタンパク質におけるＺｎフィンガーの各クラスターは、固有の標的配列に結合可能であり、２つの標的配列間の間隔は、多数のヌクレオチドを含み得る。

【０２３３】

リンカー

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、リンカー、例えば、ペプチドリンカー、例えば、表６に記載されるリンカーを含み得る。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端の方向に、Ｃａｓドメイン（例えば、表３のＣａｓドメイン）、表６のリンカー（又はそれと少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％若しくは９９％の同一性を有する配列）、及びＲＴドメイン（例えば、表２のＲＴドメイン）を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、エンドヌクレアーゼとＲＴドメインとの間のフレキシブルリンカー、例えばアミノ酸配列ＳＧＧＳＳＧＧＳＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳＳＧＧＳＳＧＧＳＳ（配列番号４００６）を含むリンカーを含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドのＲＴドメインは、エンドヌクレアーゼドメインに対してＣ末端に位置し得る。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドのＲＴドメインは、エンドヌクレアーゼドメインに対してＮ末端に位置し得る。

【０２３４】

【表６－１】

表6 例示的なリンカー配列

アミノ酸配列	配列番号
GGS	
GGSGGS	4102
GGSGGSGGS	4103
GGSGGSGGSGGS	4104
GGSGGSGGSGGSGGS	4105
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106
GGGGS	4107
GGGGSGGGGS	4108
GGGGSGGGGSGGGGS	4109
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110

【０２３５】

【表６－２】

アミノ酸配列	配列番号
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112
GGG	
GGGG	4114
GGGGG	4115
GGGGGG	4116
GGGGGGG	4117
GGGGGGGG	4118
GSS	
GSSGSS	4120
GSSGSSGSS	4121
GSSGSSGSSGSS	4122
GSSGSSGSSGSSGSS	4123
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124
EAAAK	4125
EAAAKEAAAK	4126
EAAAKEAAAKEAAAK	4127
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130
PAP	
PAPAP	4132
PAPAPAP	4133
PAPAPAPAP	4134
PAPAPAPAPAP	4135
PAPAPAPAPAPAP	4136
GGSGGG	4137
GGGGGS	4138
GGSGSS	4139
GSSGGS	4140
GGSEAAAK	4141
EAAAKGGS	4142
GGSPAP	4143
PAPGGS	4144
GGGGSS	4145
GSSGGG	4146
GGGEAAAK	4147
EAAAKGGG	4148

【０２３６】
【表６－３】

アミノ酸配列	配列番号
GGGPAP	4149
PAPGGG	4150
GSSEAAAK	4151
EAAAKGSS	4152
GSSPAP	4153
PAPGSS	4154
EAAAKPAP	4155
PAPEAAAK	4156
GGSGGGGSS	4157
GGSGSSGGG	4158
GGGGGSGSS	4159
GGGGSSGGS	4160
GSSGGSGGG	4161
GSSGGGGGS	4162
GGSGGGEAAAK	4163
GGSEAAAKGGG	4164
GGGGGSEAAAK	4165
GGGEAAAKGGS	4166
EAAAKGGSGGG	4167
EAAAKGGGGGS	4168
GGSGGGPAP	4169
GGSPAPGGG	4170
GGGGGSPAP	4171
GGGPAPGGS	4172
PAPGGSGGG	4173
PAPGGGGGS	4174
GGSGSSEAAAK	4175
GGSEAAAKGSS	4176
GSSGGSEAAAK	4177
GSSEAAAKGGS	4178
EAAAKGGSGSS	4179
EAAAKGSSGGS	4180
GGSGSSPAP	4181
GGSPAPGSS	4182
GSSGGSPAP	4183
GSSPAPGGS	4184
PAPGGSGSS	4185
PAPGSSGGS	4186

【０２３７】

【表６－４】

アミノ酸配列	配列番号
GGSEAAAKPAP	4187
GGSPAPEAAAK	4188
EAAAKGGSPAP	4189
EAAAKPAPGGS	4190
PAPGGSEAAAK	4191
PAPEAAAKGGS	4192
GGGGSSEAAAK	4193
GGGEAAAKGSS	4194
GSSGGGEAAAK	4195
GSSEAAAKGGG	4196
EAAAKGGGGSS	4197
EAAAKGSSGGG	4198
GGGGSSPAP	4199
GGGPAPGSS	4200
GSSGGGPAP	4201
GSSPAPGGG	4202
PAPGGGGSS	4203
PAPGSSGGG	4204
GGGEAAAKPAP	4205
GGGPAPEAAAK	4206
EAAAKGGGPAP	4207
EAAAKPAPGGG	4208
PAPGGGEAAAK	4209
PAPEAAAKGGG	4210
GSSEAAAKPAP	4211
GSSPAPEAAAK	4212
EAAAKGSSPAP	4213
EAAAKPAPGSS	4214
PAPGSSEAAAK	4215
PAPEAAAKGSS	4216
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217
GGGGSEAAAKGGGGS	4218
EAAAKGGGGSEAAAK	4219
SGSETPGTSESATPES	4220
GSAGSAAGSGEF	4221
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4222

【０２３８】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドのリンカーは、（ＳＧＧＳ）$_n$（配列番号４０２５）、（ＧＧＧＳ）$_n$（配列番号４０２６）、（ＧＧＧＧＳ）$_n$（配列番号４０２７）、（Ｇ）$_n$、（ＥＡＡＡＫ）$_n$（配列番号４０２８）、（ＧＧＳ）$_n$、又は（ＸＰ）$_n$から選択されるモチーフを含む。

【０２３９】

プールスクリーニングによる遺伝子組換えポリペプチド選択

候補遺伝子組換えポリペプチドは、候補の遺伝子編集能力を評価するためにスクリーニングされ得る。例えば、ヒトゲノムにおけるコード配列の標的化された編集のために設計されたＲＮＡ遺伝子組換えシステムが使用され得る。特定の実施形態では、このような遺伝子組換えシステムが、プールスクリーニング手法と共に使用され得る。

【０２４０】

例えば、遺伝子組換えポリペプチド候補及び鋳型ガイドＲＮＡ（ｔｇＲＮＡ）のライブラリーが、プールスクリーニング手法によって候補の遺伝子編集能力を試験するために、哺乳動物細胞内に導入され得る。特定の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチド候補のライブラリーが、哺乳動物細胞内に導入された後、ｔｇＲＮＡが細胞内に導入される。

【０２４１】
スクリーニングにおいて使用され得る哺乳動物細胞代表的な非限定的な例としては、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、Ｕ２ＯＳ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＨｅｐＧ２細胞、Ｈｕｈ７細胞、Ｋ５６２細胞、又はｉＰＳ細胞が挙げられる。
【０２４２】
遺伝子組換えポリペプチド候補は、１）Ｃａｓ－ヌクレアーゼ、例えば野生型ＣａｓヌクレアーゼＣａｓ９ヌクレアーゼ、突然変異体ＣａｓヌクレアーゼＣａｓニッカーゼ、例えば、Ｃａｓ９　Ｎ８６３Ａニッカーゼなどの Ｃａｓ９ニッカーゼ、又は表３若しくは表４から選択されるＣａｓヌクレアーゼ、２）ペプチドリンカー、例えば、様々な程度の長さ、柔軟性、疎水性、及び／又は二次構造を示し得る表Ｄ若しくは表６からの配列；及び３）逆転写酵素（ＲＴ）、例えば、表Ｄ若しくは表２からのＲＴドメインを含み得る。遺伝子組換えポリペプチド候補ライブラリーは、ＣａｓヌクレアーゼＣａｓ、ペプチドリンカー若しくはＲＴドメイン成分の１つ、２つ若しくは３つ全てに関して互いに異なる複数の異なる遺伝子組換えポリペプチド候補、又はこのような遺伝子組換えポリペプチド候補をコードする複数の核酸発現ベクターを含む。
【０２４３】
遺伝子組換えポリペプチド候補のスクリーニングについて、遺伝子組換えポリペプチド成分及びｔｇＲＮＡ成分を含む２成分システムが使用され得る。遺伝子組換え成分は、例えば、発現ベクター、例えば遺伝子組換えポリペプチド候補をコードする発現プラスミド又はレンチウイルスベクターを含み得、例えば遺伝子組換えポリペプチド候補をコードするヒトコドン最適化核酸、例えば上記のＣａｓ－リンカー－ＲＴ融合を含む。特定の実施形態では、（ｉ）哺乳動物細胞内の発現のためのプロモータ、例えばＣＭＶプロモータ；（ｉｉ）遺伝子組換えライブラリー候補、例えば表３又は表４のＣａｓヌクレアーゼ、表６のペプチドリンカー及び表２のＲＴを含むＣａｓ－リンカー－ＲＴ融合、例えば表Ｄにあるようなリンカー－ＲＴ融合；（ｉｉｉ）自己切断ポリペプチド、例えばＴ２Ａペプチド；（ｉｖ）哺乳動物細胞内の選択を可能にするマーカ、例えばピューロマイシン耐性遺伝子；及び（ｖ）終結シグナル、例えばポリＡテールを含むレンチウイルスカセットが用いられる。
【０２４４】
ｔｇＲＮＡ成分は、ｔｇＲＮＡ又は発現ベクター、例えば、ｔｇＲＮＡを生成し、例えば、Ｕ６プロモータを用いて、ｔｇＲＮＡの発現を駆動する発現プラスミドを含み得、ここで、ｔｇＲＮＡは、Ｃａｓによって認識され、それを目的のゲノム遺伝子座に局在化し、またＲＴドメインによって所望の編集の逆転写をゲノムに鋳型化するノンコーディングＲＮＡ配列である。
【０２４５】
遺伝子組換えポリペプチドライブラリー候補を発現する細胞のプールを調製するために、哺乳動物細胞、例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞に、プールされた遺伝子組換えポリペプチド候補発現ベクター調製物、例えば、遺伝子組換え候補ポリペプチドライブラリーのレンチウイルス調製物が形質導入され得る。特定の実施形態では、レンチウイルスプラスミドが用いられ、ＨＥＫ２９３　Ｌｅｎｔｉ－Ｘ細胞が、レンチウイルスプラスミドトランスフェクションの前に、１５ｃｍプレートに播種される（約12×10^{6}個の細胞）。こうした実施形態では、レンチウイルスプラスミドトランスフェクションが、Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ　Ｐａｃｋａｇｉｎｇ　Ｍｉｘ（Ｂｉｏｓｅｔｔｉａ）を用いて行われ得、遺伝子組換え候補ライブラリーのためのプラスミドＤＮＡのトランスフェクションが、製造業者のプロトコルに従って、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００及びＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地を用いて行われる。こうした実施形態では、細胞外ＤＮＡが、翌日、完全な培地交換によって除去され得、ウイルス含有培地が、４８時間後に収集され得る。レンチウイルス培地は、Ｌｅｎｔｉ－Ｘ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ（ＴａＫａＲａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて濃縮され得、５ｍＬのレンチウイルスアリコートが作製され、－８０℃で貯蔵され得る。レンチウイルス力価測定が、選択後、例えば、ピューロマイ

シン選択後にコロニー形成単位を計数することによって行われる。

【０２４６】

標的ＤＮＡの遺伝子編集をモニターするために、哺乳動物細胞、例えば、標的ＤＮＡを担持するＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞が用いられ得る。標的ＤＮＡの遺伝子編集のモニターについての他の実施形態では、哺乳動物細胞、例えば、標的ＤＮＡゲノムランディングパッドを担持するＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞が用いられ得る。特定の実施形態では、標的ＤＮＡゲノムランディングパッドは、対象とする疾患又は障害の処置のために編集される遺伝子を含み得る。他の特定の実施形態では、標的ＤＮＡは、遺伝子編集が起こったかどうかを決定するためにモニターされ得る検出可能な特性を示すタンパク質を発現する遺伝子配列である。例えば、特定の実施形態では、青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）発現又は緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）発現ゲノムランディングパッドが用いられる。特定の実施形態では、哺乳動物細胞、例えば、標的ＤＮＡ、例えば、標的ＤＮＡゲノムランディングパッドを含むＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞が、遺伝子組換えライブラリー候補当たり５００×～３０００×細胞で培養プレートに播種され、細胞当たりの多重感染を最小限に抑えるために０．２～０．３感染多重度（ＭＯＩ）で形質導入される。ピューロマイシン（２．５ｕｇ／ｍＬ）が、感染細胞の選択を可能にするために、感染の４８時間後に加えられ得る。こうした実施形態では、細胞は、少なくとも７日間にわたってピューロマイシン選択下に置かれ、次に、ｔｇＲＮＡ導入、例えば、ｔｇＲＮＡエレクトロポレーションのためにスケールアップされ得る。

【０２４７】

遺伝子編集が起こるかどうかを確認するために、編集される標的ＤＮＡを含有する哺乳動物細胞に、遺伝子組換えポリペプチドライブラリー候補を感染させ、次に、標的ＤＮＡの編集への使用のために設計されたｔｇＲＮＡでトランスフェクトさせ得る。その後、細胞は、例えば、細胞ソーティング及び配列分析を使用することにより、標的遺伝子座の編集が、設計された結果に準じて起こったかどうか、又は編集が起こらなかった若しくは不完全な編集が起こったかどうかを決定するために分析され得る。

【０２４８】

特定の実施形態では、ゲノム編集が起こるかどうかを確認するために、ＢＦＰ－又はＧＦＰ発現哺乳動物細胞、例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞に、遺伝子組換えライブラリー候補を感染させ、次に、ｔｇＲＮＡプラスミド又はＲＮＡ、例えば、ライブラリー候補につき＞２５０×～１０００×のカバレージを確実にする細胞数で、ＢＦＰからＧＦＰ又はＧＦＰからＢＦＰに変換するように設計された２００ｎｇのｔｇＲＮＡプラスミドによる２５０，０００個の細胞／ウェルのエレクトロポレーションによってトランスフェクト又はエレクトロポレートさせ得る。こうした実施形態では、このアッセイにおける様々な構築物のゲノム編集能力が、エレクトロポレーションの４～１０日後に、色変換型蛍光タンパク質（ＦＰ）の発現のために蛍光活性化細胞ソーティング（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ－Ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｓｏｒｔｉｎｇ）（ＦＡＣＳ）によって細胞をソートすることによって評価され得る。細胞がソートされ、非編集細胞（元の蛍光タンパク質シグナルを示す）、編集細胞（変換された蛍光タンパク質シグナルを示す）、及び不完全な編集（蛍光タンパク質シグナルを示さない）細胞の異なる集団として収集される。非ソート細胞のサンプルも、分析中の候補富化を決定するために入力集団として収集され得る。

【０２４９】

遺伝子組換えライブラリー候補が、アッセイにおいてゲノム編集能力を示すかどうかを決定するために、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）が、ソートされた細胞集団から収集され、各集団における遺伝子組換えライブラリー候補をシーケンシングすることによって分析される。簡潔に述べると、遺伝子組換え候補が、遺伝子組換えポリペプチド発現ベクター、例えば、レンチウイルスカセットに特異的なプライマーを用いてゲノムから増幅され、ゲノムＤＮＡを希釈するために第２回のＰＣＲにおいて増幅され、次に、シーケンシングされ、例えば、次世代シーケンシングプラットフォームによってシーケンシングされ得る。シ

ーケンシングリードの品質管理の後、少なくとも約１５００ヌクレオチド及び一般に約３２００ヌクレオチド以下のリードが、遺伝子組換えポリペプチドライブラリー配列にマップされ、ライブラリー配列との最小で約８０％の一致を含むものが、このプールされたスクリーンのための所与の候補と問題なく整列されたと見なされる。アッセイにおいて遺伝子編集、例えば、ＢＦＰからＧＦＰ又はＧＦＰからＢＦＰの編集を行うことが可能な候補を同定するために、編集された集団における各ライブラリー候補のリードカウントが、最初の非ソート集団におけるそのリードカウントと比較される。

【０２５０】

プールスクリーニングのために、ゲノム編集能力を有する遺伝子組換え候補が、非ソート（入力）細胞と比べた編集された（変換されたＦＰ）集団の富化に基づいて同定される。一部の実施形態では、入力の少なくとも１．０、１．５、２．０、２．５、３．０、４．０、５．０、６．０、７．０、８．０、９．０、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、又は少なくとも１００倍の富化は、潜在的に有用な遺伝子編集活性、例えば、少なくとも２倍の富化を示す。一部の実施形態では、富化は、富化比のｌｏｇ底２を取ることによってｌｏｇ値に換算される。一部の実施形態では、少なくとも０、１、２、３、４、５、５．５、６．０、６．２、６．３、６．４、６．５、又は少なくとも６．６のｌｏｇ２富化スコアは、潜在的に有用な遺伝子編集活性、例えば、少なくとも１．０のｌｏｇ２富化スコアを示す。特定の実施形態では、遺伝子組換え候補について観察される富化値は、参照、例えば、エレメントＩＤ番号：１７３８０を用いて同様の条件下で観察される富化値と比較され得る。

【０２５１】

一部の実施形態では、複数のｔｇＲＮＡが、遺伝子組換え候補ライブラリーをスクリーニングするのに使用され得る。特定の実施形態では、複数のｔｇＲＮＡが、例えば、特定の標的遺伝子、例えば、疾患の処置のための遺伝子標的の遺伝子編集のために、鋳型／Ｃａｓ－リンカー－ＲＴ融合対を最適化するのに用いられ得る。特定の実施形態では、遺伝子組換え候補をスクリーニングするためのプール手法が、配列された形式で多くの異なるｔｇＲＮＡを用いて行われ得る。

【０２５２】

一部の実施形態では、複数のタイプの編集、例えば、異なる長さの挿入、置換、及び／又は欠失が、遺伝子組換え候補ライブラリーをスクリーニングするのに使用され得る。

【０２５３】

一部の実施形態では、複数の標的配列、例えば、異なる蛍光タンパク質が、遺伝子組換え候補ライブラリーをスクリーニングするのに使用され得る。一部の実施形態では、複数の標的配列、例えば、異なる蛍光タンパク質が、遺伝子組換え候補ライブラリーをスクリーニングするのに使用され得る。一部の実施形態では、複数の細胞型、例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳが、遺伝子組換え候補ライブラリーをスクリーニングするのに使用され得る。当業者は、所与の候補が、ｔｇＲＮＡ配列（例えば、ヌクレオチド修飾、ＰＢＳ長さ、ＲＴ鋳型長さ）、標的配列、標的位置、編集のタイプ、遺伝子組換えポリペプチドの第１の鎖ニックに対する突然変異の位置又は細胞型を含む異なる条件にわたり、改変された編集能力又は観察可能な若しくは有用な活性の増加又は低下を示し得ることを理解するであろう。従って、一部の実施形態では、遺伝子組換えライブラリー候補が、例えば、少なくとも２つの細胞型における少なくとも２つの異なるｔｇＲＮＡを用いて、複数のパラメータにわたってスクリーニングされ、遺伝子編集活性が、いずれかの単一の条件における富化によって同定される。他の実施形態では、異なるｔｇＲＮＡ及び細胞型にわたってよりロバストな活性を有する候補が、少なくとも２つの条件、例えば、スクリーニングされる全ての条件における富化によって同定される。明確にするために、任意の所与の条件下でほとんどないし全く富化を示さないことが分かった候補は、全ての条件にわたって不活性であると推定されず、異なるパラメータを用いてスクリーニングされるか、又は例えばドメイン（例えば、ＲＴドメイン）、リンカー若しくは他のシグナル（例えば、ＮＬＳ）を交換するか、入れ替えるか又は変化させることにより、ポリペプチドレベルで再構

成され得る。
【０２５４】
例示的なＣａｓ９－リンカー－ＲＴ融合の配列
一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、リンカー配列及びＲＴ配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、表Ｄに列挙されるリンカー配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、表Ｄに列挙されるＲＴドメインのアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、表Ｄに列挙されるリンカー配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列；及び表Ｄに列挙されるＲＴドメインのアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、（ｉ）表Ｄの行に列挙されるリンカー配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列；及び（ｉｉ）表Ｄの同じ行に列挙されるＲＴドメインのアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【０２５５】
遺伝子組換えシステムのための局在化配列
特定の実施形態では、遺伝子エディターシステムＲＮＡは、細胞内局在化配列、例えば、核局在化配列（ＮＬＳ）を更に含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、配列番号４０００及び／若しくは配列番号４００１に含まれるＮＬＳ、又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を有するＮＬＳを含む。
【０２５６】
核局在化配列は、ＲＮＡの核への入力を促進するＲＮＡ配列であり得る。特定の実施形態では、核局在化シグナルは、鋳型ＲＮＡ上に位置する。特定の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、第１のＲＮＡ上にコードされ、鋳型ＲＮＡは、第２の別のＲＮＡであり、核局在化シグナルは、鋳型ＲＮＡ上に位置し、遺伝子組換えポリペプチドをコードするＲＮＡ上に位置しない。特定の理論に束縛されることを意図しないが、一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするＲＮＡは、その翻訳を促進するため、主に細胞質に標的化される一方、鋳型ＲＮＡは、ゲノム中に挿入を促進するため、主に核に標的化される。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、鋳型ＲＮＡの３’末端、５’末端、又は内部領域内に存在する。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、異種配列の３’である（例えば、直接的に異種配列の３’である）、又は異種配列の５’である（例えば、直接的に異種配列の５’である）。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、鋳型ＲＮＡの５’ＵＴＲの外側又は３’ＵＴＲの外側に配置される。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、５’ＵＴＲと３’ＵＴＲとの間に配置され、任意選択で、核局在化シグナルは、導入遺伝子によって転写されない（例えば、核局在化シグナルは、アンチセンス方向性であるか、又は転写終結シグナル若しくはポリアデニル化シグナルの下流である）。一部の実施形態では、核局在化配列は、イントロンの内部に位置する。一部の実施形態では、複数の同じ又は異なる核局在化シグナルは、ＲＮＡ中、例えば、鋳型ＲＮＡ中に存在する。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、５ｂｐ、１０ｂｐ、２５ｂｐ、５０ｂｐ、７５ｂｐ、１００ｂｐ、１５０ｂｐ、２００ｂｐ、２５０ｂｐ、３００ｂｐ、３５０ｂｐ、４００ｂｐ、４５０ｂｐ、５００ｂｐ、６００ｂｐ、７００ｂｐ、８００ｂｐ、９００ｂｐ又は１０００ｂｐ未満の長さである。様々なＲＮＡ核局在化配列が使用可能である。例えば、Ｌｕｂｅｌｓｋｙ ａｎｄ Ｕｌｉｔｓｋｙ，Ｎａｔｕｒｅ ５５５（１０

７－１１１），２０１８は、ＲＮＡの核内への局在化を駆動するＲＮＡ配列について記載している。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、ＳＩＮＥ由来の核ＲＮＡ局在化（ＳＩＲＬＯＩＮ）シグナルである。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、核濃縮タンパク質に結合する。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、ＨＮＲＮＰＫタンパク質に結合する。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、ピリミジン中に豊富に存在し、例えば、Ｃ／Ｔリッチ、Ｃ／Ｕリッチ、Ｃリッチ、Ｔリッチ、又はＵリッチ領域である。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、長鎖非翻訳ＲＮＡに由来する。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、ＭＡＬＡＴ１長鎖非翻訳ＲＮＡに由来する、又はＭＡＬＡＴ１の６００ヌクレオチドのＭ領域である（Ｍｉｙａｇａｗａ ｅｔ ａｌ．，ＲＮＡ１８，（７３８－７５１），２０１２に記載されている）。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、ＢＯＲＧ長鎖非翻訳ＲＮＡに由来する、又はＡＧＣＣＣモチーフである（Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ３４，２３１８－２３２９（２０１４）に記載されている。一部の実施形態では、核局在化配列は、Ｓｈｕｋｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ ＥＭＢＯ Ｊｏｕｒｎａｌ ｅ９８４５２（２０１８）に記載されている。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、レトロウイルスに由来する。

【０２５７】

一部の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、１つ又は複数の（例えば、２、３、４、５）の核ターゲティング配列、例えば、核局在化配列（ＮＬＳ）を含む。一部の実施形態では、ＮＬＳは、双節型（ｂｉｐａｒｔｉｔｅ）ＮＬＳである。一部の実施形態では、ＮＬＳは、ＮＬＳを含むタンパク質の細胞核への入力を促進する。一部の実施形態では、ＮＬＳは、本明細書に記載の遺伝子組換えポリペプチドのＮ末端と融合される。一部の実施形態では、ＮＬＳは、遺伝子組換えポリペプチドのＣ末端と融合される。一部の実施形態では、ＮＬＳは、ＣａｓドメインのＮ末端又はＣ末端と融合される。一部の実施形態では、リンカー配列は、ＮＬＳと、遺伝子組換えポリペプチドの隣接ドメインとの間に配置される。

【０２５８】

一部の実施形態では、ＮＬＳは、アミノ酸配列ＭＤＳＬＬＭＮＲＲＫＦＬＹＱＦＫＮＶＲＷＡＫＧＲＲＥＴＹＬＣ（配列番号４００９）、ＰＫＫＲＫＶＥＧＡＤＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号４０１０）、ＲＫＳＧＫＩＡＡＩＷＫＲＰＲＫＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号４０１１）、ＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号４６４２）、ＫＫＴＥＬＱＴＴＮＡＥＮＫＴＫＫＬ（配列番号４６４３）、又はＫＲＧＩＮＤＲＮＦＷＲＧＥＮＧＲＫＴＲ（配列番号４６４４）、ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号４６４５）、又はその機能性断片若しくは変異体を含む。例示的なＮＬＳ配列は、ＰＣＴ／欧州特許第２０００／０１１６９０号明細書にも記載されており、その内容は、その例示的な核局在化配列の開示について、参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、ＮＬＳは、表７に開示のようなアミノ酸配列を含む。この表のＮＬＳは、核への細胞内局在化を改善するため、ポリペプチド中の１つ又は複数の位置におけるポリペプチド中の１つ又は複数のコピー、例えば、Ｎ末端ドメイン内、ペプチドドメイン間、Ｃ末端ドメイン内、又は位置の組合せにおける、ＮＬＳの１、２、３若しくはそれ以上コピーで利用され得る。複数の固有配列は、単一のポリペプチド中で使用され得る。配列は、例えば、塩基性アミノ酸の１つ若しくは２つのストレッチを有する、天然に単節型（ｍｏｎｏｐａｒｔｉｔｅ）又は双節型であり得るか、又はキメラ双節型配列として使用され得る。配列の参照は、細胞内局在化予測アルゴリズムを用いて取り出された配列について、ＳｅｑＮＬＳとして示される場合を除いて、ＵｎｉＰｒｏｔ受入番号に対応する（Ｌｉｎ ｅｔ ａｌ ＢＭＣ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔ １３：１５７（２０１２）、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０２５９】

【表７－１】

表7 遺伝子組換えシステムにおける使用のための例示的な核局在化シグナル

配列	配列参照	配列番号
AHFKISGEKRPSTDPGKKAKNPKKKKKKDP	Q76IQ7	4223
AHRAKKMSKTHA	P21827	4224
ASPEYVNLPINGNG	SeqNLS	4225
CTKRPRW	O88622, Q86W56, Q9QYM2, O02776	4226
DKAKRVSRNKSEKKRR	O15516, Q5RAK8, Q91YB2, Q91YB0, Q8QGQ6, O08785, Q9WVS9, Q6YGZ4	4227
EELRLKEELLKGIYA	Q9QY16, Q9UHL0, Q2TBP1, Q9QY15	4228
EEQLRRRKNSRLNNTG	G5EFF5	4229
EVLKVIRTGKRKKKAWKRMVTKVC	SeqNLS	4230
HHHHHHHHHHHHQPH	Q63934, G3V7L5, Q12837	4231
HKKKHPDASVNFSEFSK	P10103, Q4R844, P12682, B0CM99, A9RA84, Q6YKA4, P09429, P63159, Q08IE6, P63158, Q9YH06, B1MTB0	4232
HKRTKK	Q2R2D5	4233
IINGRKLKLKKSRRRSSQTSNNSFTSRRS	SeqNLS	4234
KAEQERRK	Q8LH59	4235
KEKRKRREELFIEQKKRK	SeqNLS	4236
KKGKDEWFSRGKKP	P30999	4237
KKGPSVQKRKKT	Q6ZN17	4238
KKKTVINDLLHYKKEK	SeqNLS, P32354	4239
KKNGGKGKNKPSAKIKK	SeqNLS	4240
KKPKWDDFKKKKK	Q15397, Q8BKS9, Q562C7	4241
KKRKKD	SeqNLS, Q91Z62, Q1A730, Q969P5, Q2KHT6, Q9CPU7	4242
KKRRKRRRK	SeqNLS	4243
KKRRRRARK	Q9UMS6, D4A702, Q91YE8	4244
KKSKRGR	Q9UBS0	4245
KKSRKRGS	B4FG96	4246
KKSTALSRELGKIMRRR	SeqNLS, P32354	4247
KKSYQDPEIIAHSRPRK	Q9U7C9	4248

【０２６０】

【表７－２】

配列	配列参照	配列番号
KKTGKNRKLKSKRVKTR	Q9Z301, O54943, Q8K3T2	4249
KKVSIAGQSGKLWRWKR	Q6YUL8	4250
KKYENVVIKRSPRKRGRPRK	SeqNLS	4251
KNKKRK	SeqNLS	4252
KPKKKR	SeqNLS	4253
KRAMKDDSHGNSTSPKRRK	Q0E671	4254
KRANSNLVAAYEKAKKK	P23508	4255
KRASEDTTSGSPPKKSSAGPKR	Q9BZZ5, Q5R644	4256
KRFKRRWMVRKMKTKK	SeqNLS	4257
KRGLNSSFETSPKKVK	Q8IV63	4258
KRGNSSIGPNDLSKRKQRKK	SeqNLS	4259
KRIHSVSLSQSQIDPSKKVKRAK	SeqNLS	4260
KRKGKLKNKGSKRKK	O15381	4261
KRRRRRRREKRKR	Q96GM8	4262
KRSNDRTYSPEEEKQRRA	Q91ZF2	4263
KRTVATNGDASGAHRAKKMSK	SeqNLS	4264
KRVYNKGEDEQEHLPKGKKR	SeqNLS	4265
KSGKAPRRRAVSMDNSNK	Q9WVH4, O43524	4266
KVNFLDMSLDDIIIYKELE	Q9P127	4267
KVQHRIAKKTTRRRR	Q9DXE6	4268
LSPSLSPL	Q9Y261, P32182, P35583	4269
MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLC	Q9GZX7	4270
MPQNEYIELHRKRYGYRLDYHEKKRKKESRE AHERSKKAKKMIGLKAKLYHK	SeqNLS	4271
MVQLRPRASR	SeqNLS	4272
NNKLLAKRRKGGASPKDDPMDDIK	Q965G5	4273
NYKRPMDGTYGPPAKRHEGE	O14497, A2BH40	4274
PDTKRAKLDSSETTMVKKK	SeqNLS	4275
PEKRTKI	SeqNLS	4276
PGGRGKKK	Q719N1, Q9UBP0, A2VDN5	4277
PGKMDKGEHRQERRDRPY	Q01844, Q61545	4278
PKKGDKYDKTD	Q45FA5	4279
PKKKSRK	O35914, Q01954	4280
PKKNKPE	Q22663	4281
PKKRAKV	P04295, P89438	4282
PKPKKLKVE	P55263, P55262, P55264, Q64640	4283
PKRGRGR	Q9FYS5, Q43386	4284
PKRRLVDDA	P0C797	4285
PKRRRTY	SeqNLS	4286

【０２６１】

【表７－３】

配列	配列参照	配列番号
PLFKRR	A8X6H4, Q9TXJ0	4287
PLRKAKR	Q86WB0, Q5R8V9	4288
PPAKRKCIF	Q6AZ28, O75928, Q8C5D8	4289
PPARRRRL	Q8NAG6	4290
PPKKKRKV	Q3L6L5, P03070, P14999, P03071	4291
PPNKRMKVKH	Q8BN78	4292
PPRIYPQLPSAPT	P0C799	4293
PQRSPFPKSSVKR	SeqNLS	4294
PRPRKVPR	P0C799	4295
PRRRVQRKR	SeqNLS, Q5R448, Q5TAQ9	4296
PRRVRLK	Q58DJ0, P56477, Q13568	4297
PSRKRPR	Q62315, Q5F363, Q92833	4298
PSSKKRKV	SeqNLS	4299
PTKKRVK	P07664	4300
QRPGPYDRP	SeqNLS	4301
RGKGGKGLGKGGAKRHRK	SeqNLS	4302
RKAGKGGGGHKTTKKRSAKDEKVP	B4FG96	4303
RKIKLKRAK	A1L3G9	4304
RKIKRKRAK	B9X187	4305
RKKEAPGPREELRSRGR	O35126, P54258, Q5IS70, P54259	4306
RKKRKGK	SeqNLS, Q29243, Q62165, Q28685, O18738, Q9TSZ6, Q14118	4307
RKKRRQRRR	P04326, P69697, P69698, P05907, P20879, P04613, P19553, P0C1J9, P20893, P12506, P04612, Q73370, P0C1K0, P05906, P35965, P04609, P04610, P04614, P04608, P05905	4308
RKKSIPLSIKNLKRKHKRKKNKITR	Q9C0C9	4309
RKLVKPKNTKMKTKLRTNPY	Q14190	4310
RKRLILSDKGQLDWKK	SeqNLS, Q91Z62, Q1A730, Q2KHT6, Q9CPU7	4311
RKRLKSK	Q13309	4312
RKRRVRDNM	Q8QPH4, Q809M7, A8C8X1, Q2VNC5, Q38SQ0, O89749, Q6DNQ9, Q809L9, Q0A429, Q20NV3, P16509, P16505, Q6DNQ5, P16506, Q5XT06, P26118, Q2ICQ2, Q2RCG8, Q0A2D0, Q0A2H9, Q9IQ46, Q809M3, Q6J847, Q6J856, B4URE4, A4GCM7, Q0A440, P26120, P16511,	4313
RKRSPKDKKEKDLDGAGKRRKT	Q7RTP6	4314
RKRTPRVDGQTGENDMNKRRRK	O94851	4315
RLPVRRRRRR	P04499, P12541, P03269, P48313, P03270	4316
RLRFRKPKSK	P69469	4317
RQQRKR	Q14980	4318
RRDLNSSFETSPKKVK	Q8K3G5	4319
RRDRAKLR	Q9SLB8	4320
RRGDGRRR	Q80WE1, Q5R9B4, Q06787, P35922	4321

【０２６２】

【表７－４】

配列	配列参照	配列番号
RRGRKRKAEKQ	Q812D1, Q5XXA9, Q99JF8, Q8MJG1, Q66T72, O75475	4322
RRKKRR	Q0VD86, Q58DS6, Q5R6G2, Q9ERI5, Q6AYK2, Q6NYC1	4323
RRKRSKSEDMDSVESKRRR	Q7TT18	4324
RRKRSR	Q99PU7, D3ZHS6, Q92560, A2VDM8	4325
RRPKGKTLQKRKPK	Q6ZN17	4326
RRRGFERFGPDNMGRKRK	Q63014, Q9DBR0	4327
RRRGKNKVAAQNCRK	SeqNLS	4328
RRRKRR	Q5FVH8, Q6MZT1, Q08DH5, Q8BQP9	4329
RRRQKQKGGASRRR	SeqNLS	4330
RRRREGPRARRRR	P08313, P10231	4331
RRTIRLKLVYDKCDRSCKIQKKNRNKCQYCR FHKCLSVGMSHNAIRFGRMPRSEKAKLKAE	SeqNLS	4332
RRVPQRKEVSRCRKCRK	Q5RJN4, Q32L09, Q8CAK3, Q9NUL5	4333
RVGGRRQAVECIEDLLNEPGQPLDLSCKRPR P	P03255	4334
RVVKLRIAP	P52639, Q6JMN0	4335
RVVRRR	P70278	4336
SKRKTKISRKTR	Q5RAY1, O00443	4337
SYVKTVPNRTRTYIKL	P21935	4338
TGKNEAKKRKIA	P52739, Q8K3J5, Q5RAU9	4339
TLSPASSPSSVSCPVIPASTDESPGSALNI	SeqNLS	4340
VSKKQRTGKKIH	P52739, Q8K3J5, Q5RAU9	4341
SPKKKRKVE		4342
KRTAD GSEFE SPKKKRKVE		4343
PAAKRVKLD		4344
PKKKRKV		4345
MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLC		4346
SPKKKRKVEAS		4347
MAPKKKRKVGIHRGVP		4348

【０２６３】

一部の実施形態では、ＮＬＳは、双節型ＮＬＳである。双節型ＮＬＳは、典型的に、スペーサー配列によって隔てられる２つの塩基性アミノ酸クラスター（例えば、約１０アミノ酸長であり得る）を含む。単節型ＮＬＳは、典型的に、スペーサーを欠いている。双節型ＮＬＳの例は、配列ＫＲ［ＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡ］ＫＫＫＫ（配列番号４６４５）（括弧内はスペーサー）を有するヌクレオプラスミンＮＬＳである。別の例示的な双節型ＮＬＳは、配列ＰＫＫＫＲＫＶＥＧＡＤＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号４０１６）を有する。例示的なＮＬＳは、国際公開第２０２００５１５６１号パンフレット（核局在化配列に関する開示を含め、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０２６４】

特定の実施形態では、遺伝子エディターシステムポリペプチド（例えば、本明細書に記載の遺伝子組換えポリペプチド）は、細胞内局在化配列、例えば、核局在化配列及び／又は核小体局在化配列を更に含む。核局在化配列及び／又は核小体局在化配列は、そのタンパク質の核及び／又は核小体への入力を促進するアミノ酸配列であり得、ここで、それは、異種配列のゲノムへの組み込みを促進し得る。特定の実施形態では、遺伝子エディターシステムポリペプチド（例えば、例として本明細書に記載の遺伝子組換えポリペプチド）は、核小体局在化配列を更に含む。特定の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、第１のＲＮＡ上にコードされ、鋳型ＲＮＡは、第２の分かれたＲＮＡであり、核小体局在化シグナルは、遺伝子組換えポリペプチドをコードするＲＮＡ上にコードされ、鋳型ＲＮＡ上にコードされない。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、ポリペプチドのＮ末端、Ｃ末端、又は内部領域内に位置する。一部の実施形態では、複数の同じ又は異なる核小体局在化シグナルが使用される。一部の実施形態では、核局在化シグナルは、５、

１０、２５、５０、７５又は１００アミノ酸長未満である。様々なポリペプチドの核小体局在化シグナルが使用可能である。例えば、Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２，３３（２０１５）は、核小体局在化シグナルとしても機能する核局在化シグナルについての記載がある。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、核局在化シグナルでもあり得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、核局在化シグナルと重複し得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、塩基性残基のストレッチを含み得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、アルギニン及びリジン残基中に豊富であり得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、核小体中に豊富に存在するタンパク質に由来し得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、リボソームＲＮＡ遺伝子座に豊富に存在するタンパク質に由来し得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、ｒＲＮＡに結合するタンパク質に由来し得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、ＭＳＰ５８に由来し得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、単節型モチーフであり得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、双節型モチーフであり得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、複数の単節型又は双節型モチーフからなり得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、単節型及び双節型モチーフの混合物からなり得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、二重の双節型モチーフであり得る。一部の実施形態では、核小体局在化モチーフは、ＫＲＡＳＳＱＡＬＧＴＩＰＫＲＲＳＳＳＲＦＩＫＲＫＫ（配列番号４０１７）であり得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、核内因子κＢ誘導キナーゼに由来し得る。一部の実施形態では、核小体局在化シグナルは、ＲＫＫＲＫＫＫモチーフ（配列番号４０１８）であり得る（Ｂｉｒｂａｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ，１１７（３６１５－３６２４），２００４に記載されている）。

【０２６５】

遺伝子組換えポリペプチド及びシステムの進化型変異体

一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドの進化型変異体を提供する。進化型変異体は、一部の実施形態では、参照遺伝子組換えポリペプチド、又はそこに含まれる断片若しくはドメインの１つを突然変異誘発させることにより生産することができる。一部の実施形態では、ドメイン（例えば、逆転写酵素ドメイン）の１つ又は複数が進化する。こうした進化型変異体ドメインの１つ又は複数は、一部の実施形態では、単独で、又は他のドメインと一緒に進化し得る。１つ又は複数の進化型変異体ドメインは、一部の実施形態では、非進化型コグネイト成分又はコグネイト成分の進化型変異体（例えば、平行若しくは連続様式で進化した可能性のあるもの）と組み合わされ得る。

【０２６６】

一部の実施形態では、参照遺伝子組換えポリペプチド、又はその断片若しくはドメインを突然変異誘発させるプロセスは、参照遺伝子組換えポリペプチド又はその断片若しくはドメインを突然変異誘発させることを含む。複数の実施形態では、突然変異誘発は、例えば、本明細書に記載されるように、漸進的進化方法（例えば、ＰＡＣＥ）又は非漸進的進化方法（例えば、ＰＡＮＣＥ）を含む。一部の実施形態では、進化型遺伝子組換えポリペプチド、又はその断片若しくはドメインは、参照遺伝子組換えポリペプチドのアミノ酸配列又はその断片若しくはドメインと比較して、そのアミノ酸配列に導入された１つ若しくは複数のアミノ酸変異を含む。複数の実施形態では、アミノ酸配列変異は、例として、例えば、コード配列内のいずれか特定の位置のコドンの変化を招く遺伝子組換えポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の変化、１つ若しくは複数のアミノ酸の欠失（例えば、短縮タンパク質）、１つ若しくは複数のアミノ酸の挿入、又はそれらの任意の組合せの結果として、参照遺伝子組換えポリペプチドのアミノ酸配列内に１つ若しくは複数の変異残基（例えば、保存的置換、非保存的置換、又はそれらの組合せ）を含み得る。進化型変異体遺伝子組換えポリペプチドは、遺伝子組換えポリペプチドの１つ又は複数の成分又はドメインにおける変異体（例えば、逆転写酵素ドメインに導入された変異体）を含み得る。

【０２６７】
いくつかの態様では、本開示は、遺伝子組換えポリペプチドの進化型変異体を用いる、又はそれを含む遺伝子組換えポリペプチド、システム、キット、及び方法を提供し、例えば、遺伝子組換えポリペプチドの進化型変異体、又はＰＡＣＥ若しくはＰＡＮＣＥにより生産若しくは生産可能な遺伝子組換えポリペプチドを使用する。複数の実施形態では、非進化型参照遺伝子組換えポリペプチドは、本明細書に開示される遺伝子組換えポリペプチドである。
【０２６８】
「ファージ支援連続進化（ＰＡＣＥ）」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、ウイルスベクターとしてファージを使用する漸進的進化を指す。ＰＡＣＥ技術の例は、例えば、２００９年９月８日に出願され、２０１０年３月１１日に国際公開第２０１０／０２８３４７号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＵＳ２００９／０５６１９４号明細書；２０１１年１２月２２日に出願され、２０１２年６月２８日に国際公開第２０１２／０８８３８１号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０６６７４７号明細書；２０１５年５月５日に発行された米国特許第９，０２３，５９４号明細書；２０１７年９月２６日に発行された米国特許第９，７７１，５７４号明細書；２０１６年７月１９日に発行された米国特許第９，３９４，５３７号明細書；２０１５年１月２０日に出願され、２０１５年９月１１日に国際公開第２０１５／１３４１２１号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０１２０２２号明細書；２０１９年１月１５日に発行された米国特許第１０，１７９，９１１号明細書；及び２０１６年４月１５日に出願され、２０１６年１０月２０日に国際公開第２０１６／１６８６３１号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０２７７９５号明細書に記載されており、これらは各々、その全体が、参照により本明細書に組み込まれる。
【０２６９】
「ファージ支援型非漸進的進化（ＰＡＮＣＥ）」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、ウイルスベクターとしてファージを使用する非漸進的進化を指す。ＰＡＮＣＥ技術の例は、例えば、Ｓｕｚｕｋｉ Ｔ．ｅｔ ａｌ，Ｃｒｙｓｔａｌ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ｒｅｖｅａｌ ａｎ ｅｌｕｓｉｖｅ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｄｏｍａｉｎ ｏｆ ｐｙｒｒｏｌｙｓｙｌ－ｔＲＮＡ ｓｙｎｔｈｅｔａｓｅ，Ｎａｔ Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ．１３（１２）：１２６１－１２６６（２０１７）に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。簡潔に述べると、ＰＡＮＣＥは、新鮮な宿主細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞）全体に、進化させようとする目的の遺伝子を含有する、進化選択ファージ（ＳＰ）の連続フラスコ移入を用いる迅速なインビボ指向性進化のための技術である。ＳＰに含まれる遺伝子が漸進的に進化する間、宿主細胞内部の遺伝子を一定に保持することができる。ファージ増殖の後、感染した細胞のアリコートを用いて、宿主大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）を含有する次のフラスコをトランスフェクトすることができる。このプロセスは、所望の表現型が、例えば、所望されるだけの数の移入について進化するまで、反復及び／又は継続することができる。
【０２７０】
ＰＡＣＥ及びＰＡＮＣＥを遺伝子組換えポリペプチドに適用する方法は、とりわけ、前述の参照文献を参照することにより、当業者により容易に理解されるであろう。例えば、ファージ粒子を用いて、例えば、宿主細胞の集団中に、ゲノム修飾タンパク質若しくはシステムの漸進的進化を指令するための更なる例示的な方法を適用して、遺伝子組換えポリペプチド、又はその断片又は若しくはサブドメインの進化型変異体を作製することができる。こうした方法の非限定的な例は、２００９年９月８日に出願され、２０１０年３月１１日に国際公開第２０１０／０２８３４７号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ２００９／０５６１９４号明細書；２０１１年１２月２２日に出願され、２０１２年６月２８日に国際公開第２０１２／０８８３８１号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ２０１１／０６６７４７号明細書；２０１５年

５月５日に発行された米国特許第９，０２３，５９４号明細書；２０１７年９月２６日に発行された米国特許第９，７７１，５７４号明細書；２０１６年７月１９日に発行された米国特許第９，３９４，５３７号明細書；２０１５年１月２０日に出願され、２０１５年９月１１日に国際公開第２０１５／１３４１２１号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０１２０２２号明細書；２０１９年１月１５日に発行された米国特許第１０，１７９，９１１号明細書；２０１９年６月１４日に出願され、２０１９年１月３１日に国際公開第２０１９／０２３６８０号パンフレットとして公開された、国際特許出願番号ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／３７２１６号明細書、２０１６年４月１５日に出願され、２０１６年１０月２０日に国際公開第２０１６／１６８６３１号パンフレットとして公開された、国際ＰＣＴ出願、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０２７７９５号明細書並びに２０１９年８月２３日に出願された国際出願、ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／４７９９６号明細書に記載されており、これらは各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２７１】

いくつかの非限定的な例示的実施形態では、進化型変異体遺伝子組換えポリペプチド、その断片若しくはドメインの進化方法は、（ａ）宿主細胞の集団を、目的の遺伝子を含むウイルスベクターの集団（出発遺伝子組換えポリペプチド又はその断片若しくはドメイン）と接触させるステップを含み、ここで、（１）宿主細胞は、ウイルスベクターによる感染に適しており；（２）宿主細胞は、ウイルス粒子の産生に必要なウイルス遺伝子を発現し；（３）感染性ウイルス粒子の産生に必要な少なくとも１つのウイルス遺伝子の発現が、目的の遺伝子の機能に依存しており；及び／又は（４）ウイルスベクターは、宿主細胞でのタンパク質の発現を可能にし、且つ宿主細胞により複製されて、ウイルス粒子中にパッケージングされ得る。一部の実施形態では、本方法は、（ｂ）変異速度を高める（例えば、変異プラスミド又は何らかのゲノム修飾－例えば、損傷ＤＮＡプルーフリーディングポリメラーゼ、ＳＯＳ遺伝子、例えば、ＵｍｕＣ、ＵｍｕＤ’及び／若しくはＲｅｃＡ（それらの突然変異は、プラスミドと結合すると、誘導性プロモータの制御下となり得る）を輸送することにより又はそれらの組合せで）突然変異を含む宿主細胞を用いて、変異原と宿主細胞を接触させることを含む。一部の実施形態では、本方法は、（ｃ）ウイルス複製及びウイルス粒子の産生を可能にする条件下で、宿主細胞の集団をインキュベートすることを含み、ここで、宿主細胞を、宿主細胞集団から除去し、新鮮で、非感染の宿主細胞を、宿主細胞の集団に導入し、このようにして、宿主細胞の集団を補給すると共に、宿主細胞の流れを形成する。一部の実施形態では、目的の遺伝子が突然変異を取得するのを可能にする条件下で細胞をインキュベートする。一部の実施形態では、本方法は、（ｄ）宿主細胞の集団から、進化した遺伝子産物（例えば、進化型変異体遺伝子組換えポリペプチド、又はその断片若しくはドメイン）をコードするウイルスベクターの変異バージョンを単離することを更に含む。

【０２７２】

当業者は、前述した枠組み内で使用可能な種々の特徴を理解するであろう。例えば、一部の実施形態では、ウイルスベクター又はファージは、繊維状ファージ、例えば、Ｍ１３ファージ、例えば、Ｍ１３選択ファージである。特定の実施形態では、感染性ウイルス粒子の産生に必要な遺伝子は、Ｍ１３遺伝子ＩＩＩ（ｇＩＩＩ）である。複数の実施形態では、ファージは、機能性ｇＩＩＩを欠失している場合があるが、代わりにｇＩ、ｇＩＩ、ｇＩＶ、ｇＶ、ｇＶＩ、ｇＶＩＩ、ｇＶＩＩＩ、ｇＩＸ、及びｇＸを含む。一部の実施形態では、感染性ＶＳＶ粒子の世代は、エンベロープタンパク質ＶＳＶ－Ｇを含む。様々な実施形態で、異なるレトロウイルスベクター、例えば、マウス白血病ウイルス（Ｍｕｒｉｎｅ　Ｌｅｕｋｅｍｉａ　Ｖｉｒｕｓ）ベクター、又はレンチウイルス（Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ）ベクターが使用され得る。複数の実施形態では、レトロウイルスベクターは、例えば、ウイルスのネイティブエンベロープタンパク質の代替物としてＶＳＶ－Ｇエンベロープタンパク質を用いて、効率的にパッケージングすることができる。

【０２７３】

一部の実施形態では、宿主細胞は、好適な数のウイルス生活環、例えば、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも１００、少なくとも２００、少なくとも３００、少なくとも４００、少なくとも、５００、少なくとも６００、少なくとも７００、少なくとも８００、少なくとも９００、少なくとも１０００、少なくとも１２５０、少なくとも１５００、少なくとも１７５０、少なくとも２０００、少なくとも２５００、少なくとも３０００、少なくとも４０００、少なくとも５０００、少なくとも７５００、少なくとも１００００、又はそれ以上の連続したウイルス生活環に応じてインキュベートされ、ここで、Ｍ１３ファージの例示的且つ非限定的な例は、ウイルス生活環毎に１０～２０分である。同様に、宿主細胞が、宿主細胞の集団中に滞留する時間（例えば、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０、約２１、約２２、約２３、約２４、約２５、約３０、約３５、約４０、約４５、約５０、約５５、約６０、約７０、約８０、約９０、約１００、約１２０、約１５０、又は約１８０分）を調整するために、条件を調節することができる。宿主細胞集団は、宿主細胞の密度、又は一部の実施形態では、流入中の宿主細胞密度、例えば、10^3個の細胞／ｍｌ、約10^4個の細胞／ｍｌ、約10^5個の細胞／ｍｌ、約５～10^5個の細胞／ｍｌ、約10^6個の細胞／ｍｌ、約５～10^6個の細胞／ｍｌ、約10^7個の細胞／ｍｌ、約５～10^7個の細胞／ｍｌ、約10^8個の細胞／ｍｌ、約５～10^8個の細胞／ｍｌ、約10^9個の細胞／ｍｌ、約５～10^9個の細胞／ｍｌ、約10^{10}個の細胞／ｍｌ、又は約５～10^{10}個の細胞／ｍｌにより、一部を制御することができる。

【０２７４】

インテイン

一部の実施形態では、以下により詳細に記載されるように、インテイン－Ｎ（ｉｎｔＮ）ドメインは、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドの第１ドメインのＮ末端部分に融合され得、インテイン－Ｃ（ｉｎｔＣ）ドメインは、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチドの第２のドメインのＣ末端部分に融合されて、Ｎ末端部分をＣ末端部分に連結し、それにより、第１ドメインと第２のドメインを連結し得る。一部の実施形態では、第１及び第２のドメインは、各々独立して、ＤＮＡ結合ドメイン、ＲＮＡ結合ドメイン、ＲＴドメイン、及びエンドヌクレアーゼドメインから選択される。

【０２７５】

インテインは、例えば、フランキングするＮ末端及びＣ末端エクステイン（例えば、連結しようとする断片）を連結する、自己スプライシングタンパク質イントロン（例えば、ペプチド）として存在し得る。インテインは、いくつかの事例では、自動的に切除されて、タンパク質スプライシングとして知られるプロセスで、残りの断片（エクステイン）をペプチド結合と連結させることができるタンパク質の断片を含み得る。インテインは、「タンパク質イントロン」とも呼ばれる。自動的に切除されて、タンパク質の残り部分を連結させるインテインのプロセスは、本明細書において、「タンパク質スプライシング」又は「インテイン媒介性タンパク質スプライシング」と呼ばれる。

【０２７６】

一部の実施形態では、前駆体タンパク質（インテイン媒介性タンパク質スプライシング前のインテイン含有タンパク質）のインテインは、２つの遺伝子に由来する。こうしたインテインは、本明細書において、スプリットインテイン（例えば、スプリットインテイン－Ｎ及びスプリットインテイン－Ｃ）と呼ばれる。従って、インテインベースの手法が、第１のポリペプチド配列及び第２のポリペプチド配列を一緒に連結するのに使用され得る。例えば、シアノバクテリア（ｃｙａｎｏｂａｃｔｅｒｉａ）では、ＤＮＡポリメラーゼＩＩＩの触媒サブユニットであるＤｎａＥは、２つの個別の遺伝子、ｄｎａＥ－ｎ及びｄｎａＥ－ｃによってコードされる。ｄｎａＥ－ｎ遺伝子によってコードされるものなどのインテイン－Ｎドメインは、第１のポリペプチド配列の一部として位置する場合、第１のポリペプチド配列を第２のポリペプチド配列と連結し得、ここで、第２のポリペプチド配列は、ｄｎａＥ－ｃ遺伝子によってコードされるものなどのインテイン－Ｃドメインを含

む。従って、一部の実施形態では、タンパク質は、第１及び第２のポリペプチド配列をコードする核酸（例えば、第１の核酸分子は、第１のポリペプチド配列をコードし、第２の核酸分子は、第２のポリペプチド配列をコードする）を提供することによって作製され得、核酸は、第１及び第２のポリペプチド配列の生成、及びインテインベースの機構を介した、第１のポリペプチド配列の、第２のポリペプチド配列への連結を可能にする条件下で細胞内に導入される。

【０２７７】

異種タンパク質断片を連結するためのインテインの使用は、例えば、Ｗｏｏｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８９（２１）；１４５１２－９（２０１４）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。例えば、個別のタンパク質断片に融合されると、インテインＩｎｔＮ及びＩｎｔＣは、互いを認識し、それ自体からスプライシングして、且つ／又は同時に、それらが融合されているタンパク質断片のフランキングするＮ－及びＣ末端エクステインを連結し、それにより、２つのタンパク質断片から完全長タンパク質を再構成することができる。

【０２７８】

一部の実施形態では、ｄｎａＥインテイン、Ｃｆａ－Ｎ（例えば、スプリットインテイン－Ｎ）及びＣｆａ－Ｃ（例えば、スプリットインテイン－Ｃ）インテイン対に基づく合成インテインを使用する。こうしたインテインの例は、例えば、Ｓｔｅｖｅｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ．２０１６ Ｆｅｂ．２４；１３８（７）：２１６２－５（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。本開示に従って使用することができるインテイン対の非限定的な例として、Ｃｆａ ＤｎａＥインテイン、Ｓｓｐ ＧｙｒＢインテイン、Ｓｓｐ ＤｎａＸインテイン、Ｔｅｒ ＤｎａＥ３インテイン、Ｔｅｒ ＴｈｙＸインテイン、Ｒｍａ ＤｎａＢインテイン及びＣｎｅ Ｐｒｐ８インテイン（例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，３９４，６０４号明細書に記載されるような）が挙げられる。

【０２７９】

スプリットＣａｓ９に関わる一部の実施形態では、インテイン－Ｎドメイン及びインテイン－Ｃドメインは、スプリットＣａｓ９のＮ末端部分とスプリットＣａｓ９のＣ末端部分との連結のために、スプリットＣａｓ９のＮ末端部分及びスプリットＣａｓ９のＣ末端部分にそれぞれ融合し得る。例えば、一部の実施形態では、インテイン－Ｎを、スプリットＣａｓ９のＮ末端部分のＣ末端に融合させ、すなわち、Ｎ－［スプリットＣａｓ９のＮ末端部分］－［インテイン－Ｎ］－Ｃの構造を形成する。一部の実施形態では、インテイン－ＣをスプリットＣａｓ９のＣ末端部分のＮ末端に融合させ、すなわち、Ｎ－［インテイン－Ｃ］－［スプリットＣａｓ９のＣ末端部分］－Ｃの構造を形成する。インテインが連結したタンパク質（例えば、スプリットＣａｓ９）を連結させるためのインテイン媒介性タンパク質スプライシングの機構は、Ｓｈａｈ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍ Ｓｃｉ．２０１４；５（ｌ）：４４６－４６ｌ（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。インテインを設計及び使用する方法は、当技術分野において公知であり、例えば、国際公開第２０２００５１５６１号パンフレット、国際公開第２０１４００４３３６号パンフレット、国際公開第２０１７１３２５８０号パンフレット、米国特許出願公開第２０１５０３４４５４９号明細書、及び米国特許出願公開第２０１８０１２７７８０号明細書（それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０２８０】

一部の実施形態では、スプリットは、２つ以上の断片への分割を指す。一部の実施形態では、スプリットＣａｓ９タンパク質又はスプリットＣａｓ９は、２つの個別のヌクレオチド配列によりコードされるＮ末端断片及びＣ末端断片として提供されるＣａｓ９タンパク質を含む。Ｃａｓ９タンパク質のＮ末端部分及びＣ末端部分に対応するポリペプチドはスプライシングされて、再構成Ｃａｓ９タンパク質を形成し得る。実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、例えば、Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，Ｖｏｌｕｍｅ １５６，Ｉｓｓｕｅ ５，ｐｐ．９３５－９４９，２０１４に記載されているか、又はＪ

ｉａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）Ｓｃｉｅｎｃｅ　３５１：８６７－８７１及びＰＤＢ　ｆｉｌｅ：５Ｆ９Ｒに記載されている（それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）ように、タンパク質の変性領域内で２つの断片に分割される。変性領域は、当技術分野で公知の１つ又は複数のタンパク質構造決定技術により決定することができ、そうしたものとして、限定はしないが、Ｘ線結晶構造解析、ＮＭＲ分光法、電子顕微鏡法（例えば、ｃｒｙｏＥＭ）、及び／又はインシリコタンパク質モデル化が挙げられる。一部の実施形態では、タンパク質は、例えば、アミノ酸Ａ２９２－Ｇ３６４、Ｆ４４５－Ｋ４８３若しくはＥ５６５－Ｔ６３７間のＳｐＣａｓ９の領域内の任意のＣ、Ｔ、Ａ若しくはＳ又はいずれか他のＣａｓ９、Ｃａｓ９変異体（例えば、ｎＣａｓ９、ｄＣａｓ９）或いは他のｎａｐＤＮＡｂｐ内の対応する位置で２つの断片に分割される。一部の実施形態では、タンパク質は、ＳｐＣａｓ９　Ｔ３１０、Ｔ３１３、Ａ４５６、Ｓ４６９、又はＣ５７４で２つの断片に分割される。一部の実施形態では、タンパク質を２つの断片に分割するプロセスは、タンパク質の分断と呼ばれる。

【０２８１】

一部の実施形態では、タンパク質断片は、長さが約２～１０００アミノ酸（例えば、２～１０、１０～５０、５０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００又は９００～１０００アミノ酸）の範囲である。一部の実施形態では、タンパク質断片は、長さが約５～５００アミノ酸（例えば、５～１０、１０～５０、５０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００又は４００～５００アミノ酸）の範囲である。一部の実施形態では、タンパク質断片は、長さが約２０～２００アミノ酸（例えば、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～１００又は１００～２００アミノ酸）の範囲である。

【０２８２】

一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドの部分又は断片をインテインと融合させる。ヌクレアーゼをインテインのＮ末端又はＣ末端と融合させることができる。一部の実施形態では、融合タンパク質の部分又は断片をインテインと融合させると共に、ＡＡＶカプシドタンパク質と融合させる。インテイン、ヌクレアーゼ及びカプシドタンパク質を、任意の配置（例えば、ヌクレアーゼ－インテイン－カプシド、インテイン－ヌクレアーゼ－カプシド、カプシド－インテイン－ヌクレアーゼなど）で一緒に融合させることができる。一部の実施形態では、インテインのＮ末端を融合タンパク質のＣ末端と融合させ、インテインのＣ末端をＡＡＶカプシドタンパク質のＮ末端と融合させる。

【０２８３】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼドメイン（例えば、ニッカーゼＣａｓ９ドメイン）がインテイン－Ｎに融合され、ＲＴドメインを含むポリペプチドがインテイン－Ｃに融合される。

【０２８４】

インテイン－Ｎドメイン及び同等のインテイン－Ｃドメインの例示的なヌクレオチド及びアミノ酸配列を以下に記載する。

ＤｎａＥインテイン－Ｎ　ＤＮＡ：

【化８】

TGCCTGTCATACGAAACCGAGATACTGACAGTAGAATATGGCCTTCTGCCAATCGGG
AAGATTGTGGAGAAACGGATAGAATGCACAGTTTACTCTGTCGATAACAATGGTAA
CATTTATACTCAGCCAGTTGCCCAGTGGCACGACCGGGGAGAGCAGGAAGTATTCG
AATACTGTCTGGAGGATGGAAGTCTCATTAGGGCCACTAAGGACCACAAATTTATG
ACAGTCGATGGCCAGATGCTGCCTATAGACGAAATCTTTGAGCGAGAGTTGGACCTC
ATGCGAGTTGACAACCTTCCTAAT (配列番号 : 4029)

ＤｎａＥインテイン－Ｎタンパク質：

ＣＬＳＹＥＴＥＩＬＴＶＥＹＧＬＬＰＩＧＫＩＶＥＫＲＩＥＣＴＶＹＳＶＤＮＮＧＮＩＹ
ＴＱＰＶＡＱＷＨＤＲＧＥＱＥＶＦＥＹＣＬＥＤＧＳＬＩＲＡＴＫＤＨＫＦＭＴＶＤＧＱ

ＭＬＰＩＤＥＩＦＥＲＥＬＤＬＭＲＶＤＮＬＰＮ（配列番号４０３０）
ＤｎａＥインテイン－Ｃ　ＤＮＡ：
ＡＴＧＡＴＣＡＡＧＡＴＡＧＣＴＡＣＡＡＧＧＡＡＧＴＡＴＣＴＴＧＧＣＡＡＡＣＡＡＡ
ＡＣＧＴＴＴＡＴＧＡＴＡＴＴＧＧＡＧＴＣＧＡＡＡＧＡＧＡＴＣＡＣＡＡＣＴＴＴＧＣ
ＴＣＴＧＡＡＧＡＡＣＧＧＡＴＴＣＡＴＡＧＣＴＴＣＴＡＡＴ（配列番号４０３１）
ＤｎａＥインテイン－Ｃタンパク質：
ＭＩＫＩＡＴＲＫＹＬＧＫＱＮＶＹＤＩＧＶＥＲＤＨＮＦＡＬＫＮＧＦＩＡＳＮ（配列番号４０３２）
Ｃｆａ－Ｎ　ＤＮＡ：
【化９】

TGCCTGTCTTATGATACCGAGATACTTACCGTTGAATATGGCTTCTTGCCTATTGGAA
AGATTGTCGAAGAGAGAATTGAATGCACAGTATATACTGTAGACAAGAATGGTTTC
GTTTACACACAGCCCATTGCTCAATGGCACAATCGCGGCGAACAAGAAGTATTTGA
GTACTGTCTCGAGGATGGAAGCATCATACGAGCAACTAAAGATCATAAATTCATGA
CCACTGACGGGCAGATGTTGCCAATAGATGAGATATTCGAGCGGGGCTTGGATCTC
AAACAAGTGGATGGATTG CCA (配列番号 : 4033)

Ｃｆａ－Ｎタンパク質：
ＣＬＳＹＤＴＥＩＬＴＶＥＹＧＦＬＰＩＧＫＩＶＥＥＲＩＥＣＴＶＹＴＶＤＫＮＧＦＶＹ
ＴＱＰＩＡＱＷＨＮＲＧＥＱＥＶＦＥＹＣＬＥＤＧＳＩＩＲＡＴＫＤＨＫＦＭＴＴＤＧＱ
ＭＬＰＩＤＥＩＦＥＲＧＬＤＬＫＱＶＤＧＬＰ（配列番号４０３４）
Ｃｆａ－Ｃ　ＤＮＡ：
【化１０】

ATGAAGAGGACTGCCGATGGATCAGAGTTTGAATCTCCCAAGAAGAAGAGGAAAGT
AAAGATAATATCTCGAAAAAGTCTTGGTACCCAAAATGTCTATGATATTGGAGTGGA
GAAAGATCACAACTTCCTTCTCAAGAACGGTCTCGTAGCCAGCAAC (配列番号 :
4035)

Ｃｆａ－Ｃタンパク質：
ＭＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＲＫＶＫＩＩＳＲＫＳＬＧＴＱＮＶＹＤＩＧＶＥＫＤ
ＨＮＦＬＬＫＮＧＬＶＡＳＮ（配列番号４０３６）
【０２８５】
更なるドメイン：
遺伝子組換えポリペプチドは、標的ＤＮＡ配列及び鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）に結合し、標的部位に切れ目を入れ、鋳型をＤＮＡに書き込み（例えば、逆転写し）、標的部位の修飾をもたらし得る。一部の実施形態では、プロセスの効率を増強するため、更なるドメインがポリペプチドに付加され得る。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、逆転写されたＤＮＡを標的部位のＤＮＡに連結するため、更なるＤＮＡライゲーションドメインを含み得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、異種ＲＮＡ結合ドメインを含み得る。一部の実施形態では、ポリペプチドは、５’から３’にかけてのエキソヌクレアーゼ活性を有するドメインを含み得る（例えば、ここで５’から３’にかけてのエキソヌクレアーゼ活性は、例えば、元のゲノム配列にわたる改変を意図して、標的部位の改変の修復を増強する）。一部の実施形態では、ポリペプチドは、３’から５’にかけてのエキソヌクレアーゼ活性、例えば、プルーフリーディング活性を有するドメインを含み得る。一部の実施形態では、ライティングドメイン、例えばＲＴドメインは、３’から５’にかけてのエキソヌクレアーゼ活性、例えば、プルーフリーディング活性を有する。
【０２８６】
鋳型核酸
本明細書に記載の遺伝子組換えシステムは、鋳型核酸配列を使用し、宿主標的ＤＮＡ部位を修飾することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の遺伝子組換えシステムは、ターゲットプライム逆転写（ＴＰＲＴ）により、ＲＮＡ配列鋳型を宿主標的ＤＮＡ部位に転写する。遺伝子組換えシステムは、ＲＮＡ配列鋳型の逆転写を介してＤＮＡ配列

を宿主ゲノムに直接的に組み換えることにより、（例えば、ＣＲＩＳＰＲシステムと異なり）外因性ＤＮＡ配列を宿主細胞に導入する必要なく、目的配列を標的ゲノムに挿入できるとともに、外因性ＤＮＡ挿入ステップを除くことができる。遺伝子組換えシステムは、標的ゲノムから配列を欠失させるか、又は目的配列を用いて置換を導入することもできる。従って、遺伝子組換えシステムは、目的配列、例えば、異種遺伝子コーディング及び／又は機能情報を含む配列を含む、カスタマイズされたＲＮＡ配列鋳型の使用のためのプラットフォームを提供する。

【０２８７】

一部の実施形態では、鋳型核酸は、遺伝子組換えポリペプチドに結合する１つ又は複数の配列（例えば、２つの配列）を含む。

【０２８８】

一部の実施形態では、鋳型核酸は、同じ鎖中のリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチド残基の両方を有するハイブリッドを含む。

【０２８９】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステム又は方法は、単一の鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステム又は方法は、複数の鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）を含む。例えば、本明細書に記載されるシステムは、（例えば、５’から３’にかけて）遺伝子組換えポリペプチド（例えば、ＤＮＡ結合ドメイン及び／又はエンドヌクレアーゼドメイン、例えば、ｇＲＮＡ）に結合する配列及び標的部位（例えば、標的ゲノム中のある部位の第２の鎖）に結合する配列を含む第１のＲＮＡ並びに（例えば、５’から３’にかけて）任意選択で、遺伝子組換えポリペプチドに結合する（例えば、ＲＴドメインに特異的に結合する）配列、異種目的配列及びＰＢＳ配列を含む第２のＲＮＡ（例えば、鋳型ＲＮＡ）を含む。一部の実施形態では、システムが複数の核酸を含む場合、各核酸は、コンジュゲートドメインを含む。一部の実施形態では、コンジュゲートドメインは、例えば、相補的配列のハイブリダイゼーションにより、核酸分子の会合を可能にする。例えば、一部の実施形態では、第１のＲＮＡは、第１のコンジュゲートドメインを含み、第２のＲＮＡは、第２のコンジュゲートドメインを含み、且つ第１及び第２のコンジュゲートドメインは、例えば、ストリンジェントな条件下で、互いにハイブリダイズすることが可能である。一部の実施形態では、ハイブリダイゼーションにおけるストリンジェントな条件は、約６５℃、４倍塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中でのハイブリダイゼーションと、それに続く、約６５℃、１×ＳＳＣでの洗浄とを含む。

【０２９０】

一部の実施形態では、鋳型核酸は、ＲＮＡを含む。一部の実施形態では、鋳型核酸は、ＤＮＡ（例えば、一本鎖又は二本鎖ＤＮＡ）を含む。一部の実施形態では、鋳型核酸は、同じ鎖中のリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチド残基の両方を有するハイブリッドを含む。

【０２９１】

一部の実施形態では、鋳型核酸は、標的配列に対して相同性を有する１つ又は複数（例えば、２つ）の相同性ドメインを含む。一部の実施形態では、相同性ドメインは、約１０～２０、２０～５０、又は５０～１００ヌクレオチド長である。

【０２９２】

一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、例えば、遺伝子組換えポリペプチドを目的の標的部位に導くためのｇＲＮＡ配列を含み得る。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、（例えば、５’から３’にかけて）（ｉ）任意選択で、標的部位（例えば、標的ゲノム中のある部位の第２の鎖）に結合するｇＲＮＡスペーサー、（ｉｉ）任意選択で、本明細書に記載されるポリペプチド（例えば、遺伝子組換えポリペプチド又はＣａｓポリペプチド）に結合するｇＲＮＡスカフォールド、（ｉｉｉ）突然変異領域を含む異種目的配列（任意選択で、異種目的配列は、５’から３’にかけて、第１の相同性領域、突然変異領域、及び第２の相同性領域を含む）、並びに（ｉｖ）３’標的相同性ドメインを含むプライマー結合部位

（ＰＢＳ）配列を含む。

【０２９３】

本明細書に記載されるゲノム編集システムの鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）成分は、典型的に、システムの遺伝子組換えポリペプチドに結合可能である。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、遺伝子組換えポリペプチドに結合可能である３’領域を有する。結合領域、例えば、３’領域は、システムの遺伝子組換えポリペプチドに結合可能である、例えば、少なくとも１、２又は３つのヘアピンループを有する構造化ＲＮＡ領域であり得る。結合領域は、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）をポリペプチドモジュールのいずれかと会合させ得る。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の結合領域は、ポリペプチド中のＲＮＡ結合ドメインと会合し得る。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の結合領域は、遺伝子組換えポリペプチドの逆転写ドメインと会合し（例えば、ＲＴドメインに特異的に結合し）得る。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、ポリペプチドのＤＮＡ結合ドメインと会合し得、例えば、ｇＲＮＡは、Ｃａｓ９由来のＤＮＡ結合ドメインと会合する。一部の実施形態では、結合領域は、ＤＮＡ標的認識も提供し得、例えば、ｇＲＮＡは、標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズし、且つポリペプチド、例えばＣａｓ９ドメインに結合する。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、ポリペプチドの複数の成分、例えばＤＮＡ結合ドメイン及び逆転写ドメインと会合し得る。

【０２９４】

一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、３’末端にポリＡテールを有する。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、３’末端にポリＡテールを有しない。

【０２９５】

一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、（例えば、エクスビボ又はインビボで、例えば、対象内の、例えば標的組織又は臓器内の）標的細胞のゲノムＤＮＡ中の所与の突然変異を修正するためにカスタマイズされ得る。例えば、突然変異は、野生型配列に対する疾患関連突然変異であり得る。特定の理論に束縛されることを意図しないが、任意の所与の標的部位及び編集は、ある範囲の編集効率及び忠実度をもたらす遺伝子組換えシステムにおける使用のために多数の可能な鋳型ＲＮＡ分子を有するであろう。このスクリーニング負荷を部分的に減少させるために、経験的パラメータセットは、鋳型ＲＮＡ又はその一部の最適な初期インシリコ設計を確保するのに役立つ。非限定的な実例として、選択された突然変異について、以下の設計パラメータが利用され得る。一部の実施形態では、設計は、標的領域として機能するように、突然変異のいずれかの側に、約５００ｂｐ（例えば、最大で５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０若しくは７００ｂｐ、及び任意選択で少なくとも２０、３０、４０、５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００若しくは６５０ｂｐ）の隣接配列を得ることによって開始される。一部の実施形態では、鋳型核酸は、ｇＲＮＡを含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、標的部位に結合する配列（例えば、ＣＲＩＳＰＲスペーサー）を含む。一部の実施形態では、鋳型核酸の標的領域に対する標的化における使用のための標的部位に結合する配列（例えば、ＣＲＩＳＰＲスペーサー）は、特定の遺伝子組換えポリペプチド（例えば、エンドヌクレアーゼドメイン又はライティングドメイン、例えばＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含む）の使用（例えば、Ｃａｓ９の場合、２０ヌクレオチドｇＲＮＡ結合領域のすぐ３’側のＮＧＧのプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ））を検討することによって選択される。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲスペーサーは、最初に、ＰＡＭが遺伝子組換えシステム誘導編集によって破壊されることになるか否かによる順序付けによって選択される。一部の実施形態では、ＰＡＭの破壊は、編集効率を増加させ得る。一部の実施形態では、ＰＡＭは、遺伝子組換え中、（例えば、ゲノムＤＮＡ中の標的部位に対する別の修飾の一部として又はそれに加えて）サイレント突然変異（例えば、いくらかであっても、標的核酸配列によってコードされるアミノ酸残基を改変しない突然変異）を標的部位に導入することによっても破壊され得る。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲスペーサーは、配

列の、それらの所望の編集位置に対応するゲノム部位の近接による順序付けによって選択される。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ｇＲＮＡスカフォールドを含む。一部の実施形態では、使用されるｇＲＮＡスカフォールドは、標準のスカフォールド（例えば、Ｃａｓ９の場合、５’－ＧＴＴＴＴＡＧＡＧＣＴＡＧＡＡＡＴＡＧＣＡＡＧＴＴＡＡＡＡＴＡＡＧＧＣＴＡＧＴＣＣＧＴＴＡＴＣＡＡＣＴＴＧＡＡＡＡＡＧＴＧＧＣＡＣＣＧＡＧＴＣＧＧＴＧＣ－３’（配列番号４５９５））であり得るか、又は１つ又は複数のヌクレオチド置換を含み得る。一部の実施形態では、異種目的配列は、少なくとも９０％の同一性、例えば、少なくとも９０％、９５％、９８％、９９％若しくは１００％の同一性を有し、又は遺伝子組換えによって標的部位に書き込まれ得る任意の挿入、置換若しくは欠失を除いて、第１の鎖ニックの３’側の標的部位に対して非同一性の、１、２、３、４若しくは５つ以下の位置（例えば、第１の鎖ニックのすぐ３’側、又は第１の鎖ニックの３’側の最大で１、２、３、４若しくは５ヌクレオチド）を含む。一部の実施形態では、３’標的相同性ドメインは、少なくとも９０％の同一性、例えば、少なくとも９０％、９５％、９８％、９９％若しくは１００％の同一性を有し、又は第１の鎖ニックの５’側の標的部位に対して非同一性の、１、２、３、４若しくは５つ以下の位置（例えば、第１の鎖ニックのすぐ５’側、又は第１の鎖ニックの３’側の最大で１、２、３、４若しくは５ヌクレオチド）を含む。

【０２９６】

一部の実施形態では、鋳型核酸は、鋳型ＲＮＡである。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、１つ又は複数の修飾ヌクレオチドを含む。例えば、一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、１つ又は複数のデオキシリボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡの領域は、例えば、分子の安定性を増強するため、ＤＮＡヌクレオチドで置換される。例えば、鋳型の３’末端は、ＤＮＡヌクレオチドを含み得る一方、鋳型の残り部分は、逆転写され得るＲＮＡヌクレオチドを含む。例えば、一部の実施形態では、異種目的配列は、主に又は全体的に、ＲＮＡヌクレオチド（例えば、少なくとも９０％、９５％、９８％若しくは９９％のＲＮＡヌクレオチド）から構成される。一部の実施形態では、ＰＢＳ配列は、主に又は全体的に、ＤＮＡヌクレオチド（例えば、少なくとも９０％、９５％、９８％若しくは９９％のＤＮＡヌクレオチド）から構成される。他の実施形態では、ゲノムへのライティングのための異種目的配列は、ＤＮＡヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、鋳型中のＤＮＡヌクレオチドは、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性の能力があるドメインによってゲノム中に複製される。一部の実施形態では、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性は、ポリペプチド中のＤＮＡポリメラーゼドメインによって提供される。一部の実施形態では、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性は、ＤＮＡ依存性ＤＮＡ重合、例えば、第２の鎖合成の能力もある逆転写酵素ドメインによって提供される。一部の実施形態では、鋳型分子は、ＤＮＡヌクレオチドのみで構成される。一部の実施形態では、鋳型核酸は、同じ鎖中のリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチド残基の両方を有するハイブリッドを含む。

【０２９７】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステムは、本明細書に記載される鋳型ＲＮＡの配列を共に含む２つの核酸を含む。一部の実施形態では、２つの核酸は、非共有結合的に互いに会合し、例えば、直接互いに会合し（例えば、塩基対合によって）、又は１つ又は複数の更なる分子を含む複合体の一部として間接的に会合する。

【０２９８】

本明細書に記載される鋳型ＲＮＡは、５’から３’にかけて：（１）ｇＲＮＡスペーサー；（２）ｇＲＮＡスカフォールド；（３）異種目的配列（４）プライマー結合部位（ＰＢＳ）配列を含み得る。これらの成分のそれぞれが、ここでより詳細に記載される。

【０２９９】

ｇＲＮＡスペーサー及びｇＲＮＡスカフォールド

本明細書に記載される鋳型ＲＮＡは、遺伝子組換えシステムを標的核酸に導くｇＲＮＡスペーサー、及び鋳型ＲＮＡと遺伝子組換えポリペプチドのＣａｓドメインとの会合を促

進するｇＲＮＡスカフォールドを含み得る。本明細書に記載されるシステムは、鋳型核酸の一部でないｇＲＮＡも含み得る。例えば、ｇＲＮＡスペーサー及びｇＲＮＡスカフォールドを含むが、異種目的配列又はＰＢＳ配列を含まないｇＲＮＡが使用されて、例えば、例えば本明細書において「第２の鎖ニッキング（Ｓｅｃｏｎｄ Ｓｔｒａｎｄ Ｎｉｃｋｉｎｇ）」という表題の節に記載されるように、第２の鎖ニッキングを誘導し得る。

【０３００】

一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質の結合に関与するスカフォールド配列と、ゲノム標的に対するユーザ定義の約２０ヌクレオチドの標的配列から構成される短い合成ＲＮＡである。完全ｇＲＮＡの構造は、Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ １５６，Ｐ９３５－９４９（２０１４）に記載された。ｇＲＮＡ（単一ガイドＲＮＡに対するｓｇＲＮＡとも称される）は、人工的テトラループで接続されたｃｒＲＮＡ由来及びｔｒａｃｒＲＮＡ由来の配列からなる。ｃｒＲＮＡ配列は、ガイド（２０ｎｔ）及びリピート（１２ｎｔ）領域に分割され得る一方、ｔｒａｃｒＲＮＡ配列は、アンチリピート（１４ｎｔ）及び３つのｔｒａｃｒＲＮＡステムループに分割され得る（Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ １５６，Ｐ９３５－９４９（２０１４））。実際、ガイドＲＮＡ配列は、一般に、１７～２４のヌクレオチド（例えば、１９、２０若しくは２１ヌクレオチド）の長さを有し、且つ標的核酸配列に対して相補的であるように設計される。カスタムｇＲＮＡのジェネレーター及びアルゴリズムは、有効なガイドＲＮＡの設計における使用のため、商業的に利用可能である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、天然ＣＲＩＳＰＲシステムからの２つのＲＮＡ成分、例えばｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡを含む。当技術分野で周知のように、ｇＲＮＡは、ｔｒａｃｒＲＮＡ（ヌクレアーゼに結合するため）及び少なくとも１つのｃｒＲＮＡ（ヌクレアーゼを編集／結合について標的化された配列に導くため）の両方からの配列を含むキメラの単一ＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）も含み得る。化学修飾ｓｇＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質での使用に有効であることも証明されており；例えば、Ｈｅｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ．（２０１５）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，９８５－９９１を参照されたい。一部の実施形態では、ｇＲＮＡスペーサーは、標的遺伝子と会合されるＤＮＡ配列に対して相補的である核酸配列を含む。

【０３０１】

一部の実施形態では、ｇＲＮＡを含む鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡの領域は、（例えば、Ｍｕｌｅｐａｔｉ ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ １９ Ｓｅｐ ２０１４：Ｖｏｌ．３４５，Ｉｓｓｕｅ ６２０３，ｐｐ．１４７９－１４８４に記載のように）標的ＤＮＡに結合したｇＲＮＡのアンダーワウンドリボン様構造をとる。特定の理論に束縛されることを意図しないが、この非標準構造は、ＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッドからの６ヌクレオチドごとの回転によって促進されると考えられる。従って、一部の実施形態では、ｇＲＮＡを含む鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡの領域は、いくらかの間隔で、例えば、６塩基ごとの、標的部位とのミスマッチの増加を許容し得る。一部の実施形態では、標的部位に対する相同性を含むｇＲＮＡを含む鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡの領域は、規則的間隔で、例えば、６塩基ごとに、標的部位と塩基対合する必要がないようなゆらぎ位置を有し得る。

【０３０２】

一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、例えば、遺伝子組換えポリペプチド（表３）のＣａｓ９ドメインに適切な長さのｇＲＮＡスペーサー配列を含む、例えば、５’末端において、標的部位に対して少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９９％若しくは１００％の相同性の少なくとも１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３若しくは２４の塩基を有する。

【０３０３】

一部の実施形態では、強化された活性を有するＣａｓ９誘導体が、遺伝子組換えポリペプチドにおいて使用され得る。一部の実施形態では、Ｃａｓ９誘導体は、ＨＮＨエンドヌクレアーゼドメイン、例えば、ＳｐｙＣａｓ９ Ｒ２２１Ｋ、Ｎ３９４Ｋの活性を改善す

る突然変異若しくはＲ－ループ形成、例えば、ＳｐｙＣａｓ９　Ｌ１２４５Ｖを改善する突然変異を含み得るか、又はこのような突然変異の組合せ、例えば、ＳｐｙＣａｓ９　Ｒ２２１Ｋ／Ｎ３９４Ｋ、ＳｐｙＣａｓ９　Ｎ３９４Ｋ／Ｌ１２４５Ｖ、ＳｐｙＣａｓ９　Ｒ２２１Ｋ／Ｌ１２４５Ｖ若しくはＳｐｙＣａｓ９　Ｒ２２１Ｋ／Ｎ３９４Ｋ／Ｌ１２４５Ｖを含み得る（例えば、Ｓｐｅｎｃｅｒ　ａｎｄ　Ｚｈａｎｇ　Ｓｃｉ　Ｒｅｐ　７：１６８３６（２０１７）を参照、Ｃａｓ９誘導体及びそれに含まれる突然変異が、参照により本明細書に組み込まれる）。一部の実施形態では、Ｃａｓ９誘導体は、１つ又は複数のタイプの本明細書に記載される突然変異、例えば、ＰＡＭ修飾突然変異、タンパク質安定化突然変異、活性強化突然変異、及び／又は親酵素（例えば、標的ＤＮＡの一方又は両方の鎖に対するエンドヌクレアーゼ活性をなくす１つ又は複数の突然変異、例えば、ニッカーゼ又は触媒的に不活性な酵素）と比べて１つ若しくは２つのエンドヌクレアーゼドメインを部分的に若しくは完全に不活性化する突然変異を含み得る。一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステムにおいて使用されるＣａｓ９酵素は、触媒効率を改善する突然変異（例えば、ＳｐｙＣａｓ９　Ｒ２２１Ｋ、Ｎ３９４Ｋ、及び／又はＬ１２４５Ｖ）に加えて、酵素に対するニッカーゼ活性を付与する突然変異（例えば、ＳｐｙＣａｓ９　Ｎ８６３Ａ又はＨ８４０Ａ）を含み得る。一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステムにおいて使用されるＣａｓ９酵素は、触媒効率を改善するＲ２２１Ｋ及びＮ３９４Ｋ突然変異に加えて、ニッカーゼ活性を付与するＮ８６３Ａ突然変異を更に含むＳｐｙＣａｓ９酵素又は誘導体である。

【０３０４】

表８は、ｇＲＮＡ及び／又は鋳型ＲＮＡを設計するための成分を定義し、遺伝子組換えについての表３に列記されるＣａｓ変異体を適用するためのパラメータを提供する。切断部位は、検証又は予測されたプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の要件、（ＰＡＭ部位の最も上流の塩基に対する）検証又は予測された切断部位の位置を示す。所与の酵素に対するｇＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ、テトラループ、及びｔｒａｃｒＲＮＡ配列を連結し、標的部位でプロトスペーサーに一致するスペーサー（最小）及びスペーサー（最大）以内の長さの５’スペーサーを更に付加することによって構築され得る。更に、標的でのｓｓＤＮＡニックの予測された位置は、標的プライミング逆転写を開始させるため、ニックのすぐ５’側の配列にアニールし得る鋳型ＲＮＡのＰＢＳ配列を設計するために重要である。一部の実施形態では、本明細書に記載されるｇＲＮＡスカフォールドは、５’から３’方向に、表８のｃｒＲＮＡ、表８の同じ行からのテトラループ、及び表８の同じ行からのｔｒａｃｒＲＮＡ、又はそれと少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％若しくは９９％の同一性を有する配列を含む核酸配列を含む。一部の実施形態では、スカフォールドを含むｇＲＮＡ又は鋳型ＲＮＡは、表８の同じ行に示されるスペーサー（最小）及びスペーサー（最大）以内の長さを有するｇＲＮＡスペーサーを更に含む。一部の実施形態では、表８に従う配列を有するｇＲＮＡ又は鋳型ＲＮＡは、遺伝子組換えポリペプチドを更に含むシステムに含まれ、ここで、遺伝子組換えポリペプチドは、表８の同じ行に記載されるＣａｓドメインを含む。

【０３０５】

【表８－１】

表8 遺伝子組換えシステムにおいて表3に列記されるCas変異体を適用するため、
gRNA及び/又は鋳型RNAを設計するための成分を規定するためのパラメータ

変異体	PAM(s)	切断	ティア	スペーサー(最小)	スペーサー(最大)	crRNA	配列番号	テトラループ	tracrRNA	配列番号
Nme2Cas9	NNNNCC	-3	1	22	24	GTTGTAGCTCCCTTTCTCATTTCG	4596	GAAA	CGAAATGAGAACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCCCTTAAAGCTTCTGCTTTAAGGGGCATCGTTTA	4607
PpnCas9	NNNNRTT		1	21	24	GTTGTAGCTCCCTTTTTCATTTCGC	4597	GAAA	GCGAAATGAAAAACGTTGTTACAATAAGAGATGAATTTCTCGCAAAGCTCTGCCTCTTGAAATTTCGGTTTCAAGAGGCATC	4608
SauCas9	NNGRR;NNGRRT	-3	1	21	23	GTTTTAGTACTCTG	4598	GAAA	CAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA	4609
SauCas9-KKH	NNNRR;NNNRRT	-3	1	21	21	GTTTTAGTACTCTG	4598	GAAA	CAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA	4609

【０３０６】
【表８－２】

SauriCas9	NNGG	-3	1	21	21	GTTTTAGTACTCTG	4598	GAAA	CAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA	4609
SauriCas9-KKH	NNRG	-3	1	21	21	GTTTTAGTACTCTG	4598	GAAA	CAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA	4609
ScaCas9-Sc++	NNG	-3	1	20	20	GTTTTAGAGCTA	4599	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4610
SpyCas9	NGG	-3	1	20	20	GTTTTAGAGCTA	4599	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4610
SpyCas9-NG	NG(NGG=NGA=NGT>NGC)	-3	1	20	20	GTTTTAGAGCTA	4599	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4610
SpyCas9-SpRY	NRN>NYN	-3	1	20	20	GTTTTAGAGCTA	4599	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4610
St1Cas9	NNAGAAW>NNAGGAW=NNGGAAW	-3	1	20	20	GTCTTTGTACTCTG	4600	GTAC	CAGAAGCTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTATGGCAGGGTGTTTT	4611
BlatCas9	NNNNCNAA>NNNNCNDD>NNNNC	-3	1	19	23	GCTATAGTTCCTTACT	4601	GAAA	GGTAAGTTGCTATAGTAAGGGCAACAGACCCGAGGCGTTGGGGATCGCCTAGCCCGTGTTTACGGGCTCTCCCCATATTCAAAATAATGACAGACGAGCACCTTGGAGCATTTATCTCCGAGGTGCT	4612
cCas9-v16	NNVACT;NNVATGM;NNVATT;NNVGCT;NNVGTG;NNVGTT	-3	2	21	21	GTCTTAGTACTCTG	4602	GAAA	CAGAATCTACTAAGACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA	4613
cCas9-v17	NNVRRN	-3	2	21	21	GTCTTAGTACTCTG	4602	GAAA	CAGAATCTACTAAGACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA	4613

【０３０７】

【表８－３】

cCas9-v21	NNVACT;NNVATGM;NNVATT;NNVGCT;NNVGTG;NNVGTT	-3	2	21	21	GTCTTAGTACTCTG	4602	GAAA	CAGAATCTACTAAGACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA	4613
cCas9-v42	NNVRRN	-3	2	21	21	GTCTTAGTACTCTG	4602	GAAA	CAGAATCTACTAAGACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA	4613
CdiCas9	NNRHHHY;NNRAAAY		2	22	22	ACTGGGGTTCAG	4603	GAAA	CTGAACCTCAGTAAGCATTGGCTCGTTTCCAATGTTGATTGCTCCGCCGGTGCTCCTTATTTTTAAGGGCGCCGGC	4614
CjeCas9	NNNNRYAC	-3	2	21	23	GTTTTAGTCCCT	4604	GAAA	AGGGACTAAAATAAAGAGTTTGCGGGACTCTGCGGGGTTACAATCCCCTAAAACCGC	4615
GeoCas9	NNNNCRAA		2	21	23	GTCATAGTTCCCCTGA	4605	GAAA	TCAGGGTTACTATGATAAGGGCTTTCTGCCTAAGGCAGACTGACCCGCGGCGTTGGGGATCGCCTGTCGCCCGCTTTTGGCGGGCATTCCCCATCCTT	4616
iSpyMacCas9	NAAN	-3	2	19	21	GTTTTAGAGCTA	4599	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4610
NmeCas9	NNNNGAYT;NNNNGYTT;NNNNGAYA;NNNNGTCT	-3	2	20	24	GTTGTAGCTCCCTTTCTCATTTCG	4596	GAAA	CGAAATGAGAACCGTTGCTACAATAAGGCCGTCTGAAAAGATGTGCCGCAACGCTCTGCCCCTTAAAGCTTCTGCTTTAAGGGGCATCGTTTA	4607
ScaCas9	NNG	-3	2	20	20	GTTTTAGAGCTA	4599	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4610
ScaCas9-HiFi-Sc++	NNG	-3	2	20	20	GTTTTAGAGCTA	4599	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4610
SpyCas9-3var-NRRH	NRRH	-3	2	20	20	GTTTAAGAGCTATGCTG	4606	GAAA	CAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4617

【０３０８】

【表８－４】

SpyCas9-3var-NRTH	NRTH	-3	2	20	20	GTTTAAGAGCTATGCTG	4606	GAAA	CAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4617
SpyCas9-3var-NRCH	NRCH	-3	2	20	20	GTTTAAGAGCTATGCTG	4606	GAAA	CAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4617
SpyCas9-HF1	NGG	-3	2	20	20	GTTTTAGAGCTA	4599	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4610
SpyCas9-QQR1	NAAG	-3	2	20	20	GTTTTAGAGCTA	4599	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4610
SpyCas9-SpG	NGN	-3	2	20	20	GTTTTAGAGCTA	4599	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4610
SpyCas9-VQR	NGAN	-3	2	20	20	GTTTTAGAGCTA	4599	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4610
SpyCas9-VRER	NGCG	-3	2	20	20	GTTTTAGAGCTA	4599	GAAA	TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4610
SpyCas9-xCas	NG;GAA;GAT	-3	2	20	20	GTTTAAGAGCTATGCTG	4606	GAAA	CAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4617
SpyCas9-xCas-NG	NG	-3	2	20	20	GTTTAAGAGCTATGCTG	4606	GAAA	CAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4617
St1Cas9-CNRZ1066	NNACAA	-3	2	20	20	GTCTTTGTACTCTG	4600	GTAC	CAGAAGCTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTATGGCAGGGTGTTTT	4611
St1Cas9-LMG1831	NNGCAA	-3	2	20	20	GTCTTTGTACTCTG	4600	GTAC	CAGAAGCTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTATGGCAGGGTGTTTT	4611
St1Cas9-MTH17CL396	NNAAAA	-3	2	20	20	GTCTTTGTACTCTG	4600	GTAC	CAGAAGCTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTATGGCAGGGTGTTTT	4611

【０３０９】

【表８－５】

St1Cas9-TH1477	NNGAAA	-3	2	20	20	GTCTTTGTACTCTG	4600	GTAC	CAGAAGCTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTATGGCAGGGTGTTTT	4611
sRGN3.1	NNGG		1	21	23	GTTTTAGTACTCTG	4598	GAAA	CAGAATCTACTGAAACAAGACAATATGTCGTGTTTATCCCATCAATTTATTGGTGGGATTTT	4618
sRGN3.3	NNGG		1	21	23	GTTTTAGTACTCTG	4598	GAAA	CAGAATCTACTGAAACAAGACAATATGTCGTGTTTATCCCATCAATTTATTGGTGGGATTTT	4618

【０３１０】

更に、末端Ｕｓ及びＴｓが、任意選択で付加されるか又はｔｒａｃｒＲＮＡ配列から除去され得、ＲＮＡとして提供される場合、修飾されるか又は非修飾であり得ることが理解される。特定の例に束縛されることを意図しないが、表８において例示されるものの代替となるｇＲＮＡスカフォールド配列の形態、例えば、ヌクレオチド付加、置換若しくは欠失を有する代替的なｇＲＮＡスカフォールド配列、例えば、ステム－ループ構造が付加若しくは除去された配列は、表４において例示される異なるＣａｓ９酵素又はその誘導体と一緒にも機能し得る。ｇＲＮＡスカフォールド配列が、所与のシステム、Ｃａｓ－ＲＴ融合ポリペプチド、指示、標的突然変異、鋳型ＲＮＡ、又は送達ビヒクルについて同様に最

適化され得る遺伝子組換えシステムの成分を表すことが、本明細書において考えられる。

【０３１１】

本明細書において、ＲＮＡ配列（例えば、鋳型ＲＮＡ配列）が、チミン（Ｔ）を含む特定の配列（例えば、表８の配列又はその部分）を含むと記載される場合、当然ながら、ＲＮＡ配列は、Ｔの代わりにウラシル（Ｕ）を含み得る（含むことが多い）ことが理解される。例えば、ＲＮＡ配列は、表８中の配列においてＴとして示される全ての位置においてＵを含み得る。より具体的には、本開示は、表８の全てのｇＲＮＡスカフォールド配列に従うＲＮＡ配列を提供し、ここで、ＲＮＡ配列は、表８中の配列における各Ｔの代わりにＵを有する。

【０３１２】

異種目的配列

本明細書に記載される鋳型ＲＮＡは、所望の配列を標的核酸に書き込むために、遺伝子組換えポリペプチドが逆転写のための鋳型として使用し得る異種目的配列を含み得る。一部の実施形態では、異種目的配列は、５’から３’に、後編集相同性領域、突然変異領域及び前編集相同性領域を含む。特定の理論に束縛されることを意図しないが、鋳型ＲＮＡにおける逆転写を行うＲＴは、最初に、前編集相同性領域、次に突然変異領域及び次に後編集相同性領域を逆転写し、それによりいずれの側にも相同性領域を有する所望の突然変異を含むＤＮＡ鎖を生成する。

【０３１３】

一部の実施形態では、異種目的配列は、長さが、少なくとも３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、５００若しくは１、０００ヌクレオチド（ｎｔ）、又は長さが、少なくとも１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、８．５、９、９．５若しくは１０キロベースである。一部の実施形態では、異種目的配列は、長さが、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１２０、１４０、１６０、１８０、２００、５００、１、０００若しくは２０００ヌクレオチド（ｎｔ）以下、又は長さが、２０、１５、１０、９、８、７、６、５、４若しくは３キロベース以下である。一部の実施形態では、異種目的配列は、長さが、３０～１０００、４０～１０００、５０～１０００、６０～１０００、７０～１０００、７４～１０００、７５～１０００、７６～１０００、７７～１０００、７８～１０００、７９～１０００、８０～１０００、８５～１０００、９０～１０００、１００～１０００、１２０～１０００、１４０～１０００、１６０～１０００、１８０～１０００、２００～１０００、５００～１０００、３０～５００、４０～５００、５０～５００、６０～５００、７０～５００、７４～５００、７５～５００、７６～５００、７７～５００、７８～５００、７９～５００、８０～５００、８５～５００、９０～５００、１００～５００、１２０～５００、１４０～５００、１６０～５００、１８０～５００、２００～５００、３０～２００、４０～２００、５０～２００、６０～２００、７０～２００、７４～２００、７５～２００、７６～２００、７７～２００、７８～２００、７９～２００、８０～２００、８５～２００、９０～２００、１００～２００、１２０～２００、１４０～２００、１６０～２００、１８０～２００、３０～１００、４０～１００、５０～１００、６０～１００、７０～１００、７４～１００、７５～１００、７６～１００、７７～１００、７８～１００、７９～１００、８０～１０

０、８５～１００若しくは９０～１００ヌクレオチド（ｎｔ）、又は長さが、１～２０、１～１５、１～１０、１～９、１～８、１～７、１～６、１～５、１～４、１～３、１～２、２～２０、２～１５、２～１０、２～９、２～８、２～７、２～６、２～５、２～４、２～３、３～２０、３～１５、３～１０、３～９、３～８、３～７、３～６、３～５、３～４、４～２０、４～１５、４～１０、４～９、４～８、４～７、４～６、４～５、５～２０、５～１５、５～１０、５～９、５～８、５～７、５～６、６～２０、６～１５、６～１０、６～９、６～８、６～７、７～２０、７～１５、７～１０、７～９、７～８、８～２０、８～１５、８～１０、８～９、９～２０、９～１５、９～１０、１０～１５、１０～２０若しくは１５～２０キロベースである。一部の実施形態では、異種目的配列は、長さが、１０～１００、１０～９０、１０～８０、１０～７０、１０～６０、１０～５０、１０～４０、１０～３０、又は１０～２０ｎｔ、例えば、長さが１０～８０、１０～５０、又は１０～２０ｎｔ、例えば、長さが約１０～２０ｎｔである。一部の実施形態では、異種目的配列は、長さが８～３０、９～２５、１０～２０、１１～１６又は１２～１５ヌクレオチド、例えば長さが１１～１６ｎｔである。特定の理論に束縛されることを意図しないが、一部の実施形態では、編集のより大きい挿入サイズ、より大きい領域（例えば、標的領域中の第１の編集／置換及び第２の編集／置換間の距離）及び／又はより多い数の所望の編集（例えば、標的ゲノムに対する異種目的配列のミスマッチ）、より長い最適な異種目的配列をもたらし得る。

【０３１４】

特定の実施形態では、鋳型核酸は、例えば、異種コード領域をゲノムに導入し；エクソンの構造／選択的スプライシングに影響するか若しくはそれを引き起こし、例えば、１つ又は複数のエクソンのエクソンスキッピングをもたらし；内因性遺伝子の破壊を引き起こし、例えば、遺伝子ノックアウトを生成し；内因性遺伝子の転写活性化を引き起こし；内因性ＤＮＡのエピジェネティック調節を引き起こし；１つ又は複数の作動可能に連結された遺伝子の上方制御を引き起こし、例えば、遺伝子活性化若しくは過剰発現をもたらし；１つ又は複数の作動可能に連結された遺伝子の下方制御を引き起こし、例えば、遺伝子ノックダウンを生成することなどにより、宿主ゲノム機能を改変又は特定化する配列を含むように同定、設計、改変及び構築可能である、カスタマイズされたＲＮＡ配列鋳型を含む。特定の実施形態では、カスタマイズされたＲＮＡ配列鋳型は、エクソン及び／又は導入遺伝子をコードする配列を含むように、転写因子アクチベーター、リプレッサ、エンハンサーなどに対する結合部位、及びそれらの組合せを意図して、改変され得る。一部の実施形態では、カスタマイズされた鋳型は、標的部位に作動可能に連結された内因性ＲＮＡ転写物又は内因性タンパク質において発現される核酸又はペプチドタグをコードするように改変され得る。他の実施形態では、コード配列は、スプライスドナー部位、スプライスアクセプター部位、又はポリＡテールで更にカスタマイズされ得る。

【０３１５】

システムの鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、典型的に、所望の配列を標的ＤＮＡに書き込むための目的配列（例えば、異種目的配列）を含む。目的配列は、コーディング又はノンコーディング配列であり得る。鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、標的ＤＮＡ遺伝子座において挿入、突然変異、又は欠失をもたらすように設計され得る。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、標的ＤＮＡにおける挿入を引き起こすように設計され得る。例えば、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、異種配列を含み得、逆転写は、異種配列の標的ＤＮＡへの挿入をもたらすことになる。他の実施形態では、ＲＮＡ鋳型は、欠失を標的ＤＮＡに導入するように設計され得る。例えば、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、所望の欠失の上流及び下流で標的ＤＮＡに一致することがあり、逆転写は、介在配列を有しない鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）からの上流及び下流配列の複製をもたらし、例えば、介在配列の欠失を引き起こすことになる。他の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、編集を標的ＤＮＡに導入するように設計され得る。例えば、鋳型ＲＮＡは、１つ又は複数のヌクレオチドを例外として、標的ＤＮＡ配列に一致することがあり、逆転写は、標的ＤＮＡへのこれらの編集の複製をもたらし、例えば、突然

変異、例えば、トランジション又はトランスバージョン突然変異をもたらすことになる。
【０３１６】
一部の実施形態では、標的部位への目的配列の書き込みは、ヌクレオチドの置換をもたらし、例えば、ここで、目的配列の完全長は、１つ又は複数のミスマッチ塩基を有する標的部位の一致している長さに対応する。一部の実施形態では、異種目的配列は、配列変異の組合せ、例えば、同時の付加及び欠失、付加及び置換、又は欠失及び置換が存在し得るように設計され得る。
【０３１７】
一部の実施形態では、異種目的配列は、オープンリーディングフレーム又はオープンリーディングフレームの断片を含有し得る。一部の実施形態では、異種目的配列は、コザック配列を有する。一部の実施形態では、異種目的配列は、内部リボソーム進入部位を有する。一部の実施形態では、異種目的配列は、Ｔ２Ａ又はＰ２Ａ部位などの自己切断型ペプチドを有する。一部の実施形態では異種目的配列は、開始コドンを有する。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、スプライスアクセプター部位を有する。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、スプライスドナー部位を有する。例示的なスプライスアクセプター及びスプライスドナー部位は、国際公開第２０１６０４４４１６号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。例示的なスプライスアクセプター部位配列は、当業者に公知である。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、停止コドンの下流にｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位を有する。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、オープンリーディングフレームの停止コドンの下流にポリＡテールを有する。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、１つ又は複数のエクソンを含む。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、１つ又は複数のイントロンを含む。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、真核生物転写ターミネーターを含む。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、増強された翻訳エレメント又は翻訳増強エレメントを含む。一部の実施形態では、ＲＮＡは、ヒトＴ細胞白血病ウイルス（ｈｕｍａｎ Ｔ－ｃｅｌｌ ｌｅｕｋｅｍｉａ ｖｉｒｕｓ）（ＨＴＬＶ－１）Ｒ領域を含む。一部の実施形態では、ＲＮＡは、核外輸送を増強する転写後調節配列、例えば、Ｂ型肝炎ウイルス（Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｂ Ｖｉｒｕｓ）（ＨＰＲＥ）又はウッドチャック肝炎ウイルス（Ｗｏｏｄｃｈｕｃｋ Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｖｉｒｕｓ）（ＷＰＲＥ）のものを含む。
【０３１８】
一部の実施形態では、異種目的配列は、ノンコーディング配列を含有し得る。例えば、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、調節エレメント、例えば、プロモータ又はエンハンサー配列又はｍｉＲＮＡ結合部位を含み得る。一部の実施形態では、標的部位での目的配列の組み込みは、内因性遺伝子の上方制御をもたらすことになる。一部の実施形態では、標的部位での目的配列の組み込みは、内因性遺伝子の下方制御をもたらすことになる。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、組織特異的プロモータ又はエンハンサーを含み、その各々は、一方向又は二方向であり得る。一部の実施形態では、プロモータは、ＲＮＡポリメラーゼＩプロモータ、ＲＮＡポリメラーゼＩＩプロモータ、又はＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモータである。一部の実施形態では、プロモータは、ＴＡＴＡエレメントを含む。一部の実施形態では、プロモータは、Ｂ認識エレメントを含む。一部の実施形態では、プロモータは、転写因子のための１つ又は複数の結合部位を有する。
【０３１９】
一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、エピジェネティック修飾を連携させる部位を含む。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、クロマチン絶縁体を含む。例えば、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、ＣＴＣＦ部位又はＤＮＡメチル化に対して標的化された部位を含む。
【０３２０】
一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、エフェクター配列に作動可能に連結された少なくとも１つの調節領域から構成される遺伝子発現ユニットを含む。エ

フェクター配列は、ＲＮＡに転写される配列（例えば、コーディング配列又はノンコーディング配列、例えば、ｍｉｃｒｏＲＮＡをコードする配列）であり得る。

【０３２１】

一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列は、内因性イントロン中に標的ゲノムに挿入される。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列は、標的ゲノムに挿入され、それにより新しいエクソンとして作用する。一部の実施形態では、異種目的配列の標的ゲノムへの挿入は、天然のエクソンの置換又は天然のエクソンのスキッピングをもたらす。

【０３２２】

一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列は、ＡＡＶＳ１、ＣＣＲ５、ＲＯＳＡ２６、又はアルブミン遺伝子座などのゲノムセーフハーバー部位中の標的ゲノムに挿入される。一部の実施形態では、遺伝子組換えを用いて、ＣＡＲをＴ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）遺伝子座に組み込む（Ｅｙｑｕｅｍ ｅｔ ａｌ Ｎａｔｕｒｅ ５４３，１１３－１１７（２０１７））。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムを用いて、ＣＡＲをＴ細胞受容体β定常（ＴＲＢＣ）遺伝子座に組み込む。多くの他のセーフハーバーが、コンピューター手法によって同定されており（Ｐｅｌｌｅｎｚ ｅｔ ａｌ Ｈｕｍ Ｇｅｎ Ｔｈｅｒ ３０，８１４－８２８（２０１９））、遺伝子組換えシステム媒介性組み込みに使用可能である。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列は、インタージェニック又はイントラジェニック領域内のゲノムに付加される。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列は、内因性活性遺伝子の０．１ｋｂ、０．２５ｋｂ、０．５ｋｂ、０．７５、ｋｂ、１ｋｂ、２ｋｂ、３ｋｂ、４ｋｂ、５ｋｂ、７．５ｋｂ、１０ｋｂ、１５ｋｂ、２０ｋｂ、２５ｋｂ、５０、７５ｋｂ若しくは１００ｋｂ以内のゲノム５’又は３’に付加される。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列は、内因性プロモータ又はエンハンサー０．１ｋｂ、０．２５ｋｂ、０．５ｋｂ、０．７５、ｋｂ、１ｋｂ、２ｋｂ、３ｋｂ、４ｋｂ、５ｋｂ、７．５ｋｂ、１０ｋｂ、１５ｋｂ、２０ｋｂ、２５ｋｂ、５０、７５ｋｂ若しくは１００ｋｂ以内のゲノム５’又は３’に付加される。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の異種目的配列は、例えば、５０～５０，０００塩基対（例えば、５０～４０，０００ｂｐ間、５００～３０，０００ｂｐ間、５００～２０，０００ｂｐ間、１００～１５，０００ｂｐ間、５００～１０，０００ｂｐ間、５０～１０，０００ｂｐ間、５０～５，０００ｂｐ間であり得る。

【０３２３】

鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、標的ＤＮＡ遺伝子座で挿入、突然変異、又は欠失をもたらすように設計され得る。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、標的ＤＮＡ中に挿入を引き起こすように設計され得る。例えば、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、異種目的配列を含み得、逆転写は、異種目的配列の標的ＤＮＡへの挿入をもたらすことになる。他の実施形態では、ＲＮＡ鋳型は、欠失を標的ＤＮＡに書き込むように設計され得る。例えば、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、所望の欠失の上流及び下流で標的ＤＮＡに一致することがあり、逆転写は、介在配列を有しない鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）からの上流及び下流配列の複製をもたらし、例えば、介在配列の欠失を引き起こすことになる。他の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、編集を標的ＤＮＡに書き込むように設計され得る。例えば、鋳型ＲＮＡは、１つ又は複数のヌクレオチドを例外として、標的ＤＮＡ配列に一致することがあり、逆転写は、標的ＤＮＡへのこれらの編集の複製をもたらし、例えば、突然変異、例えば、トランジション又はトランスバージョン突然変異をもたらすことになる。

【０３２４】

一部の実施形態では、前編集相同性ドメインは、標的核酸分子に含まれる核酸配列との１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【０３２５】

一部の実施形態では、後編集相同性ドメインは、標的核酸分子に含まれる核酸配列との

１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。
【０３２６】
ＰＢＳ配列
一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、ＰＢＳ配列を含む。一部の実施形態では、ＰＢＳ配列は、異種目的配列の３’側に配置され、本明細書に記載されるシステムによって修飾されるべき部位に隣接した配列に対して相補的であるか、又はシステム／遺伝子組換えポリペプチドによって修飾されるべき部位に隣接した配列に相補的な配列に対して、１、２、３、４若しくは５つ以下のミスマッチを含む。一部の実施形態では、ＰＢＳ配列は、標的核酸分子中のニック部位の１、２、３、４、５、６、７、８、９若しくは１０ヌクレオチド以内に結合する。一部の実施形態では、ＰＢＳ配列の標的核酸分子への結合は、例えば、ＴＰＲＴについてのプライマーとして作用する３’相同性ドメインによる、ターゲットプライム逆転写（ＴＰＲＴ）の開始を可能にする。一部の実施形態では、ＰＢＳ配列は、長さが、３～５、５～１０、１０～３０、１０～２５、１０～２０、１０～１９、１０～１８、１０～１７、１０～１６、１０～１５、１０～１４、１０～１３、１０～１２、１０～１１、１１～３０、１１～２５、１１～２０、１１～１９、１１～１８、１１～１７、１１～１６、１１～１５、１１～１４、１１～１３、１１～１２、１２～３０、１２～２５、１２～２０、１２～１９、１２～１８、１２～１７、１２～１６、１２～１５、１２～１４、１２～１３、１３～３０、１３～２５、１３～２０、１３～１９、１３～１８、１３～１７、１３～１６、１３～１５、１３～１４、１４～３０、１４～２５、１４～２０、１４～１９、１４～１８、１４～１７、１４～１６、１４～１５、１５～３０、１５～２５、１５～２０、１５～１９、１５～１８、１５～１７、１５～１６、１６～３０、１６～２５、１６～２０、１６～１９、１６～１８、１６～１７、１７～３０、１７～２５、１７～２０、１７～１９、１７～１８、１８～３０、１８～２５、１８～２０、１８～１９、１９～３０、１９～２５、１９～２０、２０～３０、２０～２５若しくは２５～３０ヌクレオチド、例えば長さが１０～１７、１２～１６若しくは１２～１４ヌクレオチドである。一部の実施形態では、ＰＢＳ配列は、長さが、５～２０、８～１６、８～１４、８～１３、９～１３、９～１２若しくは１０～１２ヌクレオチド、例えば長さが９～１２ヌクレオチドである。
【０３２７】
鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、標的ＤＮＡに対していくらかの相同性を有し得る。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、ＰＢＳ配列ドメインは、標的ＤＮＡに対するアニーリング領域として機能し得ることで、標的ＤＮＡは、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の逆転写をプライムするように位置づけられる。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、ＲＮＡの３’末端で、標的ＤＮＡと少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１７５、２００又はそれ以上の塩基の正確な相同性を有する。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、例えば、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）の５’末端で、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１７５、２００又はそれ以上の塩基の、標的ＤＮＡに対する少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％又は１００％の相同性を有する。
【０３２８】
誘導性活性を有するｇＲＮＡ
一部の実施形態では、本明細書に記載されるｇＲＮＡ（例えば、鋳型ＲＮＡの一部であるｇＲＮＡ又は第２の鎖ニッキングのために使用されるｇＲＮＡ）は、誘導性活性を有する。誘導性活性は、（ｇＲＮＡに加えて）ブロッキングドメインを更に含む鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡによって達成され得、ブロッキングドメインの一部又は全部の配列は、ｇＲＮＡの一部又は全部に対して、少なくとも部分的に相補的である。従って、ブロッキ

ングドメインは、ｇＲＮＡの一部又は全部に対してハイブリダイズ又は実質的にハイブリダイズ可能である。一部の実施形態では、ブロッキングドメイン及び誘導性活性ｇＲＮＡは、鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡ上に配置されることで、ｇＲＮＡは、ブロッキングドメインがｇＲＮＡに対してハイブリダイズ又は実質的にハイブリダイズされる場合の第１の立体構造と、ブロッキングドメインがｇＲＮＡに対してハイブリダイズされない又は実質的にハイブリダイズされない場合の第２の立体構造とをとり得る。一部の実施形態では、第１の立体構造において、ｇＲＮＡは、遺伝子組換えポリペプチド（例えば、鋳型核酸結合ドメイン、ＤＮＡ結合ドメイン、又はエンドヌクレアーゼドメイン（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質））に結合できない、又はブロッキングドメインを欠く以外には同様の鋳型ＲＮＡと比較して、実質的に減少した親和性で結合する。一部の実施形態では、第２の立体構造において、ｇＲＮＡは、遺伝子組換えポリペプチド（例えば、鋳型核酸結合ドメイン、ＤＮＡ結合ドメイン、又はエンドヌクレアーゼドメイン（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質））に結合可能である。一部の実施形態では、ｇＲＮＡが第１又は第２の立体構造のいずれであるかは、遺伝子組換えポリペプチドの（例えば、遺伝子組換えポリペプチドが含むＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質の）ＤＮＡ結合又はエンドヌクレアーゼ活性のいずれが活性であるかに影響し得る。

【０３２９】

一部の実施形態では、第２のニックを連携させるｇＲＮＡは、誘導性活性を有する。一部の実施形態では、第２のニックを連携させるｇＲＮＡは、鋳型が逆転写された後に誘導される。一部の実施形態では、ｇＲＮＡのブロッキングドメインへのハイブリダイゼーションは、開口分子を用いて破壊され得る。一部の実施形態では、開口分子は、ｇＲＮＡ又はブロッキングドメインの一部又は全てに結合し、ｇＲＮＡのブロッキングドメインへのハイブリダイゼーションを阻害する薬剤を含む。一部の実施形態では、開口分子は、例えば、ｇＲＮＡ、ブロッキングドメイン、又は両方に対して部分的に又は全体的に相補的である配列を含む核酸を含む。適切な開口分子を選択又は設計することにより、開口分子の提供は、それがＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質と会合し、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質の関連機能（例えば、ＤＮＡ結合及び／又はエンドヌクレアーゼ活性）を提供し得るように、ｇＲＮＡの立体構造の変化を促進し得る。特定の理論に束縛されることを意図しないが、選択された時間及び／又は位置での開口分子の提供は、ｇＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質、又はそれらを含む遺伝子組換えシステムの活性の空間的及び時間的制御を可能にし得る。一部の実施形態では、開口分子は、遺伝子組換えポリペプチド及び／又は鋳型核酸を含む細胞に対して外因性である。一部の実施形態では、開口分子は、（例えば、遺伝子組換えポリペプチド並びに／又はｇＲＮＡ及びブロッキングドメインを含む鋳型核酸を含む細胞に対して内因性である）内因性薬剤を含む。例えば、誘導性ｇＲＮＡ、ブロッキングドメイン、及び開口分子は、開口分子が標的細胞又は組織内で発現される内因性薬剤であるように選択され得、例えば、それにより、標的細胞又は組織内での遺伝子組換えシステムの活性が確認される。更なる例として、誘導性ｇＲＮＡ、ブロッキングドメイン、及び開口分子は、開口分子が１つ又は複数の非標的細胞又は組織内で存在しないか又は実質的に発現されないように選択され得、例えば、それにより、遺伝子組換えシステムの活性は、１つ又は複数の非標的細胞又は組織内で存在しないか若しくは実質的に存在しない、又は標的細胞又は組織と比較して低下したレベルで存在することが確認される。例示的なブロッキングドメイン、開口分子、及びその使用については、ＰＣＴ出願公開の国際公開第２０２００４４０３９Ａ１号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。一部の実施形態では、鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡは、遺伝子組換えポリペプチドの１つ又は複数の成分による、例えば、逆転写酵素又はＲＮＡ結合ドメインによる結合のための１つ又は複数の配列又は構造、及びｇＲＮＡを含み得る。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、遺伝子組換えポリペプチドの鋳型核酸結合ドメイン（例えば、ＲＮＡ結合ドメイン）との相互作用を促進する。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、遺伝子組換えポリペプチドを、例えば、標的細胞ゲノム中の一致する標的配列に導く。

【０３３０】
遺伝子組換えシステムにおける環状ＲＮＡ及びリボザイム
標的細胞内での製剤化、送達又は遺伝子組換え反応中、環状及び／又は線状ＲＮＡ状態を使用することが有用であり得ると考えられる。従って、本明細書に記載の態様のいずれかの一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、１つ又は複数の環状ＲＮＡ（ｃｉｒｃＲＮＡ）を含む。本明細書に記載の態様のいずれかの一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、１つ又は複数の線状ＲＮＡを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸（例えば、鋳型核酸、遺伝子組換えポリペプチド、又は両方をコードする核酸分子）は、ｃｉｒｃＲＮＡである。一部の実施形態では、環状ＲＮＡ分子は、遺伝子組換えポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするｃｉｒｃＲＮＡ分子は、宿主細胞に送達される。一部の実施形態では、環状ＲＮＡ分子は、例えば、本明細書に記載されるようなリコンビナーゼをコードする。一部の実施形態では、リコンビナーゼをコードするｃｉｒｃＲＮＡ分子は、宿主細胞に送達される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするｃｉｒｃＲＮＡ分子は、翻訳前に（例えば、宿主細胞内で、例えば、宿主細胞の核内で）線状化される。
【０３３１】
環状ＲＮＡ（ｃｉｒｃＲＮＡ）は、細胞内で天然に生じることが見出されており、ヒト細胞内での非コード及びタンパク質をコードする役割の両方を含む、多様な機能を有することが見出されている。ｃｉｒｃＲＮＡが、ＲＮＡの環状化をもたらすように、自己スプライシングイントロンをＲＮＡ分子（又はＲＮＡ分子をコードするＤＮＡ）に組み込むことによって改変され得、改変されたｃｉｒｃＲＮＡが、増強されたタンパク質の生成及び安定性を有し得ることが示されている（Ｗｅｓｓｅｌｈｏｅｆｔ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ　２０１８）。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ｃｉｒｃＲＮＡとしてコードされる。特定の実施形態では、鋳型核酸は、ｄｓＤＮＡ又はｓｓＤＮＡなどのＤＮＡである。特定の実施形態では、ｃｉｒｃＤＮＡは、鋳型ＲＮＡを含む。
【０３３２】
一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは、１つ又は複数のリボザイム配列を含む。一部の実施形態では、リボザイム配列は、例えば宿主細胞内で、自己切断のため、活性化され、例えば、それにより、ｃｉｒｃＲＮＡの線状化をもたらす。一部の実施形態では、リボザイムは、マグネシウムの濃度が、例えば宿主細胞内で、切断にとって十分なレベルに達するとき、活性化される。一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは、宿主細胞への送達の前、低いマグネシウム環境下で維持される。一部の実施形態では、リボザイムは、タンパク質応答性リボザイムである。一部の実施形態では、リボザイムは、核酸応答性リボザイムである。一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは、切断部位を含む。一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは、第２の切断部位を含む。
【０３３３】
一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡは、標的細胞の核内で線状化される。一部の実施形態では、細胞の核内でのｃｉｒｃＲＮＡの線状化は、例えば、切断事象を活性化するため、細胞の核内に存在する成分に関連する。一部の実施形態では、核エレメント、例えば、核タンパク質、例えば、ゲノムと相互作用するタンパク質、例えば、エピジェネティック修飾因子、例えば、ＥＺＨ２に対して応答性がある、リボザイム、例えば、Ｂ２又はＡＬＵエレメント由来のリボザイムは、例えば、遺伝子組換えシステムの、ｃｉｒｃＲＮＡに組み込まれる。一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡの核局在化は、リボザイムの自己触媒活性の増加及びｃｉｒｃＲＮＡの線状化をもたらす。
【０３３４】
一部の実施形態では、リボザイムは、遺伝子組換えシステムの他の成分の１つ又は複数に対して異種である。一部の実施形態では、誘導性リボザイム（例えば、本明細書に記載されるｃｉｒｃＲＮＡ中）は、例えば、タンパク質リガンド応答性のアプタマー設計を用いることによって合成的に作製される。ＭＳ２コートタンパク質アプタマーを有するタバ

コ輪斑ウイルス（ｔｏｂａｃｃｏ　ｒｉｎｇｓｐｏｔ　ｖｉｒｕｓ）ハンマーヘッド型リボザイムのサテライトＲＮＡを使用するためのシステムは、ＭＳ２コートタンパク質の存在下で、リボザイム活性の活性化をもたらすことが記載されている（Ｋｅｎｎｅｄｙ　ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　４２（１９）：１２３０６－１２３２１（２０１４）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる））。複数の実施形態では、こうしたシステムは、細胞質又は核に局在されたタンパク質リガンドに応答する。一部の実施形態では、タンパク質リガンドは、ＭＳ２でない。標的リガンドに対するＲＮＡアプタマーを作製する方法は、例えば、指数関数的濃縮（ＳＥＬＥＸ）によるリガンドの系統的進化に基づき、記載されており（Ｔｕｅｒｋ　ａｎｄ　Ｇｏｌｄ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４９（４９６８）：５０５－５１０（１９９０）；Ｅｌｌｉｎｇｔｏｎ　ａｎｄ　Ｓｚｏｓｔａｋ，Ｎａｔｕｒｅ　３４６（６２８７）：８１８－８２２（１９９０）；それらの各々の方法は参照により本明細書に組み込まれる）、いくつかの事例では、インシリコ設計によって支援されている（Ｂｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　１１７（１５）：８４８６－８４９３、それらの方法は参照により本明細書に組み込まれる）。従って、一部の実施形態では、標的リガンドに対するアプタマーは、合成リボザイムシステム中に作製され、組み込まれ、例えば、例えば、タンパク質リガンドの存在下で、リボザイム媒介性切断及びｃｉｒｃＲＮＡの線状化を誘起する。一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡの線状化は、例えば、細胞質内でリガンドと会合するアプタマーを用いて、細胞質内で誘起される。一部の実施形態では、ｃｉｒｃＲＮＡの線状化は、例えば、核内でリガンドと会合するアプタマーを用いて、核内で誘起される。複数の実施形態では、核内のリガンドは、エピジェネティック修飾因子又は転写因子を含む。一部の実施形態では、線状化を誘起するリガンドは、オンターゲット細胞内に、オフターゲット細胞より高いレベルで存在する。

【０３３５】

更に、ｃｉｒｃＲＮＡの線状化のため、核酸応答性リボザイムシステムが使用され得ると考えられる。例えば、リボザイム活性化を誘起するための、規定された標的核酸分子を感知するバイオセンサーは、例えば、Ｐｅｎｃｈｏｖｓｋｙ（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ａｄｖａｎｃｅｓ　３２（５）：１０１５－１０２７（２０１４）、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。これらの方法により、リボザイムは、天然に不活性状態にフォールドし、規定された標的核酸分子（例えば、ＲＮＡ分子）の存在下のみで活性化される。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムのｃｉｒｃＲＮＡは、規定された標的核酸、例えばＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ガイドＲＮＡ、ｇＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ、ｎｃＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ又はｍｔＲＮＡの存在下で活性化される、核酸応答性リボザイムを含む。一部の実施形態では、線状化を誘起する核酸は、オンターゲット細胞内に、オフターゲット細胞より高いレベルで存在する。

【０３３６】

本明細書中の態様のいずれかの一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、目的の標的組織又は標的細胞に対する誘導特異性を有する１つ又は複数のリボザイム、例えば、目的の標的組織又は標的細胞においてより高いレベルで存在するリガンド又は核酸によって活性化されるリボザイムを組み込む。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、細胞内区画、例えば、核、核小体、細胞質、又はミトコンドリアに対する誘導特異性を有するリボザイムを組み込む。一部の実施形態では、リボザイムは、標的細胞内区画中により高いレベルで存在するリガンド又は核酸によって活性化される。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムのＲＮＡ成分は、例えば、線状化によって活性化される、ｃｉｒｃＲＮＡとして提供される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするｃｉｒｃＲＮＡの線状化は、翻訳のための分子を活性化する。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムのｃｉｒｃＲＮＡ成分を活性化するシグナルが、オンターゲット細胞又は組織内により高いレベルで存在することで、例えば、システムは、これらの細胞内で特異的に活性化される。

【０３３７】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムのＲＮＡ成分は、線状化によって不活性化

されるｃｉｒｃＲＮＡとして提供される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするｃｉｒｃＲＮＡは、切断及び分解によって不活性化される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするｃｉｒｃＲＮＡは、翻訳シグナルをポリペプチドのコーディング配列から分離する切断によって不活性化される。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムのｃｉｒｃＲＮＡ成分を不活性化するシグナルが、オフターゲット細胞又は組織内により高いレベルで存在することで、システムは、これらの細胞内で特異的に不活性化される。

【０３３８】

標的核酸部位

一部の実施形態では、遺伝子組換え後、編集された配列周囲の標的部位は、例えば、Ｋａｒｓｔ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）ｂｉｏＲｘｉｖ　ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／６４５９０３（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、例として、例えば、標的部位のロングリードアンプリコン配列決定により判定して、編集事象の約５０％又は１０％未満において、限られた数の挿入又は欠失を含む。一部の実施形態では、標的部位は、例えば、Ｋａｒｓｔ　ｅｔ　ａｌ．ｂｉｏＲｘｉｖ　ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／６４５９０３（２０２０）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、例えば、標的部位のロングリードアンプリコン配列決定により判定して、複数の連続した編集事象、例えば、ヘッドトゥーテール又はヘッドトゥヘッド重複を示さない。一部の実施形態では、標的部位は、鋳型ＲＮＡに対応する組み込まれた配列を含む。一部の実施形態では、標的部位は、例えば、Ｋａｒｓｔ　ｅｔ　ａｌ．ｂｉｏＲｘｉｖ　ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／６４５９０３（２０２０）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、例えば、標的部位のロングリードアンプリコン配列決定により判定して、事象の約１％又は１０％超において、内因性ＲＮＡから得られる挿入を含まない。一部の実施形態では、標的部位は、鋳型ＲＮＡに対応する組み込まれた配列を含む。

【０３３９】

本発明の特定の態様では、遺伝子組換えシステムによって組み込まれる宿主ＤＮＡ結合部位は、遺伝子内、イントロン内、エクソン内、ＯＲＦ内、任意の遺伝子のコード領域外、遺伝子の調節領域内、又は遺伝子の調節領域外に存在し得る。他の態様では、ポリペプチドは、１つ又は２つ以上の宿主ＤＮＡ配列に結合し得る。

【０３４０】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムを用いて、複数の対立遺伝子中の標的遺伝子座を編集する。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、特定の対立遺伝子を編集するように設計される。例えば、遺伝子組換えポリペプチドは、一方の対立遺伝子上のみに存在する特定の配列に導かれ得、例えば、標的対立遺伝子、例えば、第２のコグネイト対立遺伝子に対してではなく、ｇＲＮＡ又はアニーリングドメインに対して相同性を有する鋳型ＲＮＡを含む。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、ハプロタイプに特異的な対立遺伝子を改変し得る。一部の実施形態では、特定の対立遺伝子を標的にする遺伝子組換えシステムは、その対立遺伝子を優先的に標的にし、例えば、標的対立遺伝子に対する少なくとも２、４、６、８、又は１０倍の優先性を有する。

【０３４１】

第２の鎖ニッキング

一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムは、第１の鎖に切れ目を入れるニッカーゼ活性（例えば、遺伝子組換えポリペプチド中）、及び標的ＤＮＡの第２の鎖に切れ目を入れるニッカーゼ活性（例えば、遺伝子組換えポリペプチドと別個のポリペプチド中）を含む。本明細書に記載されるように、特定の理論に束縛されることを意図しないが、標的部位ＤＮＡの第１の鎖のニッキングは、鋳型ＲＮＡの配列、例えば、異種目的配列を逆転写するために、ＲＴドメインによって使用され得る３’ＯＨを提供すると考えられる。特定の理論に束縛されることを意図しないが、更なるニックの第２の鎖への導入が、元のゲノム配列より高頻度で異種目的配列ベースの配列をとるように細胞Ｄ

ＮＡ修復機構をバイアスし得ると考えられる。一部の実施形態では、第２の鎖に対する更なるニックが、第１の鎖に対するニックとして同じエンドヌクレアーゼドメイン（例えば、ニッカーゼドメイン）によって作製される。一部の実施形態では、同じ遺伝子組換えポリペプチドは、第１の鎖に対するニック及び第２の鎖に対するニックの両方の機能を果たす。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含み、第２の鎖に対する更なるニックは、例えば、第２の鎖に切れ目を入れるようにＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを導く第２のｇＲＮＡを含む更なる核酸によって導かれる。他の実施形態では、更なる第２の鎖ニックは、第１の鎖に対するニックと異なるエンドヌクレアーゼドメイン（例えば、ニッカーゼドメイン）によって作製される。一部の実施形態では、その異なるエンドヌクレアーゼドメインは、遺伝子組換えポリペプチドと別個に、更なるポリペプチド中に位置する（例えば、本発明のシステムは、更なるポリペプチドを更に含む）。一部の実施形態では、更なるポリペプチドは、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼドメイン（例えば、ニッカーゼドメイン）を含む。一部の実施形態では、更なるポリペプチドは、例えば、本明細書に記載されるＤＮＡ結合ドメインを含む。

【０３４２】

第１の鎖ニックと比較して、第２の鎖ニックが生じる位置は、所望の遺伝子組換えＤＮＡ修飾が得られる範囲、望まれない二本鎖切断（ＤＳＢ）が生じる範囲、望まれない挿入が生じる範囲、又は望まれない欠失が生じる範囲の１つ又は複数に影響し得ることは、本明細書で企図される。特定の理論に束縛されることを意図しないが、第２の鎖ニッキングは、２つの一般的な方向性：内向きニック（ｉｎｗａｒｄ　ｎｉｃｋ）及び外向きニック（ｏｕｔｗａｒｄ　ｎｉｃｋ）において生じ得る。

【０３４３】

一部の実施形態では、内向きニック方向性において、ＲＴドメインは、第２の鎖ニックから離れて（例えば、鋳型ＲＮＡ（例えば、異種目的配列）を用いて）重合する。一部の実施形態では、内向きニック方向性において、第１の鎖に対するニックの位置及び第２の鎖に対するニックの位置は、第１のＰＡＭ部位と第２のＰＡＭ部位との間に位置づけられる（例えば、両方のニックが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含むポリペプチド（例えば、遺伝子組換えポリペプチド）によって作製される状況で）。一部の実施形態では、内向きニック方向性において、第１鎖に対するニックの位置及び第２鎖に対するニックの位置は、ポリペプチドが標的ＤＮＡに結合する部位と更なるポリペプチドが標的ＤＮＡに結合する部位の間に存在する。一部の実施形態では、内向きニック方向性において、第２鎖に対するニックの位置は、第１鎖に対するニックの位置に対する、ポリペプチド及び更なるポリペプチドの結合部位の同じ側に位置づけられる。一部の実施形態では、内向きニック方向性において、第１鎖に対するニックの位置及び第２鎖に対するニックの位置は、ＰＡＭ部位と、標的部位から距離を置いた部位の間に位置づけられる。

【０３４４】

内向きニック方向性を提供する遺伝子組換えシステムの例は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド、第１の鎖上の標的部位ＤＮＡのニッキングを導くｇＲＮＡを含む鋳型ＲＮＡ、及び第１のニックの位置から距離を置いた部位でニッキングを導く更なるｇＲＮＡを含む更なる核酸を含み、第１のニックの位置及び第２のニックの位置は、２つのｇＲＮＡが遺伝子組換えポリペプチドを導く部位のＰＡＭ部位間に存在する。更なる例として、内向きニック方向性を提供する別の遺伝子組換えシステムは、ジンクフィンガー分子及び第１のニッカーゼドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含む更なるポリペプチド、及び第２の鎖上の標的部位ＤＮＡから距離を置いた部位に切れ目を入れるように更なるポリペプチドを導くｇＲＮＡを含む更なる核酸を含み、ここで、ジンクフィンガー分子は、標的部位の第１の鎖に切れ目を入れるように第１のニッカーゼドメインを導く様式で標的ＤＮＡに結合し；第１のニックの位置及び第２のニックの位置が、ＰＡＭ部位とジンクフィンガー分子が結合する部位との間に存在する。更なる例として、内向きニック方向性を提供する別の遺伝子組換えシステムは、ジンクフィンガー分子及び第１のニッカーゼドメインを含む遺伝子組換えポリペ

プチド、ＴＡＬエフェクター分子及び第２のニッカーゼドメインを含む更なるポリペプチドを含み、ここで、ジンクフィンガー分子は、標的部位の第１の鎖に切れ目を入れるように第１のニッカーゼドメインを導く様式で標的ＤＮＡに結合し；ここで、ＴＡＬエフェクター分子は、第２の鎖に切れ目を入れるように更なるポリペプチドを導く様式で標的部位から距離を置いた部位に結合し、第１のニックの位置及び第２のニックの位置は、ＴＡＬエフェクター分子が結合する部位とジンクフィンガー分子が結合する部位との間に存在する。

【０３４５】

一部の実施形態では、外向きニック方向性において、ＲＴドメインは、（例えば、鋳型ＲＮＡ（例えば、異種目的配列）を用いて）第２の鎖ニックに向けて重合する。一部の実施形態では、内向きニック方向性において、第１及び第２のニックの両方がＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含むポリペプチド（例えば、遺伝子組換えポリペプチド）によって作製される場合、第１のＰＡＭ部位及び第２のＰＡＭ部位は、第１の鎖に対するニックの位置と第２の鎖に対するニックの位置との間に位置づけられる。一部の実施形態では、内向きニック方向性において、ポリペプチド（例えば、遺伝子組換えポリペプチド）及び更なるポリペプチドは、第１鎖に対するニックの位置と第２鎖に対するニックの位置の間の標的ＤＮＡ上の部位に結合する。一部の実施形態では、内向きニック方向性において、第２鎖に対するニックの位置は、第１鎖に対するニックの位置に対する、ポリペプチド及び更なるポリペプチドの結合部位の反対側に位置づけられる。一部の実施形態では、内向きの方向性において、ＰＡＭ部位及び標的部位から距離を置いた部位は、第１鎖に対するニックの位置と第２鎖に対するニックの位置の間に位置づけられる。

【０３４６】

外向きニック方向性を提供する遺伝子組換えシステムの例は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド、第１の鎖上の標的部位ＤＮＡのニッキングを導くｇＲＮＡを含む鋳型ＲＮＡ、及び第１のニックの位置から距離を置いた部位でニッキングを導く更なるｇＲＮＡを含む更なる核酸を含み、第１のニックの位置及び第２のニックの位置は、２つのｇＲＮＡが遺伝子組換えポリペプチドを導く部位のＰＡＭ部位外側に存在する（すなわち、ＰＡＭ部位は、第１のニックの位置と第２のニックの位置との間に存在する）。更なる例として、外向きニック方向性を提供する別の遺伝子組換えシステムは、ジンクフィンガー分子及び第１のニッカーゼドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓドメインを含む更なるポリペプチド並びに第２の鎖上の標的部位ＤＮＡから距離を置いた部位に切れ目を入れるように更なるポリペプチドを導くｇＲＮＡを含む更なる核酸を含み、ここで、ジンクフィンガー分子は、標的部位の第１の鎖に切れ目を入れるように第１のニッカーゼドメインを導く様式で標的ＤＮＡに結合し；第１のニックの位置及び第２のニックの位置は、ＰＡＭ部位及びジンクフィンガー分子が結合する部位の外側に存在する（すなわち、ＰＡＭ部位及びジンクフィンガー分子が結合する部位は、第１のニックの位置と第２のニックの位置との間に存在する）。更なる例として、外向きニック方向性を提供する別の遺伝子組換えシステムは、ジンクフィンガー分子及び第１のニッカーゼドメインを含む遺伝子組換えポリペプチド、ＴＡＬエフェクター分子及び第２のニッカーゼドメインを含む更なるポリペプチドを含み、ここで、ジンクフィンガー分子は、標的部位の第１の鎖に切れ目を入れるように第１のニッカーゼドメインを導く様式で標的ＤＮＡに結合し；ここで、ＴＡＬエフェクター分子は、第２の鎖に切れ目を入れるように更なるポリペプチドを導く様式で標的部位から距離を置いた部位に結合し、第１のニックの位置及び第２のニックの位置は、ＴＡＬエフェクター分子が結合する部位及びジンクフィンガー分子が結合する部位の外側に存在する（すなわち、ＴＡＬエフェクター分子が結合する部位及びジンクフィンガー分子が結合する部位は、第１のニックの位置と第２のニックの位置との間に存在する）。

【０３４７】

特定の理論に束縛されることを意図しないが、第２の鎖ニックが提供される遺伝子組換えシステムの場合、外向きニック方向性が一部の実施形態において好ましいと考えられる

。本明細書に記載のように、内向きニックは、外向きニック方向性より多い数の二本鎖切断（ＤＳＢ）を生成し得る。ＤＳＢは、細胞の核内のＤＳＢ修復経路によって認識され得、望まれない挿入及び欠失を生じ得る。外向きニック方向性は、ＤＳＢ形成のリスク低減、及び対応するより少量の望まれない挿入及び欠失を提供し得る。一部の実施形態では、望まれない挿入及び欠失は、異種目的配列によってコードされない挿入及び欠失、例えば、異種目的配列によってコードされる修飾と無関係の二本鎖切断修復経路によって生成される挿入又は欠失である。一部の実施形態では、所望の遺伝子組換えは、異種目的配列によってコードされる（例えば、異種目的配列を標的部位に書き込む遺伝子組換えによって達成される）標的ＤＮＡに対する改変（例えば、置換、挿入、又は欠失）を含む。一部の実施形態では、第１の鎖ニック及び第２の鎖ニックは、外向きの方向性である。

【０３４８】

更に、第１の鎖ニックと第２の鎖ニックとの間の距離は、所望の遺伝子組換えシステムＤＮＡ修飾が得られる範囲、望まれない二本鎖切断（ＤＳＢ）が生じる範囲、望まれない挿入が生じる範囲、又は望まれない欠失が生じる範囲の１つ又は複数に影響し得る。特定の理論に束縛されることを意図しないが、第２の鎖ニックは、異種目的配列の標的ＤＮＡへの組み込みに向けてＤＮＡ修復をバイアスすることが、第１の鎖ニックと第２の鎖ニックとの間の距離の減少に応じて増加することから有利であると考えられる。しかしながら、第１の鎖ニックと第２の鎖ニックとの間の距離の減少に応じてＤＳＢ形成のリスクも増加すると考えられる。それに応じて、望まれない挿入及び／又は欠失の数が、第１の鎖ニックと第２の鎖ニックとの間の距離の減少に応じて増加し得ると考えられる。一部の実施形態では、第１の鎖ニックと第２の鎖ニックとの間の距離は、異種目的配列の標的ＤＮＡへの組み込みに向けてＤＮＡ修復をバイアスする利点と、ＤＳＢ形成及び望まれない欠失及び／又は挿入のリスクとを均衡させるように選択される。一部の実施形態では、第１の鎖ニック及び第２の鎖ニックが少なくとも閾値距離離れている場合のシステムは、第１のニック及び第２のニックが閾値距離未満離れている場合のそれ以外には同様の内向きニック方向性システムと比較して、所望の遺伝子組換えシステム修飾結果のレベル増加、望まれない欠失のレベル低下、及び／又は望まれない挿入のレベル低下を有する。一部の実施形態では、閾値距離は、以下に与えられる。

【０３４９】

一部の実施形態では、第１のニック及び第２のニックは、少なくとも２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０若しくは２００ヌクレオチド離れている。一部の実施形態では、第１のニック及び第２のニックは、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００若しくは２５０ヌクレオチド以下離れている。一部の実施形態では、第１のニック及び第２のニックは、２０～２００、３０～２００、４０～２００、５０～２００、６０～２００、７０～２００、８０～２００、９０～２００、１００～２００、１１０～２００、１２０～２００、１３０～２００、１４０～２００、１５０～２００、１６０～２００、１７０～２００、１８０～２００、１９０～２００、２０～１９０、３０～１９０、４０～１９０、５０～１９０、６０～１９０、７０～１９０、８０～１９０、９０～１９０、１００～１９０、１１０～１９０、１２０～１９０、１３０～１９０、１４０～１９０、１５０～１９０、１６０～１９０、１７０～１９０、１８０～１９０、２０～１８０、３０～１８０、４０～１８０、５０～１８０、６０～１８０、７０～１８０、８０～１８０、９０～１８０、１００～１８０、１１０～１８０、１２０～１８０、１３０～１８０、１４０～１８０、１５０～１８０、１６０～１８０、１７０～１８０、２０～１７０、３０～１７０、４０～１７０、５０～１７０、６０～１７０、７０～１７０、８０～１７０、９０～１７０、１００～１７０、１１０～１７０、１２０～１７０、１３０～１７０、１４０～１７０、１５０～１７０、１６０～１７０、２０～１６０、３０～１６０、４０～１６０、５０～１６０、６０～１６０、７０～１６０、８０～

１６０、９０～１６０、１００～１６０、１１０～１６０、１２０～１６０、１３０～１６０、１４０～１６０、１５０～１６０、２０～１５０、３０～１５０、４０～１５０、５０～１５０、６０～１５０、７０～１５０、８０～１５０、９０～１５０、１００～１５０、１１０～１５０、１２０～１５０、１３０～１５０、１４０～１５０、２０～１４０、３０～１４０、４０～１４０、５０～１４０、６０～１４０、７０～１４０、８０～１４０、９０～１４０、１００～１４０、１１０～１４０、１２０～１４０、１３０～１４０、２０～１３０、３０～１３０、４０～１３０、５０～１３０、６０～１３０、７０～１３０、８０～１３０、９０～１３０、１００～１３０、１１０～１３０、１２０～１３０、２０～１２０、３０～１２０、４０～１２０、５０～１２０、６０～１２０、７０～１２０、８０～１２０、９０～１２０、１００～１２０、１１０～１２０、２０～１１０、３０～１１０、４０～１１０、５０～１１０、６０～１１０、７０～１１０、８０～１１０、９０～１１０、１００～１１０、２０～１００、３０～１００、４０～１００、５０～１００、６０～１００、７０～１００、８０～１００、９０～１００、２０～９０、３０～９０、４０～９０、５０～９０、６０～９０、７０～９０、８０～９０、２０～８０、３０～８０、４０～８０、５０～８０、６０～８０、７０～８０、２０～７０、３０～７０、４０～７０、５０～７０、６０～７０、２０～６０、３０～６０、４０～６０、５０～６０、２０～５０、３０～５０、４０～５０、２０～４０、３０～４０若しくは２０～３０ヌクレオチド離れている。一部の実施形態では、第１のニック及び第２のニックは、４０～１００ヌクレオチド離れている。

【０３５０】

特定の理論に束縛されることを意図しないが、第２の鎖ニックが提供され、且つ内向きニック方向性が選択される遺伝子組換えシステムの場合、第１の鎖ニックと第２の鎖ニックとの間の距離の増加が好ましいことがあると考えられる。本明細書に記載のように、内向きニック方向性は、外向きニック方向性よりも多い数のＤＳＢを生成し得、外向きニック方向性よりも多い量の望まれない挿入及び欠失をもたらし得るが、ニック間の距離の増加が、ＤＳＢ、望まれない欠失、及び／又は望まれない挿入のそうした増加を緩和し得る。一部の実施形態では、第１のニック及び第２のニックが少なくとも閾値距離離れている場合の内向きニック方向性は、第１のニック及び第２のニックが閾値距離未満離れている場合のそれ以外には同様の内向きニック方向性システムと比較して、所望の遺伝子組換えシステム修飾結果のレベル増加、望まれない欠失のレベル低下、及び／又は望まれない挿入のレベル低下を有する。一部の実施形態では、閾値距離は、以下に与えられる。

【０３５１】

一部の実施形態では、第１の鎖ニック及び第２の鎖ニックは、内向き方向性である。一部の実施形態では、第１の鎖ニック及び第２の鎖ニックは、内向き方向性であり、第１の鎖ニック及び第２の鎖ニックは、少なくとも１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２２０、２４０、２６０、２８０、３００、３５０、４００、４５０若しくは５００ヌクレオチド離れており、例えば、少なくとも１００ヌクレオチド離れている（及び任意選択で５００、４００、３００、２００、１９０、１８０、１７０、１６０、１５０、１４０、１３０若しくは１２０ヌクレオチド以下離れている）。一部の実施形態では、第１の鎖ニック及び第２の鎖ニックは、内向き方向性であり、第１の鎖ニック及び第２の鎖ニックは、１００～２００、１１０～２００、１２０～２００、１３０～２００、１４０～２００、１５０～２００、１６０～２００、１７０～２００、１８０～２００、１９０～２００、１００～１９０、１１０～１９０、１２０～１９０、１３０～１９０、１４０～１９０、１５０～１９０、１６０～１９０、１７０～１９０、１８０～１９０、１００～１８０、１１０～１８０、１２０～１８０、１３０～１８０、１４０～１８０、１５０～１８０、１６０～１８０、１７０～１８０、１００～１７０、１１０～１７０、１２０～１７０、１３０～１７０、１４０～１７０、１５０～１７０、１６０～１７０、１００～１６０、１１０～１６０、１２０～１６０、１３０～１６０、１４０～１６０、１５０～１６０、１００～１５０、１１０～１５０、１２０～１５０、１３０～１５０、１４０～１５０、１００～１４０、１１０～１４

０、１２０～１４０、１３０～１４０、１００～１３０、１１０～１３０、１２０～１３０、１００～１２０、１１０～１２０若しくは１００～１１０ヌクレオチド離れている。

【０３５２】

化学修飾核酸及び核酸末端の特徴

本明細書に記載される核酸（例えば、鋳型核酸、例えば、鋳型ＲＮＡ；又は遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸（例えば、ｍＲＮＡ）；又はｇＲＮＡ）は、非修飾又は修飾核酸塩基を含み得る。天然に存在するＲＮＡは、４つの塩基性リボヌクレオチド：ＡＴＰ、ＣＴＰ、ＵＴＰ及びＧＴＰから合成されるが、転写後修飾ヌクレオチドを含み得る。更に、ＲＮＡにおいて、約１００の異なるヌクレオシド修飾が同定されている（Ｒｏｚｅｎｓｋｉ，Ｊ，Ｃｒａｉｎ，Ｐ，ａｎｄ　ＭｃＣｌｏｓｋｅｙ，Ｊ．（１９９９）．Ｔｈｅ　ＲＮＡ　Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｄａｔａｂａｓｅ：１９９９　ｕｐｄａｔｅ．Ｎｕｃｌ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　２７：１９６－１９７）。ＲＮＡは、天然に存在しない、全体的に合成のヌクレオチドも含み得る。

【０３５３】

一部の実施形態では、化学修飾は、国際公開第２０１６／１８３４８２号パンフレット、米国特許出願公開第２００９０２８６８５２号明細書、国際特許の国際公開第２０１２／０１９１６８号パンフレット、国際公開第２０１２／０４５０７５号パンフレット、国際公開第２０１２／１３５８０５号パンフレット、国際公開第２０１２／１５８７３６号パンフレット、国際公開第２０１３／０３９８５７号パンフレット、国際公開第２０１３／０３９８６１号パンフレット、国際公開第２０１３／０５２５２３号パンフレット、国際公開第２０１３／０９０６４８号パンフレット、国際公開第２０１３／０９６７０９号パンフレット、国際公開第２０１３／１０１６９０号パンフレット、国際公開第２０１３／１０６４９６号パンフレット、国際公開第２０１３／１３０１６１号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６６９号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１７３６号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６７２号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６６４号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６６５号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６６８号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６７１号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６６７号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６７０号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６６６号パンフレット、国際公開第２０１３／１５１６６３号パンフレット、国際公開第２０１４／０２８４２９号パンフレット、国際公開第２０１４／０８１５０７号パンフレット、国際公開第２０１４／０９３９２４号パンフレット、国際公開第２０１４／０９３５７４号パンフレット、国際公開第２０１４／１１３０８９号パンフレット、国際公開第２０１４／１４４７１１号パンフレット、国際公開第２０１４／１４４７６７号パンフレット、国際公開第２０１４／１４４０３９号パンフレット、国際公開第２０１４／１５２５４０号パンフレット、国際公開第２０１４／１５２０３０号パンフレット、国際公開第２０１４／１５２０３１号パンフレット、国際公開第２０１４／１５２０２７号パンフレット、国際公開第２０１４／１５２２１１号パンフレット、国際公開第２０１４／１５８７９５号パンフレット、国際公開第２０１４／１５９８１３号パンフレット、国際公開第２０１４／１６４２５３号パンフレット、国際公開第２０１５／００６７４７号パンフレット、国際公開第２０１５／０３４９２８号パンフレット、国際公開第２０１５／０３４９２５号パンフレット、国際公開第２０１５／０３８８９２号パンフレット、国際公開第２０１５／０４８７４４号パンフレット、国際公開第２０１５／０５１２１４号パンフレット、国際公開第２０１５／０５１１７３号パンフレット、国際公開第２０１５／０５１１６９号パンフレット、国際公開第２０１５／０５８０６９号パンフレット、国際公開第２０１５／０８５３１８号パンフレット、国際公開第２０１５／０８９５１１号パンフレット、国際公開第２０１５／１０５９２６号パンフレット、国際公開第２０１５／１６４６７４号パンフレット、国際公開第２０１５／１９６１３０号パンフレット、国際公開第２０１５／１９６１２８号パンフレット、国際公開第２０１５／１９６１１８号パンフレット、国際公開第２０１６／０１１２２６号パンフレット、国際公開第２０１６／０１１２２２号パンフレット、国

際公開第２０１６／０１１３０６号パンフレット、国際公開第２０１６／０１４８４６号パンフレット、国際公開第２０１６／０２２９１４号パンフレット、国際公開第２０１６／０３６９０２号パンフレット、国際公開第２０１６／０７７１２５号パンフレット、又は国際公開第２０１６／０７７１２３号パンフレット（それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に提供されるものである。化学修飾ヌクレオチドのポリヌクレオチドへの組み込みが、ヌクレオチド中の修飾の位置に応じて、核酸塩基、バックボーン、又は両方に組み込まれている修飾を生じ得ることが理解される。一部の実施形態では、バックボーン修飾は、欧州特許第２８１３５７０号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に提供されるものである。一部の実施形態では、修飾キャップは、米国特許出願公開第２００５０２８７５３９号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に提供されるものである。

【０３５４】

一部の実施形態では、化学修飾核酸（例えば、ＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）は、ＡＲＣＡ：アンチリバースキャップ類似体（ｍ２７．３’－ＯＧＰ３Ｇ）、ＧＰ３Ｇ（非メチル化キャップ類似体）、ｍ７ＧＰ３Ｇ（モノメチル化キャップ類似体）、ｍ３２．２．７ＧＰ３Ｇ（トリメチル化キャップ類似体）、ｍ５ＣＴＰ（５’－メチル－シチジン三リン酸）、ｍ６ＡＴＰ（Ｎ６－メチル－アデノシン－５’－三リン酸）、ｓ２ＵＴＰ（２－チオ－ウリジン三リン酸）、及びΨ（プソイドウリジン三リン酸）の１つ又は複数を含む。

【０３５５】

一部の実施形態では、化学修飾核酸は、５’キャップ、例えば：７－メチルグアノシンキャップ（例えば、Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇキャップ）；過剰メチル化キャップ類似体；ＮＡＤ＋由来のキャップ類似体（例えば、Ｋｉｌｅｄｊｉａｎ，Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２８，４５４－４６４（２０１８）に記載のもの）；又は修飾、例えば、ビオチン化されたキャップ類似体（例えば、Ｂｅｄｎａｒｅｋ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈｉｌ Ｔｒａｎｓ Ｒ Ｓｏｃ Ｂ ３７３，２０１８０１６７（２０１８）に記載のもの）を含む。

【０３５６】

一部の実施形態では、化学修飾核酸は、ポリＡテール；不対の５ヌクレオチドによって隣接された１６ヌクレオチド長のステム－ループ構造（例えば、Ｍａｎｎｉｒｏｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １７，９１１３－９１２６（１９８９）に記載のもの）；三重らせん構造（例えば、Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ １０９，１９２０２－１９２０７（２０１２）に記載のもの）；ｔＲＮＡ、ＹＲＮＡ若しくはヴォールトＲＮＡ構造（例えば、Ｌａｂｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ Ａｃｔａ １８６３，３１２５－３１４７（２０１６）に記載のもの）；１つ又は複数のデオキシリボヌクレオチド三リン酸（ｄＮＴＰｓ）、２’Ｏ－メチル化ＮＴＰ若しくはホスホロチオエート－ＮＴＰの組み込み；単一のヌクレオチド化学修飾（例えば、３’末端リボースの反応性アルデヒドへの酸化とその後のアルデヒド反応性修飾ヌクレオチドのコンジュゲーション）；又は別の核酸分子への化学ライゲーションの１つ又は複数から選択される３’の特徴を含む。

【０３５７】

一部の実施形態では、核酸（例えば、鋳型核酸）は、例えば、ジヒドロウリジン、イノシン、７－メチルグアノシン、５－メチルシチジン（５ｍＣ）、５’リン酸リボチミジン、２’－Ｏ－メチルリボチミジン、２’－Ｏ－エチルリボチミジン、２’－フルオロリボチミジン、Ｃ－５プロピニル－デオキシシチジン（ｐｄＣ）、Ｃ－５プロピニル－デオキシウリジン（ｐｄＵ）、Ｃ－５プロピニル－シチジン（ｐＣ）、Ｃ－５プロピニル－ウリジン（ｐＵ）、５－メチルシチジン、５－メチルウリジン、５－メチルデオキシシチジン、５－メチルデオキシウリジンメトキシ、２，６－ジアミノプリン、５’－ジメトキシトリチル－Ｎ４－エチル－２’－デオキシシチジン、Ｃ－５プロピニル－ｆ－シチジン（ｐｆＣ）、Ｃ－５プロピニル－ｆ－ウリジン（ｐｆＵ）、５－メチルｆ－シチジン、５－メチルｆ－ウリジン、Ｃ－５プロピニル－ｍ－シチジン（ｐｍＣ）、Ｃ－５プロピニル－ｆ－

ウリジン（ｐｍＵ）、５－メチルｍ－シチジン、５－メチルｍ－ウリジン、ＬＮＡ（ロックド核酸）、ＭＧＢ（副溝結合剤）プソイドウリジン（Ψ）、１－Ｎ－メチルプソイドウリジン（１－Ｍｅ－Ψ）、又は５－メトキシウリジン（５－ＭＯ－Ｕ）から選択される１つ又は複数の修飾ヌクレオチドを含む。

【０３５８】

一部の実施形態では、核酸は、バックボーン修飾、例えば、バックボーン中の糖又はリン酸基に対する修飾を含む。一部の実施形態では、核酸は、核酸塩基修飾を含む。

【０３５９】

一部の実施形態では、核酸は、表９の１つ又は複数の化学修飾ヌクレオチド、表１０の１つ又は複数の化学バックボーン修飾、表１１の１つ又は複数の化学修飾キャップを含む。例えば、一部の実施形態では、核酸は、２つ以上（例えば、３、４、５、６、７、８、９、又は１０又はそれ以上）の異なるタイプの化学修飾を含む。例として、核酸は、例えば、本明細書に記載の、例えば、表９中の２つ以上（例えば、３、４、５、６、７、８、９、又は１０又はそれ以上）の異なるタイプの修飾核酸塩基を含み得る。代替的に又は組み合わせて、核酸は、例えば、本明細書に記載の、例えば、表１０中の２つ以上（例えば、３、４、５、６、７、８、９、又は１０又はそれ以上）の異なるタイプのバックボーン修飾を含み得る。代替的に又は組み合わせて、核酸は、例えば、本明細書に記載の、例えば、表１１中の１つ又は複数の修飾キャップを含み得る。例えば、一部の実施形態では、核酸は、１つ若しくは複数のタイプの修飾核酸塩基及び１つ若しくは複数のタイプのバックボーン修飾；１つ若しくは複数のタイプの修飾核酸塩基及び１つ若しくは複数の修飾キャップ；１つ若しくは複数のタイプの修飾キャップ及び１つ若しくは複数のタイプのバックボーン修飾；又は１つ若しくは複数のタイプの修飾核酸塩基、１つ若しくは複数のタイプのバックボーン修飾、及び１つ若しくは複数のタイプの修飾キャップを含む。

【０３６０】

一部の実施形態では、核酸は、１つ又は複数（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、又はそれ以上）の修飾核酸塩基を含む。一部の実施形態では、核酸の全ての核酸塩基が修飾される。一部の実施形態では、核酸は、バックボーン中の１つ又は複数（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、又はそれ以上）の位置で修飾される。一部の実施形態では、核酸の全てのバックボーン位置が修飾される。

【０３６１】

【表９－１】

表9. 修飾ヌクレオチド

5-アザ-ウリジン	N2-メチル-6-チオ-グアノシン
2-チオ-5-アザ-ミジン	N2,N2-ジメチル-6-チオ-グアノシン
2-チオウリジン	ピリジン-4-オンリボヌクレオシド
4-チオ-プソイドウリジン	2-チオ-5-アザ-ウリジン
2-チオ-プソイドウリジン	2-チオミジン(thiomidine)
5-ヒドロキシウリジン	4-チオ-プソイドミジン(pseudomidine)
3-メチルウリジン	2-チオ-プソイドウィジン(pseudowidine)
5-カルボキシメチル-ウリジン	3-メチルミジン
1-カルボキシメチル-プソイドウリジン	1-プロピニル-プソイドミジン
5-プロピニル-ウリジン	1-メチル-1-デアザ-プソイドミジン
1-プロピニル-プソイドウリジン	2-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン
5-タウリノメチルウリジン	4-メトキシ-プソイドミジン
1-タウリノメチル-プソイドウリジン	5'-O-(1-チオホスフェート)-アデノシン
5-タウリノメチル-2-チオ-ウリジン	5'-O-(1-チオホスフェート)-シチジン
1-タウリノメチル-4-チオ-ウリジン	5'-O-(1-チオホスフェート)-グアノシン
5-メチル-ウリジン	5'-O-(1-チオホスフェート)-ウリジン
1-メチル-プソイドウリジン	5'-O-(1-チオホスフェート)-プソイドウリジン
4-チオ-1-メチル-プソイドウリジン	2'-O-メチル-アデノシン
2-チオ-1-メチル-プソイドウリジン	2'-O-メチル-シチジン
1-メチル-1-デアザ-プソイドウリジン	2'-O-メチル-グアノシン
2-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドミジン	2'-O-メチル-ウリジン
ジヒドロウリジン	2'-O-メチル-プソイドウリジン
ジヒドロプソイドウリジン	2'-O-メチル-イノシン
2-チオ-ジヒドロミジン	2-メチルアデノシン
2-チオ-ジヒドロプソイドウリジン	2-メチルチオ-N6-メチルアデノシン
2-メトキシウリジン	2-メチルチオ-N6 イソペンテニルアデノシン
2-メトキシ-4-チオ-ウリジン	2-メチルチオ-N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン
4-メトキシ-プソイドウリジン	N6-メチル-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン
4-メトキシ-2-チオ-プソイドウリジン	N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン
5-アザ-シチジン	2-メチルチオ-N6-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン
プソイドイソシチジン	2'-O-リボシルアデノシン(ホスフェート)
3-メチル-シチジン	1,2'-O-ジメチルイノシン
N4-アセチルシチジン	5,2'-O-ジメチルシチジン
5-ホルミルシチジン	N4-アセチル-2'-O-メチルシチジン
N4-メチルシチジン	ライシジン
5-ヒドロキシメチルシチジン	7-メチルグアノシン
1-メチル-プソイドイソシチジン	N2,2'-O-ジメチルグアノシン
ピロロ-シチジン	N2,N2,2'-O-トリメチルグアノシン
ピロロ-プソイドイソシチジン	2'-O-リボシルグアノシン(ホスフェート)
2-チオ-シチジン	ワイブトシン
2-チオ-5-メチル-シチジン	ペルオキシワイブトシン
4-チオ-プソイドイソシチジン	ヒドロキシワイブトシン
4-チオ-1-メチル-プソイドイソシチジン	未修飾ヒドロキシワイブトシン
4-チオ-1-メチル-1-デアザ-プソイドイソシチジン	メチルワイオシン
1-メチル-1-デアザ-プソイドイソシチジン	キューオシン
ゼブラリン	エポキシキューオシン

【０３６２】

【表９－２】

5-アザ-ゼブラリン	ガラクトシル-キューオシン
5-メチル-ゼブラリン	マンノシル-キューオシン
5-アザ-2-チオ-ゼブラリン	7-シアノ-7-デアザグアノシン
2-チオ-ゼブラリン	7-アミノメチル-7-デアザグアノシン
2-メトキシ-シチジン	アーキオシン
2-メトキシ-5-メチル-シチジン	5,2'-O-ジメチルウリジン
4-メトキシ-プソイドイソシチジン	4-チオウリジン
4-メトキシ-1-メチル-プソイドイソシチジン	5-メチル-2-チオウリジン
2-アミノプリン	2-チオ-2'-O-メチルウリジン
2,6-ジアミノプリン	3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン
7-デアザ-アデニン	5-メトキシウリジン
7-デアザ-8-アザ-アデニン	ウリジン 5-オキシ酢酸
7-デアザ-2-アミノプリン	ウリジン 5-オキシ酢酸メチルエステル
7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン	5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン)
7-デアザ-2,6-ジアミノプリン	5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジンメチルエステル
7-デアザ-8-アザ-2,6-ジアミノプリン	5-メトキシカルボニルメチルウリジン
1-メチルアデノシン	5-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチルウリジン
N6-イソペンテニルアデノシン	5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン
N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン	5-アミノメチル-2-チオウリジン
2-メチルチオ-N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル) アデノシン	5-メチルアミノメチルウリジン
N6-グリシニルカルバモイルアデノシン	5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン
N6-トレオニルカルバモイルアデノシン	5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン
2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン	5-カルバモイルメチルウリジン
N6,N6-ジメチルアデノシン	5-カルバモイルメチル-2'-O-メチルウリジン
7-メチルアデニン	5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン
2-メチルチオ-アデニン	5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-O-メチルウリジン
2-メトキシ-アデニン	5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン
イノシン	N4,2'-O-ジメチルシチジン
1-メチル-イノシン	5-カルボキシメチルウリジン
ワイオシン	N6,2'-O-ジメチルアデノシン
ワイブトシン	N,N6,O-2'-トリメチルアデノシン
7-デアザ-グアノシン	N2,7-ジメチルグアノシン
7-デアザ-8-アザ-グアノシン	N2,N2,7-トリメチルグアノシン
6-チオ-グアノシン	3,2'-O-ジメチルウリジン
6-チオ-7-デアザ-グアノシン	5-メチルジヒドロウリジン
6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン	5-ホルミル-2'-O-メチルシチジン
7-メチル-グアノシン	1,2'-O-ジメチルグアノシン
6-チオ-7-メチル-グアノシン	4-デメチルワイオシン
7-メチルイノシン	イソワイオシン
6-メトキシ-グアノシン	N6-アセチルアデノシン
1-メチルグアノシン	
N2-メチルグアノシン	
N2,N2-ジメチルグアノシン	
8-オキソ-グアノシン	
7-メチル-8-オキソ-グアノシン	
1-メチル-6-チオ-グアノシン	

【０３６３】

【表１０】

表 10. 骨格修飾

2'-O-メチル骨格
ペプチド核酸 (PNA)骨格
ホスホロチオエート骨格
モルホリノ骨格
カルバメート骨格
シロキサン骨格
スルフィド骨格
スルホキシド骨格
スルホン骨格
ホルムアセチル骨格
チオホルムアセチル骨格
メチレンホルムアセチル骨格
リボアセチル骨格
アルケン含有骨格
スルファメート骨格
スルホン酸骨格
スルホンアミド骨格
メチレンイミノ骨格
メチレンヒドラジノ骨格
アミド骨格

【０３６４】

【表１１】

表11. 修飾キャップ

m7GpppA
m7GpppC
m2,7GpppG
m2,2,7GpppG
m7Gpppm7G
m7,2'OmeGpppG
m72'dGpppG
m7,3'OmeGpppG
m7,3'dGpppG
GppppG
m7GppppG
m7GppppA
m7GppppC
m2,7GppppG
m2,2,7GppppG
m7Gppppm7G
m7,2'OmeGppppG
m72'dGppppG
m7,3'OmeGppppG
m7,3'dGppppG

【０３６５】

遺伝子組換えシステムの鋳型を含むヌクレオチドは、天然又は修飾塩基、又はそれらの組合せであり得る。例えば、鋳型は、プソイドウリジン、ジヒドロウリジン、イノシン、７－メチルグアノシン、又は他の修飾塩基を含み得る。一部の実施形態では、鋳型は、ロックド核酸ヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、鋳型中で使用される修飾塩基は、鋳型の逆転写を阻害しない。一部の実施形態では、鋳型中で使用される修飾塩基は、逆転写、例えば、特異性又は忠実度を改善し得る。

【０３６６】

一部の実施形態では、システムのＲＮＡ成分（例えば、鋳型ＲＮＡ又はｇＲＮＡ）は、１つ又は複数のヌクレオチド修飾を含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡの修飾パターンは、（例えば、Ｆｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐ　２２（９）：２２２７－２２３５（２０１８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）からの図１Ｄに示される）非修飾又は末端修飾ガイドと比較して、インビボ活性に有意に影響し得る。特定の理論に束縛されることを意図しないが、このプロセスは、少なくとも部分的には、修飾によって付与されるＲＮＡの安定化に起因し得る。こうした修飾の非限定的な例は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）、２’－０－（２－メトキシエチル）（２’－０－ＭＯＥ）、２’－フルオロ（２’－Ｆ）、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）結合、Ｇ－Ｃ置換並びにヌクレオチド間の逆位脱塩基結合及びそれらの均等物を含み得る。

【０３６７】

一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡ（例えば、標的部位に結合するその１部分）又はガイドＲＮＡは、５’末端領域を含む。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡ又はガイドＲＮＡは、５’末端領域を含まない。一部の実施形態では、５’末端領域は、例えば、ＢｒｉｎｅｒＡＥ　ｅｔ　ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ　５６：３３３－３３９（２０１４）（全体が参照により本明細書に組み込まれる；例えば、全てのガイドＲＮＡに、本明細書で適用可能）中のｓｇＲＮＡに関する記載のように、ｇＲＮＡスペーサー領域を含む。一部の実施形態では、５’末端領域は、５’末端修飾を含む。一部の実施形態では、５’末端領域は、スペーサー領域と共に又はスペーサー領域なしで、ｃｒＲＮＡ、ｔｒＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ及び／又はｄｇＲＮＡと会合され得る。ｇＲＮＡスペーサー領域は、いくつかの事例では、ガイド領域、ガイドドメイン、又は標的ドメインを含み得る。

【０３６８】

一部の実施形態では、本明細書に記載される鋳型ＲＮＡ（例えば、標的部位に結合するその１部分）又はガイドＲＮＡは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の表４に示される配列のいずれかを含

む。一部の実施形態では、配列が、ガイド及び／又はスペーサー領域を示す場合、組成物は、この領域を含んでも又は含まなくてもよい。一部の実施形態では、ガイドＲＮＡは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４に示される、例えば、その中で配列番号によって同定されたような配列のいずれかの修飾の１つ又は複数を含む。複数の実施形態では、ヌクレオチドは、同じであるか又は異なり得、且つ／又は示される修飾パターンは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４に示されるようなガイド配列の修飾パターンに対して同一又は類似であり得る。一部の実施形態では、修飾パターンは、ｇＲＮＡの修飾の相対的位置及び同一性又はｇＲＮＡの領域（例えば５’末端領域、より下流のステム領域、バルジ領域、より上流のステム領域、ネクサス領域、ヘアピン１領域、ヘアピン２領域、３’末端領域）を含む。一部の実施形態では、修飾パターンは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４の配列カラムに示される配列のいずれか１つの、及び／又はその配列の１つ若しくは複数の領域にわたる修飾の少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％を含む。一部の実施形態では、修飾パターンは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４の配列カラムに示される配列のいずれか１つの修飾パターンと、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４に示される配列の１つ又は複数の領域にわたり、例えば、５’末端領域、より下流のステム領域、バルジ領域、より上流のステム領域、ネクサス領域、ヘアピン１領域、ヘアピン２領域、及び／又は３’末端領域において、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、５’末端領域にわたる配列の修飾パターンに対して、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、より下流のステムにわたり、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、バルジにわたり、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、より上流のステムにわたり、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、ネクサスにわたり、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、ヘアピン１にわたり、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、ヘアピン２にわたり、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、３’末端にわたり、少なくとも５０％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４の配列、又はこうした配列の領域（例えば５’末端、より下流のステム、バルジ、より上流のステム、ネクサス、ヘアピン１、ヘアピン２、３’末端）の修飾パターンと、例えば、０、１、２、３、４、５、６、又はそれ以上のヌクレオチドで異なる。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの表４の配列の修飾と、例えば、０、１、２、３、４、５、６、又はそれ以上のヌクレオチドで異なる修飾を含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、国際公開第２０１８１０７０２８Ａ１号パンフレットの

表４の配列の領域（例えば５’末端、より下流のステム、バルジ、より上流のステム、ネクサス、ヘアピン１、ヘアピン２、３’末端）の修飾と、例えば、０、１、２、３、４、５、６、又はそれ以上のヌクレオチドで異なる修飾を含む。

【０３６９】

一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡ（例えば、標的部位に結合するその１部分）又はｇＲＮＡは、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ｍｏｅ）修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、５’末端修飾、３’末端修飾、又は５’及び３’末端修飾を含む。一部の実施形態では、５’末端修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含む。一部の実施形態では、５’末端修飾は、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ＭＯＥ）、及び／又は２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、５’末端修飾は、少なくとも１つのホスホロチオエート（ＰＳ）結合及び２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ＭＯＥ）、及び／又は２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドの１つ又は複数を含む。末端修飾は、ホスホロチオエート（ＰＳ）、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）、２’－Ｏ－（２－メトキシエチル）（２’－Ｏ－ＭＯＥ）、及び／又は２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾を含み得る。等価な末端修飾も、本明細書に記載される実施形態によって包含される。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡ又はｇＲＮＡは、鋳型ＲＮＡ又はｇＲＮＡの１つ又は複数の領域の修飾と組み合わせた末端修飾を含む。ＲＮＡ、例えば、ｇＲＮＡ、及びその組成式を保護するための更なる例示的な修飾及び方法は、国際公開第２０１８１２６１７６Ａ１号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０３７０】

一部の実施形態では、構造－ガイド及び系統学的手法を用いて、例えば、Ｍｉｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｃｏｍｍｕｎ　９：２６４１（２０１８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載のように、鋳型ＲＮＡ又はガイドＲＮＡに修飾（例えば、２’－ＯＭｅ－ＲＮＡ、２’－Ｆ－ＲＮＡ、及びＰＳ修飾）を導入する。一部の実施形態では、２’－Ｆ－ＲＮＡの組み込みは、例えば、Ｃ３’－エンド糖パッカリングに最小限に干渉しながら、ＲＮＡ：ＲＮＡ又はＲＮＡ：ＤＮＡ二本鎖の熱安定性及びヌクレアーゼ安定性を増加させる。一部の実施形態では、２’－Ｆは、２’－ＯＨがＲＮＡ：ＤＮＡ二本鎖安定性に重要である場合の位置で２’－ＯＭｅより優れた耐容性を示し得る。一部の実施形態では、ｃｒＲＮＡは、Ｃａｓ９活性を低下させない１つ又は複数の修飾、例えば、Ｍｉｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｃｏｍｍｕｎ　９：２６４１（２０１８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の補足表１に記載の、例えば、Ｃ１０、Ｃ２０、又はＣ２１（完全に修飾）を含む。一部の実施形態では、ｔｒａｃｒＲＮＡは、Ｃａｓ９活性を低下させない１つ又は複数の修飾、例えば、Ｍｉｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｃｏｍｍｕｎ　９：２６４１（２０１８）の補足表１のＴ２、Ｔ６、Ｔ７、又はＴ８（完全に修飾）を含む。一部の実施形態では、（例えば、本明細書に記載されるような）１つ又は複数の修飾を含むｃｒＲＮＡは、１つ又は複数の修飾、例えば、Ｃ２０及びＴ２を含むｔｒａｃｒＲＮＡと対合され得る。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、例えば、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡのキメラを含む（例えば、Ｊｉｎｅｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　３３７（６０９６）：８１６－８２１（２０１２））。複数の実施形態では、ｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡの修飾は、例えば、安定性が増強された修飾ｇＲＮＡを作製するため、単一ガイドキメラ上にマッピングされる。

【０３７１】

一部の実施形態では、ｇＲＮＡ分子は、天然に存在する構成成分、例えば、ヘアピンの付加又はサブトラクションによって修飾され得る。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、例えば、国際公開第２０１８１０６７２７号パンフレット（その全体が参照により本明細書

に組み込まれる）に記載のように、１つ又は複数の３’ヘアピン要素が欠失されたｇＲＮＡを含み得る。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、付加されたヘアピン構造、例えば、Ｋｏｃａｋ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３７（６）：６５７－６６６（２０１９）の教示内容中でＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの特異性を増加させることが示された、スペーサー領域内に付加されたヘアピン構造を含有し得る。短縮されたｇＲＮＡ及びインビボ活性を改善する特定の修飾の例を含む更なる修飾は、米国特許出願公開第２０１９０３１６１２１号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に見出すことができる。

【０３７２】

一部の実施形態では、構造－ガイド及び系統学的手法（例えば、Ｍｉｒ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ ９：２６４１（２０１８）に記載のとおり；全体が参照により本明細書に組み込まれる）を用いて、鋳型ＲＮＡに対する修飾を見出す。複数の実施形態では、その修飾は、鋳型ＲＮＡのガイド領域の包含又は除外によって同定される。一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡに結合されたポリペプチドの構造を用いて、ＲＮＡの非タンパク質と接触したヌクレオチドを判定し、次に、例えば、ＲＮＡとポリペプチドとの会合を破壊するリスクがより低い修飾について選択することができる。更に、鋳型ＲＮＡ中の二次構造は、ソフトウェアツール、例えば、ｒｎａ．ｕｒｍｃ．ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ．ｅｄｕ／ＲＮＡｓｔｒｕｃｔｕｒｅＷｅｂで利用可能なＲＮＡ構造ツールによってインシリコで予測し（Ｂｅｌｌａｏｕｓｏｖ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４１：Ｗ４７１－Ｗ４７４（２０１３）；その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、例えば、修飾、例えば、ヘアピン、ステム、及び／又はバルジを選択するための二次構造を決定することが可能である。

【０３７３】

組成物及びシステムの作製

当業者に理解されるように、核酸構築物及びタンパク質又はポリペプチド（本明細書に記載されるシステム、構築物及びポリペプチドなど）を設計及び構築する方法は、当技術分野において常用的である。一般に、組換え法が使用され得る。概略については、Ｓｍａｌｅｓ ＆ Ｊａｍｅｓ（Ｅｄｓ．）、Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ），Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２００５）；及びＣｒｏｍｍｅｌｉｎ，Ｓｉｎｄｅｌａｒ ＆ Ｍｅｉｂｏｈｍ（Ｅｄｓ．），Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ（２０１３）を参照されたい。核酸組成物を設計、調製、評価、精製及び操作する方法は、Ｇｒｅｅｎ ａｎｄ Ｓａｍｂｒｏｏｋ（Ｅｄｓ．），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｆｏｕｒｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（２０１２）に記載されている。

【０３７４】

本開示は、部分的に、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチド、本明細書に記載される鋳型核酸、又は両方をコードする核酸、例えば、ベクターを提供する。一部の実施形態では、ベクターは、選択マーカ、例えば、抗生物質耐性マーカを含む。一部の実施形態では、抗生物質耐性マーカは、カナマイシン耐性マーカである。一部の実施形態では、抗生物質耐性マーカは、βラクタム抗生物質に耐性を付与しない。一部の実施形態では、ベクターは、アンピシリン耐性マーカを含まない。一部の実施形態では、ベクターは、カナマイシン耐性マーカを含み、アンピシリン耐性マーカを含まない。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするベクターは、標的細胞ゲノムに組み込まれる（例えば、標的細胞、組織、器官、又は対象への投与時に）。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドをコードするベクターは、標的細胞ゲノムに組み込まれない（例えば、標的細胞、組織、器官、又は対象への投与時に）。一部の実施形態では、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）をコードするベクターは、標的細胞ゲノムに組み込まれない（例え

ば、標的細胞、組織、器官、又は対象への投与時に）。一部の実施形態では、ベクターが、標的細胞ゲノム中の標的部位に組み込まれる場合、選択マーカは、ゲノムに組み込まれない。一部の実施形態では、ベクターが、標的細胞ゲノム中の標的部位に組み込まれる場合、ベクターの維持に関与する遺伝子又は配列（例えば、プラスミド維持遺伝子）は、ゲノムに組み込まれない。一部の実施形態では、ベクターが、標的細胞ゲノム中の標的部位に組み込まれる場合、移入調節配列（例えば、ＡＡＶ由来の、例えば、逆位末端配列）は、ゲノムに組み込まれない。一部の実施形態では、ベクター（例えば、本明細書に記載される遺伝子組換えポリペプチド、本明細書に記載される鋳型核酸、又はその両方をコードする）を標的細胞、組織、器官、又は対象へ投与することにより、前記標的細胞、組織、器官、又は対象のゲノム中の１つ若しくは複数の標的部位へのベクターの１部分の組み込みが起こる。一部の実施形態では、組み込まれた物質を含む標的部位の９９、９５、９０、８０、７０、６０、５０、４０、３０、２０、１０、５、４、３、２若しくは１％未満（例えば、標的部位なし）は、ベクター由来の、選択マーカ（例えば、抗生物質耐性遺伝子）、移入調節配列（例えば、ＡＡＶ由来の、例えば、逆位末端配列）、又は両方を含む。

【０３７５】

本明細書に記載される医薬用タンパク質又はポリペプチドを生産する例示的な方法は、哺乳動物細胞での発現を含むが、適切なプロモータの制御下の昆虫細胞、酵母、細菌、又は他の細胞を用いて、組換えタンパク質を生産することもできる。哺乳動物発現ベクターは、非転写因子、例えば、複製起点、好適なプロモータ、並びに他の５’若しくは３’フランキング非転写配列、並びに５’若しくは３’非翻訳配列、例えば必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー及びアクセプター部位並びに終結配列を含み得る。ＳＶ４０ウイルスゲノム由来のＤＮＡ配列、例えばＳＶ４０オリジン、アーリープロモータ、スプライス、及びポリアデニル化部位を使用して、異種ＤＮＡ配列の発現に必要な他の遺伝因子を提供することができる。細菌、真菌、酵母、及び哺乳動物細胞宿主での使用に適切なクローニング及び発現ベクターは、Ｇｒｅｅｎ ＆ Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｆｏｕｒｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（２０１２）に記載されている。

【０３７６】

様々な哺乳動物細胞培養システムを使用して、組換えタンパク質を発現させ、製造することができる。哺乳動物発現システムの例として、ＣＨＯ、ＣＯＳ、ＨＥＫ２９３、ＨｅＬＡ、及びＢＨＫ細胞株が挙げられる。タンパク質治療薬生産のための宿主細胞培養方法は、Ｚｈｏｕ ａｎｄ Ｋａｎｔａｒｄｊｉｅｆｆ（Ｅｄｓ．），Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ ｆｏｒ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ（Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ／Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ），Ｓｐｒｉｎｇｅｒ（２０１４）に記載されている。本明細書に記載される組成物は、組換えタンパク質をコードするベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターを含み得る。一部の実施形態では、ベクター、例えば、ウイルスベクターは、組換えタンパク質をコードする核酸を含み得る。

【０３７７】

タンパク質治療薬の精製は、Ｆｒａｎｋｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ，Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｓｔａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２０１３）；及びＣｕｔｌｅｒ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ），Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２０１０）に記載されている。

【０３７８】

本開示は、遺伝子組換えポリペプチド及び／又はゲノム標的部位に対する特異性を有する鋳型核酸分子（例えば、鋳型ＲＮＡ）の作製のための組成物及び方法も提供する。一態

様では、本方法は、上流の相同性セグメント、異種目的配列セグメント、遺伝子組換えポリペプチド結合モチーフ、及びｇＲＮＡセグメントを含むＲＮＡセグメントの作製を含む。

【０３７９】

用途

治療用途

一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを用いて、細胞（例えば、動物細胞、植物細胞、又は真菌細胞）を修飾することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを用いて、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）を修飾することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを用いて、家畜動物（例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ラマ、アルパカ、ラクダ、ヤク、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、又はダチョウ）由来の細胞を修飾することができる。一部の実施形態では、例えば、動物細胞、例えば、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）、植物細胞、又は真菌細胞を修飾するために、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを、実験ツール若しくは研究ツールとして使用するか、又は実験方法若しくは研究方法に使用することができる。

【０３８０】

コーディング遺伝子をＲＮＡ配列鋳型に組み込むことにより、例えば、機能喪失型変異を有する個体において治療導入遺伝子の発現を提供することにより、機能獲得型変異を正常な導入遺伝子で置換することにより、機能獲得型変異発現を排除するために調節配列を提供することにより、及び／又は作動可能に連結された遺伝子、導入遺伝子及びそのシステムの発現を制御することにより、遺伝子組換えシステムは、治療ニーズに対処することができる。特定の実施形態では、ＲＮＡ配列鋳型は、宿主細胞の治療ニーズに特異的なプロモータ領域、例えば組織特異的プロモータ又はエンハンサーをコードする。更に他の実施形態では、プロモータは、コーディング配列と作動可能に連結させることができる。

【０３８１】

一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、標的遺伝子の発現（例えば、転写又は翻訳）を増加又は減少させる。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、プロモータ又はエンハンサー内の配列、例えば転写因子に結合する配列を改変し、付加し、又は欠失させることにより、標的遺伝子の発現（例えば、転写又は翻訳）を増加又は減少させる。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、標的遺伝子の翻訳を改変し（例えば、アミノ酸配列を改変し）、開始若しくは停止コドンを挿入するか若しくは欠失させ、遺伝子の翻訳フレームを改変若しくは修復する。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、例えば、スプライスアクセプター又はドナー部位を挿入し、欠失させ、又は改変することにより、標的遺伝子のスプライシングを改変する。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、転写物又はタンパク質の半減期を改変する。一部の実施形態では、挿入、欠失、置換、又はそれらの組合せは、標的遺伝子、例えば、標的遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を改変し、増加させ、減少させる。

【０３８２】

代償性編集（ｃｏｍｐｅｎｓａｔｏｒｙ　ｅｄｉｔ）

一部の実施形態では、本明細書に提供されるシステム又は方法を用いて、代償性編集を導入することができる。一部の実施形態では、代償性編集は、疾患を引き起こす突然変異の位置と異なる、疾患又は障害に関連する遺伝子の位置に存在する。一部の実施形態では、代償性突然変異は、原因突然変異を含む遺伝子中に存在しない。一部の実施形態では、代償性編集は、疾患を引き起こす突然変異を無効にするか又は代償し得る。一部の実施形態では、代償性編集は、本明細書に提供されるシステム又は方法によって導入され、疾患を引き起こす突然変異の変異体の効果を抑制し、又は元に戻すことができる。

【０３８３】

調節編集

一部の実施形態では、本明細書に提供されるシステム又は方法を用いて、調節編集を導入することができる。一部の実施形態では、調節編集は、遺伝子の調節配列、例えば、遺伝子プロモータ、遺伝子エンハンサー、遺伝子リプレッサ、又は遺伝子スプライシングを制御する配列に導入される。一部の実施形態では、調節編集は、標的遺伝子の発現レベルを増加又は減少させる。一部の実施形態では、標的遺伝子は、疾患を引き起こす突然変異を含む遺伝子と同じである。一部の実施形態では、標的遺伝子は、疾患を引き起こす突然変異を含む遺伝子と異なる。

【０３８４】

リピート伸長病

一部の実施形態では、本明細書に提供されるシステム又は方法を用いて、リピート伸長病を処置することができる。一部の実施形態では、本明細書に提供されるシステム又は方法、例えば、遺伝子組換えポリペプチドを含むものを用いて、カスタマイズされたＲＮＡ鋳型に従う遺伝子座でリピートの数をリセットすることにより、リピート伸長病を処置することができる。

【０３８５】

治療適応症

一部の実施形態では、本明細書に提供されるシステム又は方法を用いて、以下の表１２～１５のいずれかの適応症を処置することができる。例えば、一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、細胞内のゲノムＤＮＡ中の標的部位を修飾し、ここで、標的部位は、表１２～１５のいずれかの遺伝子中、例えば、表１２～１５のいずれかに列記される対応する適応症を有する対象中に存在する。一部の実施形態では、細胞は、肝細胞であり、且つ標的部位は、表１２の遺伝子中、例えば、表１２に列記される対応する適応症を有する対象中に存在する。一部の実施形態では、細胞は、造血幹細胞（ＨＳＣ）であり、且つ標的部位は、表１３の遺伝子中、例えば、表１３に列記される対応する適応症を有する対象中に存在する。一部の実施形態では、細胞は、中枢神経系（ＣＮＳ）細胞であり、且つ標的部位は、表１４の遺伝子中、例えば、表１４に列記される対応する適応症を有する対象中に存在する。一部の実施形態では、細胞は、眼の細胞であり、且つ標的部位は、表１５の遺伝子中、例えば、表１５に列記される対応する適応症を有する対象中に存在する。一部の実施形態では、標的部位は、遺伝子のコード領域内に存在する。一部の実施形態では、標的部位は、プロモータ内に存在する。一部の実施形態では、標的部位は、表１２～１５のいずれかの遺伝子の５’ＵＴＲ又は３’ＵＴＲ内に存在する。一部の実施形態では、標的部位は、遺伝子のイントロン又はエクソン内に存在する。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、遺伝子中の突然変異を修正する。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、（例えば、疾患を引き起こす突然変異を通じて）遺伝子から欠失されていた配列を挿入する。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、（例えば、疾患を引き起こす突然変異を通じて）遺伝子中で重複されていた配列を欠失させる。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、突然変異（例えば、疾患を引き起こす突然変異）を対応する野生型配列と置換する。一部の実施形態では、突然変異は、置換、挿入、欠失、又は逆位である。

【０３８６】

【表１２－１】

表 12: 例えば肝臓における適応症及び遺伝的標的

疾患	疾患遺伝子
急性間欠性ポルフィリン症	HMBS
α1 アンチトリプシン欠損症 (AAT)	SERPINA1
アルギナーゼ欠損症	ARG1
アルギニノコハク酸尿症	ASL
カルバモイルホスフェートシンテターゼ I 欠損症	CPS1
シトリン欠損症	SLC25A13
シトルリン血症 I 型	ASS1
クリグラー・ナジャー症候群 (高ビリルビン血症)	UGT1A1
ファブリー病	GLA
家族性高コレステロール血症 4 (ホモ接合性家族性コレステロール血症)	LDLRAP1
グルタル酸血症 I 型	GCDH
グルタル酸血症 II 型 (多種アシル CoA 脱水素酵素欠損症)	GA IIA: ETFA GA IIB: ETFB GA IIC: ETFDH
糖原病 IV 型	GBE1
血友病 A	F8
血友病 B	F9
遺伝性ヘモクロマトーシス	HFE
ホモシスチン尿症	CBS
メープルシロップ尿症 (MSUD)	Ia 型: BCKDHA Ib 型: BCKDHB II 型: DBT
メチルマロン酸血症 (メチルマロニル-CoA ムターゼ欠損症)	MMUT
MPS 1S (シャイエ症候群)	IDUA
MPS2	IDS
MPS3 (サンフィリッポ症候群)	IIIa 型: SGSH IIIb 型: NAGLU IIIc 型: HGSNAT IIId 型: GNS
MPS4	IVA 型: GALNS IVB 型: GLB1

【０３８７】

【表１２－２】

疾患	疾患遺伝子
MPS6	ARSB
MPS7	GUSB
オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	OTC
フェニルケトン尿症（フェニルアラニン水酸化酵素欠損症）	PAH
多嚢胞肝	PCLD1: PRKCSH PCLD2: SEC63 PLCD3: ALG8 PCLD4: LRP5
ポンペ病	GAA
原発性高シュウ酸尿症１型（シュウ酸症）	AGXT
進行性家族性肝内胆汁うっ滞症１型	ATP8B1
進行性家族性肝内胆汁うっ滞症２型	ABCB11
進行性家族性肝内胆汁うっ滞症３型	ABCB4
プロピオン酸血症	PCCB; PCCA
ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損症	PC
高チロシン血症Ｉ型	FAH
ウィルソン病	ATP7B

【０３８８】

【表１３】

表 13: HSC における適応症及び遺伝的標的

疾患	疾患遺伝子
副腎白質ジストロフィー（CALD）	ABCD1
αマンノース症	MAN2B1
ブラックファン・ダイアモンド貧血	
先天性無巨核球性血小板減少症	MPL
先天性角化異常症	TERC
ファンコニ貧血	FANC
ゴーシェ病	GBA
グロボイド細胞白質ジストロフィー（クラッベ病）	GALC
血球貪食性リンパ組織球症	PRF1; STX11; STXBP2; UNC13D
悪性小児性大理石骨病-常染色体劣性大理石骨病	多くの遺伝子が関連する
異染性白質ジストロフィー	PSAP
MPS 1S (シャイエ症候群)	IDUA
MPS2	IDS
MPS7	GUSB
ムコリピドーシスII型	GNPTAB
ニーマン・ピック病Ａ型及びＢ型	SMPD1
ニーマン・ピック病Ｃ型	NPC1
ポンペ病	GAA
ピルビン酸キナーゼ欠損症（PKD）	PKLR
鎌状赤血球症（SCD）	HBB
テイ・サックス病	HEXA
サラセミア	HBB

【０３８９】

【表１４】

表 14: CNS における適応症及び遺伝的標的

疾患	疾患遺伝子
α マンノース症	MAN2B1
血管拡張性失調症	ATM
CADASIL	NOTCH3
カナバン病	ASPA
カルバモイルホスフェートシンテターゼ 1 欠損症	CPS1
CLN1 病	PPT1
CLN2 病	TPP1
CLN3 病（若年型神経セロイドリポフスチン症、バッテン病）	CLN3
コフィン・ローリー症候群	RPS6KA3
先天性筋無力症候群 5 型	COLQ
コルネリア・デ・ランゲ症候群（NIPBL）	NIPBL
コルネリア・デ・ランゲ症候群（SMC1A）	SMC1A
ドラベ症候群（SCN1A）	SCN1A
グリシン脳症（GLDC）	GLDC
GM1 ガングリオシドーシス	GLB1
ハンチントン病	HTT
シルビウス水道狭窄を伴う水頭症	L1CAM
リー症候群	SURF1
異染性白質ジストロフィー（ARSA）	ARSA
ムコ多糖症 2 型	IDS
ムコ多糖症 3 型	3a 型: SGSH 3b 型: NAGLU
ムコリピドーシス IV 型	MCOLN1
神経線維腫症 1 型	NF1
神経線維腫症 2 型	NF2
パントテン酸キナーゼ関連神経変性症	PANK2
ピリドキシン依存性てんかん	ALDH7A1
レット症候群（MECP2）	MECP2
サンドホフ病	HEXB
意味性認知症（前頭側頭型認知症）	MAPT
軸索型ニューロパチーを伴う脊髄小脳失調症(眼球運動失行を伴う失調症)	SETX
テイ・サックス病	HEXA
X 連鎖副腎白質ジストロフィー	ABCD1

【０３９０】

【表１５】

表 15: 眼における適応症及び遺伝的標的

疾患	疾患遺伝子
色覚異常	CNGB3
先天性黒内障 (LCA1)	GUCY2D
先天性黒内障 (LCA10)	CEP290
先天性黒内障 (LCA2)	RPE65
先天性黒内障 (LCA8)	CRB1
全脈絡膜萎縮	CHM
錐体杆体ジストロフィー (ABCA4)	ABCA4
錐体杆体ジストロフィー (GUCY2D)	GUCY2D
シスチン症、眼性非腎症性	CTNS
Doyne 蜂巣状網膜ジストロフィー (DHRD)	EFEMP1
家族性眼軟膜アミロイドーシス	TTR
角膜炎･魚鱗癬･難聴 (KID)	GJB2
格子状角膜ジストロフィーI 型	TGFBI
斑状角膜ジストロフィー (MCD)	CHST6
メースマン角膜ジストロフィー	KRT12; KRT3
視神経萎縮症	OPA1
網膜色素変性症 (AR)	USH2A
網膜色素変性症 (AD)	RHO
ソースビー眼底変性症	TIMP3
シュタルガルト病	ABCA4

【０３９１】

植物への適用

一部の実施形態では、本明細書に提供されるシステム又は方法を用いて、例えば、植物の適応度を高めるために、植物又は植物部分（例えば、葉、根、花、果実若しくは種子）を修飾することができる。

【０３９２】

植物への送達

本明細書には、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを植物に送達する方法が提供される。植物、又はその部分を、遺伝子組換えシステムと接触させることにより、植物に遺伝子組換えシステムを送達する方法が含まれる。これらの方法は、例えば、植物の適応度を高める目的で、植物を修飾するために有用である。

【０３９３】

より具体的には、一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸（例えば、遺伝子組換えシステムをコードする核酸）は、ベクター内でコードされ得、例えば、植物ベクター（例えば、ｐＨＵＣ４１１）中の植物プロモータ、例えば、トウモロコシユビキチンプロモータ（ＺｍＵＢＩ）に隣接して挿入され得る。一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸は、アグロバクテリア（ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉａ）を介して、植物（例えば、ジャポニカ米（ｊａｐｏｎｉｃａ　ｒｉｃｅ））又は植物の一部（例えば、植物のカルス）に導入される。一部の実施形態では、植物遺伝子（例えば、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ（ＨＰＴ））をヌルアレル（例えば、開始コドンに塩基置換を含む）で置換することにより、本明細書に記載されるシステム及び方法を植物に使用することができる。植物ゲノムを修飾するためのシステム及び方法は、Ｘｕ　ｅｔ．ａｌ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　ｏｆ　ｐｌａｎｔ　ｐｒｉｍｅ－ｅｄｉｔｉｎｇ　ｓｙｓｔｅｍｓ　ｆｏ

ｒ ｐｒｅｃｉｓｅ ｇｅｎｏｍｅ ｅｄｉｔｉｎｇ，２０２０，Ｐｌａｎｔ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓに記載されている。

【０３９４】

一態様では、植物の適応度を高める方法が本明細書に提供され、この方法は、非処置の植物（例えば、遺伝子組換えシステムを送達されていない植物）と比較して、植物の適応度を高めるために、本明細書に記載される遺伝子組換えシステムを（例えば、有効な量及び期間で）植物に送達することを含む。

【０３９５】

遺伝子組換えシステムの送達の結果としての植物の適応度増大は、いくつかの方法で維持することができ、例えば、それにより、植物の生産改善、例えば、収率の向上、植物の成長力若しくは植物から収穫された産物の品質の向上、農業若しくは園芸に関して望ましいとみなされる収穫前後の特徴（例えば、味、外観、貯蔵寿命）の改善、又はそれ以外にヒトに有益な特徴改善（例えば、アレルゲン生成の低減）が達成される。植物の収率改善は、同じ条件下であるが、本組成物の適用なしで生産された植物の同じ産物の収率に対して又は従来の植物修飾剤の適用と比較して、測定可能な量による、植物の産物の収率の増加（例えば、植物バイオマス、穀粒、種子若しくは果実収率、タンパク質含量、炭水化物若しくは油含量又は葉面積により測定可能な）に関する。例えば、収率は、少なくとも約０．５％、約１％、約２％、約３％、約４％、約５％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約１００％、又は１００％超増加し得る。いくつかの事例では、本方法は、非処置植物と比較して、収率を約２倍、５倍、１０倍、２５倍、５０倍、７５倍、１００倍、又は１００倍超増加するのに有効である。収率は、植物の重量若しくは体積、又は何らかの基準に基づく植物の産物に関して表すことができる。基準は、時間、栽培面積、生産される植物の重量、又は使用される原材料の量に関して表すことができる。例えば、こうした方法は、限定されないが、種子、果実、穀粒、実、塊茎、根、及び葉などの植物組織の収率を増加し得る。

【０３９６】

遺伝子組換えシステムの送達の結果としての植物の適応度増大は、他の手段、例えば、同じ条件下であるが、本組成物の投与なしで、又は従来の植物修飾剤を適用して、生産された植物の産物の同じ要因と比較して、測定可能若しくは認識可能な量による、成長力評価、群落（面積単位当たりの植物の数）、植物の高さ、茎の状況、茎の長さ、葉の数、葉のサイズ、林冠、外観（例えば、濃い緑色の葉の色など）、根評価、出芽、タンパク質含量、分けつ増加、葉のサイズの増加、葉の増加、根出葉の減少、より強い新芽、必要な肥料の減少、必要な種子の減少、より生産性の高い新芽、より早い開花、より早い穀粒若しくは種子成熟、植物の傾き（ｖｅｒｓｅ）（倒伏）の減少、シュートの成長増大、より早期の発芽、又はこれらの要因の任意の組合せの増大若しくは改善によって測定することもできる。

【０３９７】

従って、本明細書には、植物を修飾する方法が提供され、この方法は、本明細書に提供される遺伝子組換えシステムのいずれかを有効な量で植物に送達することを含み、ここで、上記方法は、植物を修飾し、それにより、非処置植物と比較して、植物に有益な特徴を導入するか、又はそれを（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加する。特に、本方法は、非処置植物と比較して、植物適応度を（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加し得る。

【０３９８】

いくつかの事例では、植物適応度の増加は、疾患耐性、干ばつ耐性、耐熱性、耐寒性、耐塩性、金属耐性、除草剤耐性、薬剤耐性、水使用効率、窒素利用、窒素ストレス耐性、窒素固定、害虫耐性、草食動物耐性、病原体耐性、収率、水制限条件下での収率、成長力、成長、光合成能力、栄養、タンパク質含量、炭水化物含量、油含量、バイオマス、シュ

ート長さ、根長さ、根構造、種子重量、又は収穫可能な産物の量の（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％若しくは１００％超の）増加である。

【０３９９】

いくつかの事例では、適応度の増加は、発育、成長、収率、非生物ストレス源に対する耐性、又は生物ストレス源に対する耐性の（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％若しくは１００％超の）増加である。非生物ストレスは、植物又は植物部分が被る環境ストレス条件を指し、例えば、干ばつストレス、塩ストレス、熱ストレス、低温ストレス、及び低栄養ストレスが挙げられる。生物ストレスは、植物又は植物部分が被る環境ストレス条件を指し、例えば、線虫ストレス、草食昆虫ストレス、真菌病原体ストレス、細菌性病原体ストレス、又はウイルス病原体ストレスが挙げられる。ストレスは、一過性、例えば、数時間、数日、数ヶ月の場合もあれば、又は永続的、例えば、植物の寿命にわたる場合もある。

【０４００】

いくつかの事例では、植物適応度の増加は、植物から収穫される産物の品質の（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超の）増加である。例えば、植物適応度の増加は、植物から収穫される産物の商業的に好ましい特徴（例えば、味又は外観）の改善であり得る。他の事例では、植物適応度の増加は、植物から収穫される産物の貯蔵寿命の（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超の）増加である。

【０４０１】

代わりに、適応度の増加は、ヒト又は動物の健康に対して有益な特徴の改変、例えば、アレルゲン生成の低減であり得る。例えば、適応度の増加は、動物（例えば、ヒト）の免疫応答を刺激するアレルゲン（例えば、花粉）の生成の（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超の）低減であり得る。

【０４０２】

植物の修飾（例えば、適応度の増加）は、１つ又は複数の植物部分の修飾から起こり得る。例えば、植物は、植物の葉、種子、花粉、根、果実、シュート、花、細胞、プロトプラスト、又は組織（例えば、分裂組織）を接触させることにより、修飾することができる。従って、別の態様では、植物の適応度を増加する方法が本明細書に提供され、この方法は、有効量の本明細書における植物修飾組成物のいずれかと植物の花粉を接触させることを含み、この方法は、非処置植物と比較して、植物の適応度を（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加する。

【０４０３】

また別の態様では、植物の適応度を増加する方法が本明細書に提供され、この方法は、有効量の本明細書に開示の遺伝子組換えシステムのいずれかと植物の種子を接触させることを含み、この方法は、非処置植物と比較して、植物の適応度を（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加する。

【０４０４】

別の態様では、有効量の本明細書に記載の遺伝子組換えシステムのいずれかと植物のプロトプラストを接触させることを含む方法が本明細書に提供され、この方法は、非処置植物と比較して、植物の適応度を（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加する。

【０４０５】

更に別の態様では、植物の適応度を増加する方法が本明細書に提供され、この方法は、

有効量の本明細書に記載の遺伝子組換えシステムのいずれかと植物の植物細胞を接触させることを含み、この方法は、非処置植物と比較して、植物の適応度を（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加する。

【０４０６】

別の態様では、植物の適応度を増加する方法が本明細書に提供され、この方法は、有効量の本明細書における植物修飾組成物のいずれかと植物の分裂組織を接触させることを含み、この方法は、非処置植物と比較して、植物の適応度を（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加する。

【０４０７】

別の態様では、植物の適応度を増加する方法が本明細書に提供され、この方法は、有効量の本明細書における植物修飾組成物のいずれかと植物の胚を接触させることを含み、この方法は、非処置植物と比較して、植物の適応度を（例えば、約１％、２％、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又は１００％超）増加する。

【０４０８】

植物投与方法

本明細書に記載の植物は、組成物を植物に送達又は投与することを可能にする任意の好適な様式で、本明細書に記載の遺伝子組換えシステム組成物のいずれかに曝露することができる。遺伝子組換えシステムは、単独で、又は他の活性（例えば、肥料）若しくは非活性物質と組み合わせて送達され得、例えば有効濃度の植物修飾組成物を送達するために製剤化された濃縮液、ゲル、溶液、懸濁液、スプレー、粉末、ペレット、ブリケット、ブリックなどの形態において、噴霧、注入（例えば、マイクロインジェクション）、植物を媒介して注ぎ込み、浸漬することにより、適用することができる。本明細書に記載の組成物の適用のための量及び位置は、一般に、植物の生息地、植物修飾組成物により植物をターゲティングすることができる生活環段階、適用を実施しようとする部位並びに植物修飾組成物の物理的及び機能的特性により決定する。

【０４０９】

いくつかの事例では、組成物は、例えば、バックパック噴霧、空中噴霧、作物噴霧／散布などにより、植物、例えば、作物に直接噴霧する。遺伝子組換えシステムを植物に送達する場合、遺伝子組換えシステムを受ける植物は、植物成長の任意の段階であり得る。例えば、製剤化された植物修飾組成物を植物成長の早期段階で種子コーティング若しくは根処理として、又は作物サイクルの後期段階での全植物処理として適用することができる。いくつかの事例では、植物修飾組成物は、植物に対する局所薬剤として適用され得る。

【０４１０】

更に、遺伝子組換えシステムは、植物の組織を通して吸収及び分布される浸透性薬剤として（例えば、植物が成長する土壌に、又は植物の水遣りに使用する水に）適用され得る。いくつかの事例では、遺伝子組換えシステムを発現するように、植物又はえさ生物を遺伝子的に形質転換することもできる。

【０４１１】

また、溶解性若しくは生体内分解性コーティング層、例えば、ゼラチンで、遺伝子組換えシステム又は植物修飾組成物を含む組成物をコーティングすることにより、遅延又は連続的放出を達成することも可能であり、上記のコーティングは、使用環境内で溶解又は分解し、その後、植物修飾システム位置が利用可能になるか、又は溶解性若しくは分解性マトリックス中に薬剤を分散することによっても達成することができる。こうした連続的放出及び／又は分散は、デバイスを有利に使用して、本明細書に記載の植物修飾組成物の１つ又は複数の有効濃度を一定に維持し得ることを意味する。

【０４１２】

いくつかの事例では、遺伝子組換えシステムを、植物の一部、例えば、その葉、種子、

花粉、根、果実、シュート、若しくは花、若しくは組織、細胞又はプロトプラストに送達する。いくつかの事例では、遺伝子組換えシステムを、植物の細胞に送達する。いくつかの事例では、遺伝子組換えシステムを、植物のプロトプラストに送達する。いくつかの事例では、遺伝子組換えシステムを、植物の組織に送達する。例えば、植物の分裂組織（例えば、頂端分裂組織、側方分裂組織、又は介在分裂組織）に組成物を送達することもできる。いくつかの事例では、植物の永久組織（例えば、単組織（例えば、柔組織、厚角組織若しくは厚膜組織）又は複合永久組織（例えば、木部若しくは師部））に組成物を送達する。いくつかの事例では、植物胚に遺伝子組換えシステムを送達する。

【０４１３】

植物

本明細書に記載の遺伝子組換えシステムで処置するために、多様な植物に送達することができる。本方法に従って遺伝子組換えシステムを送達する（すなわち、「処置する」）ことができる植物は、全植物及び植物部分を含み、そうしたものとして、限定されないが、シュート栄養器官／構造（例えば、葉、茎及び塊茎）、根、花及び花器官／構造（例えば、苞葉、萼片、花弁、雄蕊、心皮、葯及び胚珠）、種子（胚、胚乳、子葉、及び種皮を含む）並びに果実（成熟卵胞）、植物組織（例えば、維管束組織、基本組織など）並びに細胞（例えば、孔辺細胞、卵細胞など）並びにそれらの子孫が挙げられる。植物部分は、更に、シュート、根、茎、種子、托葉、葉、花弁、花、胚珠、苞葉、枝、葉柄、節間、樹皮、軟毛、新芽、根茎、葉状体、（イネ科植物の）葉、花粉、雄蕊などの植物の部分も指す。

【０４１４】

本明細書に開示される方法で処置することができる植物のクラスは、高等及び下等植物のクラスを含み、被子植物（単子葉及び双子葉植物）、裸子植物、シダ、ツクシ、古生マツバラン（ｐｓｉｌｏｐｈｙｔｅ）、小葉植物、コケ植物、及び藻類（例えば、多細胞又は単細胞藻類）が挙げられる。本方法に従って処置することができる植物は更に、任意の維管束植物、例えば、単子葉若しくは双子葉植物、又は裸子植物を含み、限定されないが、以下のものが挙げられる：アルファルファ、リンゴ、シロイヌナズナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）、バナナ、カノーラ、トウゴマ、キク、クローバー、カカオ、コーヒー、綿、綿実、トウモロコシ、ハマナ（ｃｒａｍｂｅ）、クランベリー、キュウリ、デンドロビウム（ｄｅｎｄｒｏｂｉｕｍ）、ヤマノイモ、ユーカリ、ウシノケグサ、亜麻、グラジオラス、リリアセア（ｌｉｌｉａｃｅａ）、亜麻仁、キビ、マスクメロン、カラシ、オートムギ、アブラヤシ、アブラナ、ピーナッツ、パイナップル、観賞植物、インゲンマメ（Ｐｈａｓｅｏｌｕｓ）、ジャガイモ、ナタネ、コメ、ライムギ、ライグラス、サフラワー、ゴマ、モロコシ、ダイズ、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ、イチゴ、タバコ、トマト、シバ、コムギ並びにレタス、セロリ、ブロッコリー、カリフラワー、ウリ科植物（ｃｕｃｕｒｂｉｓ）などの野菜作物；リンゴ、ナシ、モモ、オレンジ、グレープフルーツ、レモン、ライム、アーモンド、ペカン、クルミ、ヘーゼルなどの果実及び堅果樹；ブドウ（例えば、ブドウ園）、キーウィ、ホップなどのつる植物；ラズベリー、ブラックベリー、グーズベリーなどの果実低木及びブランブル；トネリコ、マツ、モミ、カエデ、オーク、クリ、ポプラなどの森林樹；並びにアルファルファ、カノーラ、トウゴマ、トウモロコシ、綿、ハマナ（ｃｒａｍｂｅ）、亜麻、亜麻仁、カラシ、アブラヤシ、アブラナ、ピーナッツ、ジャガイモ、コメ、サフラワー、ゴマ、ダイズ、テンサイ、ヒマワリ、タバコ、トマト、及びコムギ。本明細書に開示される方法に従って処置することができる植物は、あらゆる作物植物、例えば、飼料作物、油糧種子作物、穀粒作物、果物作物、野菜作物、繊維作物、香辛料作物、ナッツ作物、芝土作物、糖料作物、飲料作物、及び森林作物を含む。特定の事例では、本方法で処置される作物植物は、ダイズ植物である。他の特定の事例では、作物植物は、コムギである。他の特定の事例では、作物植物は、トウモロコシである。他の特定の事例では、作物植物は、綿である。特定の事例では、作物植物は、アルファルファである。特定の事例では、作物植物は、テンサイである。特定の事例では、作物植物は、コメである。特定の事例では、作物植物は、ジャガイモである。特定の事例では、作

物植物は、トマトである。

【０４１５】

特定の事例では、植物は、作物である。こうした作物植物の例として、限定されないが、単子葉及び双子葉植物が挙げられ、限定されないが、下記のものから選択される飼料若しくは飼い葉用マメ科植物、観賞植物、食用作物、樹木、又は低木を含む：カエデ属種（Ａｃｅｒ　ｓｐｐ．）、アリウム属種（Ａｌｌｉｕｍ　ｓｐｐ．）、アマランサス属種（Ａｍａｒａｎｔｈｕｓ　ｓｐｐ．）、パイナップル（Ａｎａｎａｓ　ｃｏｍｏｓｕｓ）、セロリ（Ａｐｉｕｍ　ｇｒａｖｅｏｌｅｎｓ）、ラッカセイ属種（Ａｒａｃｈｉｓ　ｓｐｐ）、アスパラガス（Ａｓｐａｒａｇｕｓ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ）、サトウダイコン（Ｂｅｔａ　ｖｕｌｇａｒｉｓ）、アブラナ属種（Ｂｒａｓｓｉｃａ　ｓｐｐ．）（例えば、セイヨウアブラナ（Ｂｒａｓｓｉｃａ　ｎａｐｕｓ）、ブラッシカ・ラパ種（Ｂｒａｓｓｉｃａ　ｒａｐａ　ｓｓｐ．）（カノーラ、アブラナ（ｏｉｌｓｅｅｄ　ｒａｐｅ）、ナバナ（ｔｕｒｎｉｐ　ｒａｐｅ））、カメリア・シネンシス（Ｃａｍｅｌｌｉａ　ｓｉｎｅｎｓｉｓ）、ダンドク（Ｃａｎｎａ　ｉｎｄｉｃａ）、アサ（Ｃａｎｎａｂｉｓ　ｓａｔｉｖａ）、トウガラシ属種（Ｃａｐｓｉｃｕｍ　ｓｐｐ．）、クリ属種（Ｃａｓｔａｎｅａ　ｓｐｐ．）、エンダイブ（Ｃｉｃｈｏｒｉｕｍ　ｅｎｄｉｖｉａ）、スイカ（Ｃｉｔｒｕｌｌｕｓ　ｌａｎａｔｕｓ）、シトラス属種（Ｃｉｔｒｕｓ　ｓｐｐ．）、ココス属種（Ｃｏｃｏｓ　ｓｐｐ．）、コーヒーノキ属種（Ｃｏｆｆｅａ　ｓｐｐ．）、コリアンダー（Ｃｏｒｉａｎｄｒｕｍ　ｓａｔｉｖｕｍ）、ハシバミ属種（Ｃｏｒｙｌｕｓ　ｓｐｐ．）、クラタエグス属種（Ｃｒａｔａｅｇｕｓ　ｓｐｐ．）、カボチャ属種（Ｃｕｃｕｒｂｉｔａ　ｓｐｐ．）、ククミス属種（Ｃｕｃｕｍｉｓ　ｓｐｐ．）、ニンジン（Ｄａｕｃｕｓ　ｃａｒｏｔａ）、ブナ属種（Ｆａｇｕｓ　ｓｐｐ．）、イチジク（Ｆｉｃｕｓ　ｃａｒｉｃａ）、フラガリア属種（Ｆｒａｇａｒｉａ　ｓｐｐ．）、イチョウ（Ｇｉｎｋｇｏ　ｂｉｌｏｂａ）、ダイズ属種（Ｇｌｙｃｉｎｅ　ｓｐｐ．）（例えば、グリシン・マックス（Ｇｌｙｃｉｎｅ　ｍａｘ）、ソーヤ・ヒスピダ（Ｓｏｊａ　ｈｉｓｐｉｄａ）若しくはソーヤ・マックス（Ｓｏｊａ　ｍａｘ））、リクチワタ（Ｇｏｓｓｙｐｉｕｍ　ｈｉｒｓｕｔｕｍ）、ヒマワリ属種（Ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ　ｓｐｐ．）（例えば、ヒマワリ（Ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ　ａｎｎｕｕｓ））、ハイビスカス属種（Ｈｉｂｉｓｃｕｓ　ｓｐｐ．）、オオムギ属種（Ｈｏｒｄｅｕｍ　ｓｐｐ．）（例えば、オオムギ（Ｈｏｒｄｅｕｍ　ｖｕｌｇａｒｅ））、サツマイモ（Ｉｐｏｍｏｅａ　ｂａｔａｔａｓ）、クルミ属種（Ｊｕｇｌａｎｓ　ｓｐｐ．）、レタス（Ｌａｃｔｕｃａ　ｓａｔｉｖａ）、アマ（Ｌｉｎｕｍ　ｕｓｉｔａｔｉｓｓｉｍｕｍ）、レイシ（Ｌｉｔｃｈｉ　ｃｈｉｎｅｎｓｉｓ）、ミヤコグサ属種（Ｌｏｔｕｓ　ｓｐｐ．）、トカドヘチマ（Ｌｕｆｆａ　ａｃｕｔａｎｇｕｌａ）、ルピナス属種（Ｌｕｐｉｎｕｓ　ｓｐｐ．）、トマト属種（Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ　ｓｐｐ．）（例えば、トマト（Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ　ｅｓｃｕｌｅｎｔｕｒｎ）、リコペルシコン・リコペルシカム（Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ　ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｕｍ）、リコペルシコン・ピリフォルメ（Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ　ｐｙｒｉｆｏｒｍｅ））、リンゴ属種（Ｍａｌｕｓ　ｓｐｐ．）、ムラサキウマゴヤシ（Ｍｅｄｉｃａｇｏ　ｓａｔｉｖａ）、ハッカ属種（Ｍｅｎｔｈａ　ｓｐｐ．）、ススキ（Ｍｉｓｃａｎｔｈｕｓ　ｓｉｎｅｎｓｉｓ）、クロミグワ（Ｍｏｒｕｓ　ｎｉｇｒａ）、バショウ種種（Ｍｕｓａ　ｓｐｐ．）、タバコ属種（Ｎｉｃｏｔｉａｎａ　ｓｐｐ．）、オリーブ属種（Ｏｌｅａ　ｓｐｐ．）、オリザ属種（Ｏｒｙｚａ　ｓｐｐ．）（例えば、イネ（Ｏｒｙｚａ　ｓａｔｉｖａ）、オリザ・ラティフォリア（Ｏｒｙｚａ　ｌａｔｉｆｏｌｉａ））、キビ（Ｐａｎｉｃｕｍ　ｍｉｌｉａｃｅｕｍ）、スイッチグラス（Ｐａｎｉｃｕｍ　ｖｉｒｇａｔｕｍ）、パッションフルーツ（Ｐａｓｓｉｆｌｏｒａ　ｅｄｕｌｉｓ）、イタリアンパセリ（Ｐｅｔｒｏｓｅｌｉｎｕｍ　ｃｒｉｓｐｕｍ）、インゲンマメ属種（Ｐｈａｓｅｏｌｕｓ　ｓｐｐ．）、マツ属種（Ｐｉｎｕｓ　ｓｐｐ．）、ピスタチオ（Ｐｉｓｔａｃｉａ　ｖｅｒａ）、エンドウ属種（Ｐｉｓｕｍ　ｓｐｐ．）、イチゴツナギ属種（Ｐｏａ　ｓｐｐ．）、ハコヤナギ属種（Ｐｏｐｕｌｕｓ　ｓｐｐ．）、サクラ属種（Ｐｒｕｎｕｓ　ｓｐｐ．）、セイヨウナシ（Ｐｙｒｕｓ　ｃｏｍｍｕｎｉｓ

）、コナラ属種（Ｑｕｅｒｃｕｓ　ｓｐｐ．）、ラディッシュ（Ｒａｐｈａｎｕｓ　ｓａｔｉｖｕｓ）、ショクヨウダイオウ（Ｒｈｅｕｍ　ｒｈａｂａｒｂａｒｕｍ）、スグリ属種（Ｒｉｂｅｓ　ｓｐｐ．）、トウゴマ（Ｒｉｃｉｎｕｓ　ｃｏｍｍｕｎｉｓ）、キイチゴ属種（Ｒｕｂｕｓ　ｓｐｐ．）、サトウキビ属種（Ｓａｃｃｈａｒｕｍ　ｓｐｐ．）、ヤナギ属種（Ｓａｌｉｘ　ｓｐ．）、ニワトコ属種（Ｓａｍｂｕｃｕｓ　ｓｐｐ．）、ライムギ（Ｓｅｃａｌｅ　ｃｅｒｅａｌｅ）、ゴマ属種（Ｓｅｓａｍｕｍ　ｓｐｐ．）、シナピス属種（Ｓｉｎａｐｉｓ　ｓｐｐ．）、ナス属種（Ｓｏｌａｎｕｍ　ｓｐｐ．）（例えば、ジャガイモ（Ｓｏｌａｎｕｍ　ｔｕｂｅｒｏｓｕｍ）、ヒラナス（Ｓｏｌａｎｕｍ　ｉｎｔｅｇｒｉｆｏｌｉｕｍ）若しくはトマト（Ｓｏｌａｎｕｍ　ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｕｍ））、モロコシ（Ｓｏｒｇｈｕｍ　ｂｉｃｏｌｏｒ）、セイバンモロコシ（Ｓｏｒｇｈｕｍ　ｈａｌｅｐｅｎｓｅ）、ホウレンソウ属種（Ｓｐｉｎａｃｉａ　ｓｐｐ．）、タマリンディス・インディカ（Ｔａｍａｒｉｎｄｕｓ　ｉｎｄｉｃａ）、テオブロマ・カカオ（Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ　ｃａｃａｏ）、トリフォリウム属種（Ｔｒｉｆｏｌｉｕｍ　ｓｐｐ．）、トリチコセケル・リンパウイ（Ｔｒｉｔｉｃｏｓｅｃａｌｅ　ｒｉｍｐａｕｉ）、コムギ属種（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ｓｐｐ．）（例えば、コムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ａｅｓｔｉｖｕｍ）、デュラムコムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ｄｕｒｕｍ）、ベットコムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ｔｕｒｇｉｄｕｍ）、トリチカム・ヒベルナム（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ｈｙｂｅｒｎｕｍ）、トリチカム・マチャ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ｍａｃｈａ）、トリチカム・サチバム（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ｓａｔｉｖｕｍ）若しくはリチカム・ブルガレ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ　ｖｕｌｇａｒｅ））、スノキ属種（Ｖａｃｃｉｎｉｕｍ　ｓｐｐ．）、ソラマメ属種（Ｖｉｃｉａ　ｓｐｐ．）、ササゲ属種（Ｖｉｇｎａ　ｓｐｐ．）、ニオイスミレ（Ｖｉｏｌａ　ｏｄｏｒａｔａ）、ブドウ属種（Ｖｉｔｉｓ　ｓｐｐ．）並びにトウモロコシ（Ｚｅａ　ｍａｙｓ）。特定の実施形態では、作物植物は、コメ、アブラナ、カノーラ、ダイズ、トウモロコシ（トウモロコシ）、綿、サトウキビ、アルファルファ、モロコシ、又はコムギである。

【０４１６】

本発明で使用される植物又は植物部分は、植物発育のあらゆる段階の植物を含む。特定の事例では、送達は、発芽、苗成長、栄養成長、及び生殖成長の段階中に行うことができる。特定の事例では、植物への送達は、栄養及び生直成長段階の間に行う。いくつかの事例では、組成物は、植物の花粉に送達する。いくつかの事例では、植物の種子に組成物を送達する。いくつかの事例では、植物のプロトプラストに組成物を送達する。いくつかの事例では、植物の組織に組成物を送達する。例えば、植物の分裂組織（例えば、頂端分裂組織、側方分裂組織、又は介在分裂組織）に組成物を送達することもできる。いくつかの事例では、植物の永久組織（例えば、単組織（例えば、柔組織、厚角組織若しくは厚膜組織）又は複合永久組織（例えば、木部若しくは師部））に組成物を送達する。いくつかの事例では、植物胚に組成物を送達する。いくつかの事例では、植物細胞に組成物を送達する。栄養及び生殖成長の段階は、本明細書において、「成体」又は「成熟」植物とも呼ばれる。

【０４１７】

遺伝子組換えシステムを植物部分に送達する事例では、植物修飾剤により植物部分を修飾し得る。代わりに、遺伝子組換えシステムを植物の他の部分に分布させ（例えば、植物の循環系によって）、その後、それらの部分を植物修飾剤により修飾する。

【０４１８】

投与及び送達

本明細書に記載される組成物及びシステムは、インビトロ又はインビボで使用され得る。一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、例えば、インビトロ又はインビボで細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞）に送達される。一部の実施形態では、細胞は、真核細胞、例えば、多細胞生物、例えば、植物又は動物、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ブタ、ウシ）、鳥類（例えば、家禽類、例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、又はアヒル）、又は魚類の細胞である。一部の実施形態では、細胞は、非ヒト動物

細胞（例えば、実験動物、家畜動物、又はコンパニオンアニマル）である。一部の実施形態では、細胞は、幹細胞（例えば、造血幹細胞）、線維芽細胞、又はＴ細胞である。一部の実施形態では、細胞は、免疫細胞、例えば、Ｔ細胞（例えば、Ｔｒｅｇ、ＣＤ４、ＣＤ８、γδ、又はメモリーＴ細胞）、Ｂ細胞（例えば、メモリーＢ細胞又は形質細胞）、又はＮＫ細胞である。一部の実施形態では、細胞は、非分裂細胞、例えば、非分裂線維芽細胞又は非分裂Ｔ細胞である。一部の実施形態では、細胞は、ＨＳＣであり、ｐ５３は上方制御されないか、又は例えば、ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０４８６０７号明細書の実施例３０に記載の方法に従って決定されるように、１０％、５％、２％、又は１％未満上方制御される。当業者は、遺伝子組換えシステムの成分が、ポリペプチド、核酸（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ）、及びそれらの組合せの形態で送達され得ることが理解されるであろう。

【０４１９】

一実施形態では、システム及び／又はシステムの成分は、核酸として送達される。例えば、遺伝子組換えポリペプチドは、ポリペプチドをコードするＤＮＡ又はＲＮＡの形態で送達され得、鋳型ＲＮＡは、ＲＮＡ又はＲＮＡに転写されるその相補的ＤＮＡの形態で送達され得る。一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、１、２、３、４、又はそれ以上の個別の核酸分子上で送達される。一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、ＤＮＡ及びＲＮＡの組合せとして送達される。一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、ＤＮＡ及びタンパク質の組合せとして送達される。一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、ＲＮＡ及びタンパク質の組合せとして送達される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドは、タンパク質として送達される。

【０４２０】

一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、ベクターを用いて、細胞、例えば哺乳動物細胞又はヒト細胞に送達される。ベクターは、例えば、プラスミド又はウイルスであり得る。一部の実施形態では、送達は、インビボ、インビトロ、エクスビボ、又はインサイチュである。一部の実施形態では、ウイルスは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レンチウイルス、又はアデノウイルスである。一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、ウイルス様粒子又はビロソームを用いて細胞に送達される。一部の実施形態では、送達は、２つ以上のウイルス、ウイルス様粒子又はビロソームを使用する。

【０４２１】

一実施形態では、本明細書に記載される組成物及びシステムは、リポソーム又は他の類似の小胞中に製剤化することができる。リポソームは、内部水性コンパートメントを取り囲む単層又は多重層脂質二重膜と、及び比較的不透過性の外側親油性リン脂質二重膜から構成される球状の小胞構造である。リポソームは、アニオン性、中性又はカチオン性であり得る。リポソームは、生体適合性、非毒性であり、親水性及び親油性薬物分子の両方を送達し、それらのカーゴをプラズマ酵素による分解から保護すると共に、それらのロードを生体膜及び血液脳関門（ＢＢＢ）を介して輸送することができる（例えば、論評については、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照）。

【０４２２】

小胞は、いくつかの異なるタイプの脂質から製造することができるが；薬物担体としてリポソームを作製するためにはリン脂質が最も一般的に使用される。多重層小胞脂質の調製方法は、当技術分野で公知である（例えば、米国特許第６，６９３，０８６号明細書を参照、多重層小胞脂質の調製に関するその教示内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。脂質膜を水溶液と混合すれば、小胞形成は自然に起こり得るが、ホモジナイザー、超音波発生装置、又は押出機を用いて振盪の形態で力を加えることにより、それを促進することもできる（例えば、論評については、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１

／４６９６７９を参照）。押出脂質は、Ｔｅｍｐｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ，１５：６４７－６５２，１９９７（押出脂質調製に関するその教示内容は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、サイズ漸減フィルターを介した押出により調製することができる。

【０４２３】

リポソーム、脂質ナノ粒子、カチオン性脂質ナノ粒子、イオン化可能な脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、金ナノ粒子、デンドリマー、シクロデキストリンナノ粒子、ミセル、又は前述の組み合わせなどの、様々なナノ粒子を送達に使用できる。

【０４２４】

脂質ナノ粒子は、本明細書に記載される医薬組成物のための生体適合性及び生分解性送達系を提供する担体の一例である。ナノ構造脂質担体（ＮＬＣ）は、ＳＬＮの特徴を保持し、薬物安定性及び負荷容量を向上させると共に、薬物漏出を防ぐ、修飾固体脂質ナノ粒子（ＳＬＮ）である。ポリマーナノ粒子（ＰＮＰ）は、薬物送達の重要な成分である。これらのナノ粒子は、特定の標的に対して薬物送達を効果的に指向し、薬物安定性及び薬物放出制御を改善することができる。脂質－ポリマーナノ粒子（ＰＬＮ）、すなわちリポソーム及びポリマーを組み合わせたタイプの担体も使用し得る。これらのナノ粒子は、ＰＮＰ及びリポソームの相補的利点を有する。ＰＬＮは、コア－シェル構造から構成され；ポリマーコアは、安定した構造を提供し、リン脂質シェルは良好な生体適合性を賦与する。このように、２つの成分は、薬物封入効率を高め、表面修飾を促進すると共に、水溶性薬物の漏出を防ぐ。例えば、論評については、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．２０１７，Ｎａｎｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ７，１２２；ｄｏｉ：１０．３３９０／ｎａｎｏ７０６０１２２を参照されたい。

【０４２５】

本明細書に記載される組成物及びシステム用の薬物送達ビヒクルとしてエクソソームを使用することもできる。論評については、Ｈａ ｅｔ ａｌ．Ｊｕｌｙ ２０１６．Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａ Ｓｉｎｉｃａ Ｂ．Ｖｏｌｕｍｅ ６，Ｉｓｓｕｅ ４，Ｐａｇｅｓ ２８７－２９６；ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ａｐｓｂ．２０１６．０２．００１を参照されたい。

【０４２６】

フソソームは、標的細胞と相互作用して、それと融合することから、様々な分子の送達ビヒクルとして用いることができる。フソソームは、一般に、管腔又は空洞を封入する両親媒性脂質の二重層及び両親媒性脂質二重層と相互作用するフソゲンからなる。フソゲン成分は、融合及びペイロード送達のための標的細胞特異性を付与し、プログラム可能な細胞特異性を備える送達ビヒクルの作製を可能にするために操作可能であることが示されている（例えば国際公開第２０２００１４２０９号パンフレットを参照されたい。フソソーム設計、調製、及び使用に関するその教示は、参照により本明細書に組み込まれる）。

【０４２７】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムのタンパク質成分は、鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）と事前に結合され得る。例えば、一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドを初めに鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）と組み合わせて、リボヌクレオタンパク質（ＲＮＰ）複合体を形成し得る。一部の実施形態では、ＲＮＰは、例えば、トランスフェクション、ヌクレオフェクション、ウイルス、小胞、ＬＮＰ、エクソソーム、フソソームを介して、細胞に送達され得る。

【０４２８】

遺伝子組換えシステムは、細胞、組織及び多細胞生物に導入され得る。一部の実施形態では、システム又はシステムの成分は、機械的手段又は物理的手段を用いて、細胞に送達される。

【０４２９】

タンパク質治療薬の製剤化は、Ｍｅｙｅｒ（Ｅｄ．），Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｒｕｇ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ：Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ

ｔｏ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，ａｎｄ ｔｈｅ Ｃｌｉｎｉｃ，Ｗｏｏｄｈｅａｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｓｅｒｉｅｓ（２０１２）に記載されている。

【０４３０】

組織特異的活性／投与

一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステムは、オフターゲット細胞又は組織において活性を制限するために、１つ又は複数の特徴（例えば、プロモータ又はｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位）を利用することができる。

【０４３１】

一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ又は鋳型ＲＮＡをコードするＤＮＡ）は、プロモータ配列、例えば、組織特異的プロモータ配列を含む。一部の実施形態では、組織特異的プロモータを用いて、遺伝子組換えシステムの標的細胞特異性を増加させる。例えば、プロモータは、標的細胞型において活性があるが、非標的細胞型において活性がない（又はより低いレベルで活性がある）ことに基づいて選択され得る。従って、プロモータが非標的細胞のゲノムに組み込まれても、それは、組み込まれた遺伝子の発現を駆動することはない（又は低レベルの発現を駆動するに過ぎない）。更に、鋳型ＲＮＡ中に組織特異的プロモータ配列を有するシステムは、例えば、本明細書に記載のように、例えば、鋳型ＲＮＡ又は遺伝子組換えタンパク質をコードする核酸において、ｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位と組み合わせて使用され得る。鋳型ＲＮＡ中に組織特異的プロモータ配列を有するシステムは、例えば、標的細胞内で、非標的細胞内よりも高いレベルの遺伝子組換えタンパク質を得るため、組織特異的プロモータによって駆動される、遺伝子組換えポリペプチドをコードするＤＮＡと組み合わせても使用され得る。一部の実施形態では、例えば、肝臓の適応症の場合、組織特異的プロモータは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０２００１４２０９号パンフレットの表３から選択される。

【０４３２】

一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ又は鋳型ＲＮＡをコードするＤＮＡ）は、ｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位を含む。一部の実施形態では、ｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位を用いて、遺伝子組換えシステムの標的細胞特異性を増加させる。例えば、ｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位は、非標的細胞型内に存在するが、標的細胞型内に存在しない（又は非標的細胞と比較して低下したレベルで存在する）ｍｉＲＮＡによって認識されることに基づいて選択され得る。従って、鋳型ＲＮＡが非標的細胞内に存在する場合、それはｍｉＲＮＡによって結合されることになり、鋳型ＲＮＡが標的細胞内に存在する場合、それはｍｉＲＮＡによって結合されない（又は専ら非標的細胞と比較して低下したレベルで結合される）ことになる。特定の理論に束縛されることを意図しないが、ｍｉＲＮＡの鋳型ＲＮＡへの結合は、その活性に干渉することがあり、例えば、異種目的配列のゲノムへの挿入に干渉することがある。従って、このシステムであれば、標的細胞のゲノムを、それが非標的細胞のゲノムを編集する場合よりも効率的に編集することになり、例えば、異種目的配列であれば、標的細胞のゲノムに、非標的細胞のゲノムに挿入されるよりも効率的に挿入されることになり、又は挿入若しくは欠失は、標的細胞において、非標的細胞におけるよりも効率的に生成される。更に、鋳型ＲＮＡ（又はそれをコードするＤＮＡ）中にｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位を有するシステムは、遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸と組み合わせて使用され得、ここで、遺伝子組換えポリペプチドの発現は、例えば、本明細書に記載されるように、第２のｍｉｃｒｏＲＮＡ結合部位によって調節される。一部の実施形態では、例えば、肝臓の適応症の場合、ｍｉＲＮＡは、国際公開第２０２００１４２０９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の表４から選択される。

【０４３３】

一部の実施形態では、鋳型ＲＮＡは、ｍｉｃｒｏＲＮＡ配列、ｓｉＲＮＡ配列、ガイドＲＮＡ配列、又はｐｉｗｉ　ＲＮＡ配列を含む。

【０４３４】
プロモータ
一部の実施形態では、１つ若しくは複数のプロモータ又はエンハンサーを、遺伝子組換えタンパク質をコードする核酸、又は例えば、異種目的配列の発現を制御する鋳型核酸と作動可能に連結する。特定の実施形態では、１つ若しくは複数のプロモータ又はエンハンサーは、細胞型若しくは組織特異的エレメントを含む。一部の実施形態では、プロモータ又はエンハンサーは、同じであるか、又は異種目的配列の発現を天然で制御するプロモータ若しくはエンハンサーに由来する。例えば、オルニチントランスカルボミラーゼプロモータ及びエンハンサーを用いて、オルニチントランスカルボミラーゼ欠失を補正するために本発明により提供されるシステム若しくは方法におけるオルニチントランスカルボミラーゼ遺伝子の発現を制御することができる。一部の実施形態では、プロモータは、表１６又は１７のプロモータ又はその機能性断片若しくは変異体である。
【０４３５】
市販されている例示的な組織特異的プロモータは、例えば、ＵＲＬ（例えば、ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ．ｃｏｍ／ｔｉｓｓｕｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ－ｐｒｏｍｏｔｅｒｓ）に見出すことができる。一部の実施形態では、プロモータは、ネイティブプロモータ又は最小プロモータ（例えば、所与の遺伝子の５’領域からの単一断片から構成されるもの）である。一部の実施形態では、ネイティブプロモータは、コアプロモータとその天然の５’ＵＴＲを含む。一部の実施形態では、５’ＵＴＲは、イントロンを含む。他の実施形態では、これらは、起源の異なるプロモータを組み合わせるか、又は同じ起源の最小プロモータと共に遠位エンハンサーをアセンブリングすることにより作製された複合プロモータを含む。
【０４３６】
例示的な細胞又は組織特異的プロモータを以下の表に記載し、それらをコードする例示的な核酸は、当技術分野で公知であり、様々なリソース、例えば、ＲｅｆＳｅｑ．を含むＮＣＢＩデータベース並びにＥｕｋａｒｙｏｔｉｃ　Ｐｒｏｍｏｔｅｒ　Ｄａｔａｂａｓｅ（／／ｅｐｄ．ｅｐｆｌ．ｃｈ／／ｉｎｄｅｘ．ｐｈｐ）を用いて、容易に入手することができる。
【０４３７】

【表１６】

表 16. 例示的な細胞又は組織特異的プロモータ

プロモータ	標的細胞
B29 プロモータ	B 細胞
CD14 プロモータ	単球性細胞
CD43 プロモータ	白血球及び血小板
CD45 プロモータ	造血細胞
CD68 プロモータ	マクロファージ
デスミンプロモータ	筋肉細胞
エラスターゼ-1 プロモータ	膵腺房細胞
エンドグリンプロモータ	内皮細胞
フィブロネクチンプロモータ	分化細胞、治癒再生組織
Flt-1 プロモータ	内皮細胞
GFAP プロモータ	星状膠細胞
GPIIB プロモータ	巨核球
ICAM-2 プロモータ	内皮細胞
INF-β プロモータ	造血細胞
Mb プロモータ	筋肉細胞
Nphs1 プロモータ	ポドサイト
OG-2 プロモータ	骨芽細胞、象牙芽細胞(Odonblasts)
SP-B プロモータ	肺
Syn1 プロモータ	ニューロン
WASP プロモータ	造血細胞
SV40/bAlb プロモータ	肝臓
SV40/bAlb プロモータ	肝臓
SV40/Cd3 プロモータ	白血球及び血小板
SV40/CD45 プロモータ	造血細胞
NSE/RU5'プロモータ	成熟ニューロン

【０４３８】

【表１７－１】

表 17.更なる例示的な細胞又は組織特異的プロモータ

プロモータ	遺伝子記述	遺伝子特異性
APOA2	アポリポタンパク質 A-II	肝細胞 (肝細胞前駆体由来)
SERPINA1 (hAAT)	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレード A (α1 抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン)、メンバー1 (別名:α1 アンチトリプシン)	肝細胞 (胚体内胚葉期からの)
CYP3A	チトクロム P450、ファミリー3、サブファミリーA、ポリペプチド	成熟肝細胞
MIR122	MicroRNA 122	肝細胞 (初期胚性肝細胞由来) 及び内胚葉
膵臓特異的プロモータ		
プロモータ	**遺伝子記述**	**遺伝子特異性**
INS	インスリン	膵 β 細胞 (胚体内胚葉期からの)
IRS2	インスリン受容体基質 2	膵 β 細胞
Pdx1	膵臓及び十二指腸ホメオボックス 1	膵臓 (胚体内胚葉期からの)
Alx3	アリスタレス(Aristaless)様ホメオボックス 3	膵 β 細胞 (胚体内胚葉期からの)
Ppy	膵ポリペプチド	PP 膵細胞 (ガンマ細胞)
心臓特異的プロモータ		
プロモータ	**遺伝子記述**	**遺伝子特異性**
Myh6 (aMHC)	ミオシン、重鎖 6、心筋、α	心筋細胞の後期分化マーカ (心房特異性)
MYL2 (MLC-2v)	ミオシン、軽鎖 2、調節、心臓、低速	心筋細胞の後期分化マーカ (心室特異性)
ITNNl3 (cTnl)	トロポニン I タイプ 3 (心臓)	心筋細胞 (未成熟な状態からの)
ITNNl3 (cTnl)	トロポニン I タイプ 3 (心臓)	心筋細胞 (未成熟な状態からの)

【０４３９】

【表１７－２】

プロモータ	遺伝子記述	遺伝子特異性
NPPA (ANF)	ナトリウム利尿ペプチド前駆体 A (別名:心房性ナトリウム利尿因子)	成体細胞における心房特異性
Slc8a1 (Ncx1)	溶質キャリアファミリー8 (ナトリウム/カルシウム交換体)、メンバー1	初期発生段階由来の心筋細胞
CNS 特異的プロモータ		
SYN1 (hSyn)	シナプシン I	ニューロン
GFAP	グリア線維酸性タンパク質	星状膠細胞
INA	インターネキシンニューロン中間径フィラメントタンパク質、α (a-インターネキシン)	神経前駆細胞
NES	ネスチン	神経前駆細胞及び外肺葉
MOBP	ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質	オリゴデンドロサイト
MBP	ミエリン塩基性タンパク質	オリゴデンドロサイト
TH	チロシンヒドロキシラーゼ	ドーパミン作動性ニューロン
FOXA2 (HNF3β)	フォークヘッドボックス A2	ドーパミン作動性ニューロン (内肺葉のマーカとしても使用される)
皮膚特異的プロモータ		
プロモータ	**遺伝子記述**	**遺伝子特異性**
FLG	フィラグリン	顆粒層由来のケラチノサイト
K14	ケラチン 14	顆粒層及び基底層由来のケラチノサイト
TGM3	トランスグルタミナーゼ 3	顆粒層由来のケラチノサイト
免役細胞特異的プロモータ		
プロモータ	**遺伝子記述**	**遺伝子特異性**
ITGAM (CD11B)	インテグリン、αM (補体成分 3 受容体 3 サブユニット)	単球、マクロファージ、顆粒球、ナチュラルキラー細胞
尿生殖器細胞特異的プロモータ		
プロモータ	**遺伝子記述**	**遺伝子特異性**
Pbsn	プロバシン	前立腺上皮
Upk2	ウロプラキン 2	膀胱
Sbp	スペルミン結合タンパク質	前立腺
Fer1l4	Fer-1 様 4	膀胱
内皮細胞特異的プロモータ		
プロモータ	**遺伝子記述**	**遺伝子特異性**
ENG	エンドグリン	内皮細胞
多能性細胞及び胚性細胞特異的プロモータ		

【０４４０】

【表１７－３】

プロモータ	遺伝子記述	遺伝子特異性
Oct4 (POU5F1)	POU クラス 5 ホメオボックス 1	多能性細胞 (生殖細胞、ES 細胞、iPS 細胞)
NANOG	Nanog ホメオボックス	多能性細胞 (ES 細胞、iPS 細胞)
合成 Oct4	Oct-4 コアエンハンサーエレメントに基づく合成プロモータ	多能性細胞 (ES 細胞、iPS 細胞)
T ブラキュリ	ブラキュリ(Brachyury)	中胚葉
NES	ネスチン	神経前駆細胞及び外肺葉
SOX17	SRY (染色体性決定領域 Y)-ボックス 17	内肺葉
FOXA2 (HNFJ β)	フォークヘッドボックス A2	内肺葉 (ドーパミン作動性ニューロンのマーカとしても使用される)
MIR122	MicroRNA 122	内肺葉及び肝細胞 (初期胚性肝細胞由来～

【０４４１】

使用される宿主／ベクターシステムに応じて、構成性及び誘導性プロモータ、転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含め、いくつかの好適な転写及び翻訳制

御エレメントのいずれも発現ベクターに使用し得る（例えば、Ｂｉｔｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１５３：５１６－５４４を参照されたい；尚、その全体が、参照により本明細書に組み込まれる）。

【０４４２】

一部の実施形態では、遺伝子組換えタンパク質をコードする核酸又は鋳型核酸は、制御エレメント、例えば、プロモータなどの転写制御エレメントと作動可能に連結される。転写制御エレメントは、一部の実施形態では、真核生物細胞、例えば、哺乳動物細胞；又は原核生物細胞（例えば、細菌若しくは古細菌細胞）のいずれかで機能性であり得る。一部の実施形態では、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、例えば、原核生物細胞及び真核生物細胞の両方でポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現を可能にする、複数の制御エレメントと作動可能に連結される。

【０４４３】

例示の目的のために、空間限定プロモータの例として、限定されないが、ニューロン特異的プロモータ、脂肪細胞特異的プロモータ、心筋細胞特異的プロモータ、平滑筋特異的プロモータ、光受容体特異的プロモータなどが挙げられる。ニューロン特異的空間限定プロモータとして、限定されないが、以下のものが挙げられる：ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）プロモータ（例えば、ＥＭＢＬ　ＨＳＥＮＯ２，Ｘ５１９５６を参照）；芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ（ＡＡＤＣ）プロモータ、ニューロフィラメントプロモータ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ　ＨＵＭＮＦＬ，Ｌ０４１４７を参照）；シナプシンプロモータ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ　ＨＵＭＳＹＮＩＢ，Ｍ５５３０１を参照）；ｔｈｙ－１プロモータ（例えば、Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）Ｃｅｌｌ　５１：７－１９；及びＬｌｅｗｅｌｌｙｎ，ｅｔ　ａｌ．（２０１０）Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１６（１０）：１１６１－１１６６を参照）；セロトニン受容体プロモータ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ　Ｓ６２２８３を参照）；チロシンヒドロキシラーゼプロモータ（ＴＨ）（例えば、Ｏｈｅｔ　ａｌ．（２００９）Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ　１６：４３７；Ｓａｓａｏｋａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｍｏｌ．Ｂｒａｉｎ　Ｒｅｓ．１６：２７４；Ｂｏｕｎｄｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．１８：９９８９；及びＫａｎｅｄａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｎｅｕｒｏｎ　６：５８３－５９４を参照）；ＧｎＲＨプロモータ（例えば、Ｒａｄｏｖｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：３４０２－３４０６を参照）；Ｌ７プロモータ（例えば、Ｏｂｅｒｄｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４８：２２３－２２６を参照）；ＤＮＭＴプロモータ（例えば、Ｂａｒｔｇｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：３６４８－３６５２を参照）；エンケファリンプロモータ（例えば、Ｃｏｍｂ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）ＥＭＢＯ　Ｊ．１７：３７９３－３８０５を参照）；ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）プロモータ；Ｃａ２＋カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼＩＩ－α（ＣａｍＫＩＩα）プロモータ（例えば、Ｍａｙｆｏｒｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９３：１３２５０；及びＣａｓａｎｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ｇｅｎｅｓｉｓ　３１：３７を参照）；ＣＭＶエンハンサー／血小板由来成長因子－βプロモータ（例えば、Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．（２００４）Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　１１：５２－６０を参照）；など。

【０４４４】

脂肪細胞特異的空間限定プロモータとしては、限定されないが、以下のものが挙げられる：ａＰ２遺伝子プロモータ／エンハンサー、例えば、ヒトａＰ２遺伝子の－５．４ｋｂから＋２１ｂｐまでの領域（例えば、Ｔｏｚｚｏ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１３８：１６０４；Ｒｏｓｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７：９５９０；及びＰａｖｊａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１１：７９７を参照）；グルコーストランスポーター－４（ＧＬＵＴ４）プロモータ（例えば、Ｋｎｉｇｈｔ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１００：１４７２５を参照）；脂肪酸トランスロ

カーゼ（ＦＡＴ／ＣＤ３６）プロモータ（例えば、Ｋｕｒｉｋｉ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｂｉｏｌ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．２５：１４７６；及びＳａｔｏ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７：１５７０３を参照）；ステアロイル－ＣｏＡデサチュラーゼ－１（ＳＣＤ１）プロモータ（Ｔａｂｏｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７４：２０６０３）；レプチンプロモータ（例えば、Ｍａｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１３９：１０１３；及びＣｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．２６２：１８７を参照）；アジドネクチンプロモータ（例えば、Ｋｉｔａ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．３３１：４８４；及びＣｈａｋｒａｂａｒｔｉ　（２０１０）Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１５１：２４０８を参照）；アジプシンプロモータ（例えば、Ｐｌａｔｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：７４９０を参照）；レジスチンプロモータ（例えば、Ｓｅｏ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｍｏｌｅｃ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１７：１５２２を参照）；など。

【０４４５】

心筋細胞特異的空間限定プロモータとしては、限定されないが、以下の遺伝子；ミオシン軽鎖－２、α－ミオシン重鎖、ＡＥ３、心臓トロポニンＣ、心臓アクチンなどに由来する制御配列が挙げられる。Ｆｒａｎｚ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ．Ｒｅｓ．３５：５６０－５６６；Ｒｏｂｂｉｎｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．７５２：４９２－５０５；Ｌｉｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｃｉｒｃ．Ｒｅｓ．７６：５８４－５９１；Ｐａｒｍａｃｅｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９９４）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１４：１８７０－１８８５；Ｈｕｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｈｙｐｅｒｔｅｎｓｉｏｎ　２２：６０８－６１７；及びＳａｒｔｏｒｅｌｌｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：４０４７－４０５１。

【０４４６】

平滑筋細胞特異的空間限定プロモータとしては、限定されないが、以下のものが挙げられる：ＳＭ２２αプロモータ（例えば、Ａｋｙｕｅｒｅｋ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．６：９８３；及び米国特許第７，１６９，８７４号明細書を参照）；スムーセリンプロモータ（例えば、国際公開第２００１／０１８０４８号パンフレットを参照）；α－平滑筋アクチンプロモータ；など。例えば、ＳＭ２２αプロモータの０．４ｋｂ領域（その内部に２つのＣＡｒＧエレメントが位置する）は、血管の平滑筋細胞特異的発現を媒介することが明らかにされている（例えば、Ｋｉｍ，ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１７，２２６６－２２７８；Ｌｉ，ｅｔ　ａｌ．，（１９９６）Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．１３２　８４９－８５９；及びＭｏｅｓｓｌｅｒ，ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　１２２，２４１５－２４２５を参照）。

【０４４７】

光受容体特異的空間限定プロモータとしては、限定されないが、以下のものが挙げられる：ロドプシンキナーゼプロモータ（Ｙｏｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ．Ｖｉｓ．Ｓｃｉ．４４：４０７６）；βホスホジエステラーゼ遺伝子プロモータ（Ｎｉｃｏｕｄ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）Ｊ．Ｇｅｎｅ　Ｍｅｄ．９：１０１５）；網膜色素変性遺伝子プロモータ（Ｎｉｃｏｕｄ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）前掲）；光受容体間レチノイド結合タンパク質（ＩＲＢＰ）遺伝子エンハンサー（Ｎｉｃｏｕｄ　ｅｔ　ａｌ．（２００７）前掲）；ＩＲＢＰ遺伝子プロモータ（Ｙｏｋｏｙａｍａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｅｘｐ　Ｅｙｅ　Ｒｅｓ．５５：２２５）；など。

【０４４８】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステム、例えば、遺伝子組換えポリペプチドをコードするＤＮＡ、鋳型ＲＮＡをコードするＤＮＡ、又は異種目的配列をコードするＤＮＡ若しくはＲＮＡは、１つ又は複数のエレメントが、組織特異的プロモータ、例えば、Ｔ細胞内で活性があるプロモータに作動可能に連結されるように設計される。更なる実施形態

では、Ｔ細胞活性プロモータは、他の細胞型、例えば、Ｂ細胞、ＮＫ細胞において不活性である。一部の実施形態では、Ｔ細胞活性プロモータは、Ｔ細胞受容体の成分、例えば、ＴＲＡＣ、ＴＲＢＣ、ＴＲＧＣ、ＴＲＤＣをコードする遺伝子についてのプロモータに由来する。一部の実施形態では、Ｔ細胞活性プロモータは、分化タンパク質のＴ細胞特異的クラスターの成分、例えば、ＣＤ３、例えば、ＣＤ３Ｄ、ＣＤ３Ｅ、ＣＤ３Ｇ、ＣＤ３Ｚをコードする遺伝子についてのプロモータに由来する。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムにおけるＴ細胞特異的プロモータは、公的に利用可能な遺伝子発現データを細胞型にわたって比較し、Ｔ細胞内での発現が増強された遺伝子からプロモータを選択することによって発見される。一部の実施形態では、プロモータは、所望の発現幅に応じて選択され得、例えば、Ｔ細胞のみにおいて活性があるプロモータ、ＮＫ細胞のみにおいて活性があるプロモータ、Ｔ細胞及びＮＫ細胞の両方において活性があるプロモータである。

【０４４９】

当技術分野で公知の細胞特異的プロモータを用いて、例えば、本明細書に記載される遺伝子組換えタンパク質の発現を指令することができる。非限定的な例示的哺乳動物細胞特異的プロモータは、特性決定されており、細胞特異的にＣｒｅリコンビナーゼを発現するマウスに使用されている。いくつかの非限定的な例示的哺乳動物細胞特異的プロモータは、米国特許第９８４５４８１号明細書（参照により本明細書に組み込まれる）の表１に列挙されている。

【０４５０】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターは、発現カセットを含む。典型的に、発現カセットは、プロモータ配列と作動可能に連結した本発明の核酸分子を含む。例えば、プロモータは、それが、コーディング配列の発現に影響を及ぼすことができる場合、コーディング配列と作動可能に連結している（例えば、コーディング配列は、プロモータの転写制御下にある）。コーディング配列は、センス又はアンチセンス配向で調節配列と作動可能に連結することができる。特定の実施形態では、プロモータは、異種プロモータである。特定の実施形態では、発現カセットは、別のエレメント、例えば、イントロン、エンハンサー、ポリアデニル化部位、ウッドチャック（ｗｏｏｄｃｈｕｃｋ）応答エレメント（ＷＲＥ）、及び／又はコーディング配列の発現レベルに影響を及ぼすことがわかっている他のエレメントを含み得る。プロモータは、典型的に、コーディング配列又は機能性ＲＮＡの発現を制御する。特定の実施形態では、プロモータ配列は、近位及びより遠位の上流エレメントを含み、更にエンハンサーエレメントも含み得る。エンハンサーは、典型的に、プロモータ活性を刺激することができ、プロモータの天然のエレメントであり得るか、又はプロモータのレベル若しくは組織特異性を増強するために挿入された異種エレメントであり得る。特定の実施形態では、プロモータは、その全体がネイティブ遺伝子に由来する。特定の実施形態では、プロモータは、天然に存在する異なるプロモータ由来の様々なエレメントから構成される。特定の実施形態では、プロモータは、合成ヌクレオチド配列を含む。当業者であれば、種々のプロモータが、様々な組織若しくは細胞型において、又は様々な発生段階において、又は様々な環境条件又は薬剤若しくは転写補因子の存在若しくは非存在に応答して、遺伝子の発現を指令し得ることが理解されるであろう。ユビキタス、細胞型特異的、組織特異的、発生段階特異的、及び条件的プロモータ、例えば、薬剤応答性プロモータ（例えばテトラサイクリン応答性プロモータ）は、当業者に周知である。例示的なプロモータとして、限定されないが、ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＫＧ）プロモータ、ＣＡＧ（ＣＭＶエンハンサー、ニワトリβアクチンプロモータ（ＣＢＡ）及びウサギβグロビンイントロンの複合物）、ＮＳＥ（ニューロン特異的エノラーゼ）、シナプシン若しくはＮｅｕＮプロモータ、ＳＶ４０初期プロモータ、マウス乳房腫瘍ウイルスＬＴＲプロモータ；アデノウイルス主要後期プロモータ（Ａｄ　ＭＬＰ）、単純ヘルペスウイルス（ｈｅｒｐｅｓ　ｓｉｍｐｌｅｘ　ｖｉｒｕｓ）（ＨＳＶ）プロモータ、サイトメガロウイルス（ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ）（ＣＭＶ）プロモータ、例えば、ＣＭＶ最初期プロモータ領域（ＣＭＶＩＥ）、ＳＦＦＶプロモータ、ラウス肉腫ウイルス（ｒｏｕｓ　ｓａｒｃｏｍａ　ｖｉｒｕｓ）（ＲＳＶ）プロモータ、合成プロモ

ータ、ハイブリダイゼーションプロモータなどが挙げられる。他のプロモータは、ヒト由来又はマウスをはじめとする他の種由来のものであり得る。一般的なプロモータとしては、例えば、ヒトサイトメガロウイルス（ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ）（ＣＭＶ）最初期遺伝子プロモータ、ＳＶ４０初期プロモータ、ラウス肉腫ウイルス（Ｒｏｕｓ ｓａｒｃｏｍａ ｖｉｒｕｓ）の長い末端反復、［β］－アクチン、ラットインスリンプロモータ、ホスホグリセリン酸キナーゼプロモータ、ヒトα－１アンチトリプシン（ｈＡＡＴ）プロモータ、トランスサイレチンプロモータ、ＴＢＧプロモータ及び他の肝臓特異的プロモータ、デスミンプロモータ及び類似の筋肉特異的プロモータ、ＥＦ１－α－プロモータ、多組織特異性を備えるハイブリッドプロモータ、シナプシン及びグリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼプロモータのようなニューロン特異的プロモータが挙げられ、これらは、全て当業者に周知であり、容易に入手可能であり、目的のコーディング配列の高レベルの発現を達成するために使用することができる。加えて、マウスメタロチオネイン遺伝子などの非ウイルス遺伝子由来の配列も本発明において有用であろう。こうしたプロモータ配列は、例えば、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から市販されている。更に別の例示的なプロモータ配列は、例えば、国際公開第２０１８２１３７８６Ａ１号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０４５１】

一部の実施形態では、例えば、肝臓での発現を駆動するために、アポリポタンパク質Ｅエンハンサー（ＡｐｏＥ）又はその機能性断片を使用する。一部の実施形態では、ＡｐｏＥエンハンサー又はその機能性断片の２コピーを使用する。一部の実施形態では、ＡｐｏＥエンハンサー又はその機能性断片をプロモータ、例えば、ヒトα－１アンチトリプシン（ｈＡＡＴ）プロモータと組み合わせて使用する。

【０４５２】

一部の実施形態では、調節配列は、組織特異的遺伝子発現能力を付与する。いくつかのケースでは、組織特異的調節配列は、組織特異的に転写を誘導する組織特異的転写因子に結合する。様々な組織特異的調節配列（例えば、プロモータ、エンハンサーなど）が当技術分野で公知である。例示的な組織特異的調節配列として、限定されないが、以下の組織特異的プロモータが挙げられる：肝臓特異的チロキシン結合グロブリン（ＴＢＧ）プロモータ、インスリンプロモータ、グルカゴンプロモータ、ソマトスタチンプロモータ、膵ポリペプチド（ＰＰＹ）プロモータ、シナプシン－１（Ｓｙｎ）プロモータ、クレアチンキナーゼ（ＭＣＫ）プロモータ、哺乳動物デスミン（ＤＥＳ）プロモータ、α－ミオシン重鎖（ａ－ＭＨＣ）プロモータ、又は心臓トロポニンＴ（ｃＴｎＴ）プロモータ。他の例示的なプロモータとしては、β－アクチンプロモータ、Ｂ型肝炎ウイルスコアプロモータ、Ｓａｎｄｉｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，３：１００２－９（１９９６）；α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）プロモータ、Ａｒｂｕｔｈｎｏｔ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，７：１５０３－１４（１９９６））、骨オステオカルシンプロモータ（Ｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．、Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐ．，２４：１８５－９６（１９９７））；骨シアロタンパク質プロモータ（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｏｎｅ Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．，１１：６５４－６４（１９９６））、ＣＤ２プロモータ（Ｈａｎｓａｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６１：１０６３－８（１９９８）；免疫グロブリン重鎖プロモータ；Ｔ細胞受容体α－鎖プロモータ、ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）プロモータなどのニューロンプロモータ（Ａｎｄｅｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．，１３：５０３－１５（１９９３））、ニューロフィラメント軽鎖遺伝子プロモータ（Ｐｉｃｃｉｏｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ． Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：５６１１－５（１９９１））並びにニューロン特異的ｖｇｆ遺伝子プロモータ（Ｐｉｃｃｉｏｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｎ，１５：３７３－８４（１９９５））などが挙げられる。別の例示的なプロモータ配列は、例えば、米国特許第１０３００１４６号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。一部の実施形態では、組織特異的調節エレメント、

例えば、組織特異的プロモータは、例えば、ＲＮＡ－ｓｅｑ若しくはタンパク質発現データ、又はそれらの組合せにより測定して、所与の組織中で高度に発現される遺伝子と作動可能に連結していることがわかっているものから選択される。発現による組織特異性を分析する方法は、Ｆａｇｅｒｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ １３（２）：３９７－４０６ （２０１４）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に教示されている。

【０４５３】

一部の実施形態では、本明細書に記載のベクターは、マルチシストロン性発現構築物である。マルチシストロン性発現構築物として、例えば、第１発現カセット（例えば、第１プロモータ及び第１コーディング核酸配列を含む）と、第２発現カセット（例えば、第２プロモータ及び第２コーディング核酸配列を含む）を有する構築物が挙げられる。こうしたマルチシストロン性発現構築物は、いくつかの事例では、ポリペプチド、例えば遺伝子組換えポリペプチド及び遺伝子組換え鋳型と一緒に、ヘアピンＲＮＡなどの非翻訳遺伝子産物の送達に特に有用となり得る。一部の実施形態では、マルチシストロン性発現構築物は、例えば、プロモータ干渉、又は不適合性核酸エレメントの近接した存在のために、含まれる導入遺伝子の１つ若しくは複数の発現レベル低下を呈示し得る。マルチシストロン性発現構築物がウイルスベクターの一部である場合、自己相補性核酸配列の存在は、いくつかの事例において、ウイルスの増殖又はパッケージングに必要な構造の形成を妨害し得る。

【０４５４】

一部の実施形態では、配列は、ヘアピンを有するＲＮＡをコードする。一部の実施形態では、ヘアピンＲＮＡは、ガイドＲＮＡ、鋳型ＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、又はｍｉｃｒｏＲＮＡである。一部の実施形態では、第１プロモータは、ＲＮＡポリメラーゼＩプロモータである。一部の実施形態では、第１プロモータは、ＲＮＡポリメラーゼＩＩプロモータである。一部の実施形態では、第２プロモータは、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモータである。一部の実施形態では、第２プロモータは、Ｕ６又はＨ１プロモータである。

【０４５５】

特定の理論に束縛されることを意図しないが、マルチシストロン性発現構築物は、ただ１つのシストロンを含む発現システムと比較して、最適な発現レベルを達成しないと考えられる。２つ以上のプロモータエレメントを含むマルチシストロン性発現構築物を用いて達成される発現レベル低下について示される原因の１つは、プロモータ干渉の現象である（例えば、Ｃｕｒｔｉｎ Ｊ Ａ，Ｄａｎｅ Ａ Ｐ，Ｓｗａｎｓｏｎ Ａ，Ａｌｅｘａｎｄｅｒ Ｉ Ｅ，Ｇｉｎｎ Ｓ Ｌ．Ｂｉｄｉｒｅｃｔｉｏｎａｌ ｐｒｏｍｏｔｅｒ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ ｂｅｔｗｅｅｎ ｔｗｏ ｗｉｄｅｌｙ ｕｓｅｄ ｉｎｔｅｒｎａｌ ｈｅｔｅｒｏｌｏｇｏｕｓ ｐｒｏｍｏｔｅｒｓ ｉｎ ａ ｌａｔｅ－ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ ｃｏｎｓｔｒｕｃｔ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００８ Ｍａｒｃｈ；１５（５）：３８４－９０；及びＭａｒｔｉｎ－Ｄｕｑｕｅ Ｐ，Ｊｅｚｚａｒｄ Ｓ，Ｋａｆｔａｎｓｉｓ Ｌ，Ｖａｓｓａｕｘ Ｇ．Ｄｉｒｅｃｔ ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｉｎｓｕｌａｔｉｎｇ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ ｔｗｏ ｇｅｎｅｔｉｃ ｅｌｅｍｅｎｔｓ ｉｎ ａｎ ａｄｅｎｏｖｉｒａｌ ｖｅｃｔｏｒ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｔｗｏ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｃａｓｓｅｔｔｅｓ．Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２００４ Ｏｃｔｏｂｅｒ；１５（１０）：９９５－１００２を参照されたい；尚、いずれの参照文献も、プロモータ干渉現象の開示について、参照により本明細書に組み込まれる）。一部の実施形態では、プロモータ干渉の問題は、例えば、内部リボソーム進入部位により隔てられる複数のコーディング核酸配列の転写を駆動するただ１つのプロモータを含むマルチシストロン性発現構築物を生成することにより、又は転写インスレータエレメントを備えるそれ自身のプロモータを含むシストロンを分離することによって解消することができる。一部の実施形態では、単一プロモータにより駆動される多シストロンの発現は、シストロンの不均一な発現レベルを招き得る。一部の実施形態では、プロモータを効率的に分離することはできず

、分離エレメントは、一部の遺伝子導入ベクター、例えば、一部のレトロウイルスベクターと適合性ではない場合がある。

【０４５６】

ｍｉｃｒｏＲＮＡ

ｍｉｃｒｏＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）及び他の低分子干渉核酸は、一般に、標的ＲＮＡ転写物切断／分解又は標的メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の翻訳抑制によって遺伝子発現を調節する。ｍｉＲＮＡは、いくつかの事例において、典型的に、最終的な１９～２５の非翻訳ＲＮＡ産物として天然に発現され得る。ｍｉＲＮＡは、一般に、標的ｍＲＮＡの３’非翻訳領域（ＵＴＲ）との配列特異的相互作用を介してその活性を呈示する。これらの内在性発現ｍｉＲＮＡは、ヘアピン前駆体を形成し得るが、これらは、後に、ｍｉＲＮＡデュープレックス、更には成熟一本鎖ｍｉＲＮＡ分子にプロセシングされる。この成熟ｍｉＲＮＡは、一般に、多タンパク質複合体、ｍｉＲＩＳＣを誘導し、これは、成熟ｍｉＲＮＡに対するその相補性に基づいて標的ｍＲＮＡの標的３’ＵＴＲ領域を識別する。有用な導入遺伝子産物として、例えば、連結ポリペプチドの発現を調節するｍｉＲＮＡ又はｍｉＲＮＡ結合部位を挙げることができる。ｍｉＲＮＡ遺伝子；これら遺伝子の産物及びその相同体の非限定的なリストは、導入遺伝子として、又は低分子干渉核酸（例えば、ｍｉＲＮＡスポンジ、アンチセンスオリゴヌクレオチド）の標的として、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第１０３００１４６号明細書、２２：２５－２５：４８に列挙されるものなどの方法において有用である。一部の実施形態では、前述したｍｉＲＮＡの１つ又は複数に対する１つ若しくは複数の結合部位は、導入遺伝子、例えば、ｒＡＡＶベクターにより送達される導入遺伝子に組み込まれて、例えば、その導入遺伝子を保有する動物の１つ若しくは複数の組織中の導入遺伝子の発現を阻害する。一部の実施形態では、組織特異的に導入遺伝子の発現を制御するように、結合部位を選択し得る。例えば、肝臓特異適ｍｉＲ－１２２に対する結合部位を導入遺伝子に組み込んで、肝臓中のその導入遺伝子の発現を阻害することができる。別の例示的なｍｉＲＮＡ配列は、例えば、米国特許第１０，３００，１４６号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０４５７】

ｍｉＲ阻害剤又はｍｉＲＮＡ阻害剤は、概して、ｍｉＲＮＡ発現及び／又はプロセシングを阻止する薬剤である。こうした薬剤の例として、限定されないが、ｍｉｃｒｏＲＮＡアンタゴニスト、ｍｉｃｒｏＲＮＡ特異的アンチセンス、ｍｉｃｒｏＲＮＡスポンジ、及びｍｉｃｒｏＲＮＡオリゴヌクレオチド（二本鎖、ヘアピン、短いオリゴヌクレオチド）が挙げられ、これらは、Ｄｒｏｓｈａ複合体とのｍｉＲＮＡ相互作用を阻害する。ｍｉｃｒｏＲＮＡ阻害剤、例えば、ｍｉＲＮＡスポンジは、導入遺伝子から細胞に発現させることができる（例えば、Ｅｂｅｒｔ，Ｍ．Ｓ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｔｈｏｄｓ，Ｅｐｕｂ　Ａｕｇ．１２，２００７に記載の通り；尚、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。一部の実施形態では、ｍｉｃｒｏＲＮＡスポンジ、又は他のｍｉＲ阻害剤は、ＡＡＶと一緒に使用される。ｍｉｃｒｏＲＮＡスポンジは、一般に、相補的ヘプタマーシード配列を介して、ｍｉＲＮＡを特異的に阻害する。一部の実施形態では、単一のスポンジ配列を用いて、ｍｉＲＮＡのファミリー全体をサイレンシングすることができる。細胞中でｍｉＲＮＡ機能をサイレンシングする（ｍｉＲＮＡ標的の抑制解除）他の方法は、当業者に明らかであろう。

【０４５８】

一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子組換えシステム、鋳型ＲＮＡ、又はポリペプチドは、標的組織、例えば、第１の組織に投与されるか、又はそこで活性である（例えば、より活性である）。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステム、鋳型ＲＮＡ、又はポリペプチドは、非標的組織に投与されないか、又は非標的組織において活性が低い（例えば、活性でない）。一部の実施形態では、本明細書に記載の遺伝子組換えシステム、鋳型ＲＮＡ、又はポリペプチドは、標的組織、例えば、第１組織において、ＤＮＡを修飾する（そして例えば、非標的組織においてＤＮＡを修飾しない）のに有用である。

【０４５９】
一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムは、（ａ）本明細書に記載のポリペプチド又はそれをコードする核酸、（ｂ）本明細書に記載の鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）、及び（ｃ）標的組織に特異的な１つ又は複数の第１組織特異的発現制御配列を含み、ここで、標的組織に特異的な１つ又は複数の第１組織特異的発現制御配列は、（ａ）、（ｂ）、又は（ａ）及び（ｂ）と機能的に関連しており、（ａ）と関連する場合、（ａ）はポリペプチドをコードする核酸を含む。
【０４６０】
一部の実施形態では、（ｂ）の核酸はＲＮＡを含む。
【０４６１】
一部の実施形態では、（ｂ）の核酸はＤＮＡを含む。
【０４６２】
一部の実施形態では、（ｂ）の核酸は：（ｉ）一本鎖であるか、又は一本鎖セグメントを含む、例えば、一本鎖ＤＮＡであるか、又は一本鎖セグメント及び１つ若しくは複数の二本鎖セグメントを含む；（ｉｉ）逆末端反復を有する；又は（ｉｉｉ）（ｉ）と（ｉｉ）の両方である。
【０４６３】
一部の実施形態では、（ｂ）の核酸は二本鎖であるか、又は二本鎖セグメントを含む。
【０４６４】
一部の実施形態では、（ａ）は、ポリペプチドをコードする核酸を含む。
【０４６５】
一部の実施形態では、（ａ）の核酸はＲＮＡを含む。
【０４６６】
一部の実施形態では、（ａ）の核酸はＤＮＡを含む。
【０４６７】
一部の実施形態では、（ａ）の核酸は：（ｉ）一本鎖であるか、又は一本鎖セグメントを含む、例えば、一本鎖ＤＮＡであるか、又は一本鎖セグメント及び１つ若しくは複数の二本鎖セグメントを含む；（ｉｉ）逆末端反復を有する；又は（ｉｉｉ）（ｉ）と（ｉｉ）の両方である。
【０４６８】
一部の実施形態では、（ａ）の核酸は二本鎖であるか、又は二本鎖セグメントを含む。
【０４６９】
一部の実施形態では、（ａ）、（ｂ）、又は（ａ）及び（ｂ）における核酸は線状である。
【０４７０】
一部の実施形態では、（ａ）、（ｂ）、又は（ａ）及び（ｂ）における核酸は、環状、例えば、プラスミド又はミニサークルである。
【０４７１】
一部の実施形態では、異種目的配列は、第１プロモータと機能的に関連している。
【０４７２】
一部の実施形態では、１つ又は複数の第１組織特異的発現制御配列は、組織特異的プロモータを含む。
【０４７３】
一部の実施形態では、組織特異的プロモータは、以下と機能的に関連する第１プロモータを含む：（ｉ）異種目的配列、（ｉｉ）レトロウイルスＲＴをコードする核酸、又は（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）。
【０４７４】
一部の実施形態では、１つ又は複数の第１組織特異的発現制御配列は、以下と機能的に関連する組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列を含む：（ｉ）異種目的配列、（ｉｉ）レトロウイルスＲＴドメインをコードする核酸、又は（ｉｉｉ）（ｉ）及び（ｉｉ）。

【０４７５】
一部の実施形態では、システムは組織特異的プロモータを含み、システムは１つ又は複数の組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列を更に含み、ここで、（ｉ）組織特異的プロモータは、（Ｉ）異種目的配列、（ＩＩ）レトロウイルスＲＴドメインをコードする核酸、又は（ＩＩＩ）（ｉ）及び（ｉｉ）と機能的に関連している；且つ／又は（ｉｉ）１つ又は複数の組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列は、（Ｉ）異種目的配列、（ＩＩ）レトロウイルスＲＴをコードする核酸、又は（ＩＩＩ）（ｉ）及び（ｉｉ）と機能的に関連している。
【０４７６】
一部の実施形態では、（ａ）は、ポリペプチドをコードする核酸を含み、核酸は、ポリペプチドをコードする核酸と機能的に関連するプロモータを含む。
【０４７７】
一部の実施形態では、ポリペプチドをコードする核酸は、ポリペプチドコード配列と機能的に関連する標的組織に特異的な１つ又は複数の第２組織特異的発現制御配列を含む。
【０４７８】
一部の実施形態では、１つ又は複数の第２組織特異的発現制御配列は、組織特異的プロモータを含む。
【０４７９】
一部の実施形態では、組織特異的プロモータは、ポリペプチドをコードする核酸と機能的に関連するプロモータである。
【０４８０】
一部の実施形態では、１つ又は複数の第２組織特異的発現制御配列は、組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列を含む。
【０４８１】
一部の実施形態では、ポリペプチドをコードする核酸と機能的に関連するプロモータは、組織特異的プロモータであり、システムは、１つ又は複数の組織特異的マイクロＲＮＡ認識配列を更に含む。
【０４８２】
一部の実施形態では、本発明によって提供されるシステムの核酸成分は、タンパク質発現レベルを改変する非翻訳領域（ＵＴＲ）に隣接する配列（例えば、ポリペプチドをコードするか、又は異種目的配列を含む）である。様々な５’及び３’ＵＴＲがタンパク質発現に影響を与え得る。例えば、一部の実施形態では、コード配列は、ＲＮＡの安定性又はタンパク質翻訳を修飾する５’ＵＴＲが先行し得る。一部の実施形態では、配列の後に、ＲＮＡの安定性又は翻訳を修飾する３’ＵＴＲが続き得る。一部の実施形態では、配列は、ＲＮＡの安定性又は翻訳を修飾するように、５’ＵＴＲが先行し、３’ＵＴＲが後続し得る。一部の実施形態では、５’及び／又は３’ＵＴＲは、補体因子３（Ｃ３）（ＣＡＣＴＣＣＴＣＣＣＣＡＴＣＣＴＣＴＣＣＣＴＣＴＧＴＣＣＣＴＣＴＧＴＣＣＣＴＣＴＧＡＣＣＣＴＧＣＡＣＴＧＴＣＣＣＡＧＣＡＣＣ（配列番号４６１９））又はオロソムコイド１（ＯＲＭ１）
【化１１】
(CAGGACACAGCCTTGGATCAGGACAGAGACTTGGGGGCCATCCTGCCCCTCCAACC
CGACATGTGTACCTCAGCTTTTTCCCTCACTTGCATCAATAAAGCTTCTGTGTTTGGA
ACAGCTAA) (配列番号: 4620)

の５’及び３’ＵＴＲから選択され得る（Ａｓｒａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．ＲＮＡ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　２０１８）。特定の実施形態では、５’ＵＴＲはＣ３からの５’ＵＴＲであり、３’ＵＴＲはＯＲＭ１からの３’ＵＴＲである。特定の実施形態では、タンパク質発現のための５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲ、例えば、遺伝子組換えポリペプチド若しくは異種目的配列のためのｍＲＮＡ（又はＲＮＡをコードするＤＮＡ）は、最適化された発現配列を含む。一部の実施形態では、例えば、Ｒｉｃｈｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１６８（６）：Ｐ１

１１４－１１２５（２０１７）（その配列は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、５’ＵＴＲは、ＧＧＧＡＡＡＵＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＵＡＡＧＡＡＧＡＡＡＵＡＵＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ（配列番号４６２１）を含み、及び／又は３’ＵＴＲは、ＵＧＡＵＡＡＡＵＡＧＧＣＵＧＧＡＧＣＣＵＣＧＧＵＧＧＣＣＡＵＧＣＵＵＣＵＵＧＣＣＣＣＵＵＧＧＧＣＣＵＣＣＣＣＣＣＡＧＣＣＣＣＵＣＣＵＣＣＣＣＵＵＣＣＵＧＣＡＣＣＣＧＵＡＣＣＣＣＣＧＵＧＧＵＣＵＵＵＧＡＡＵＡＡＡＧＵＣＵＧＡ（配列番号４６２２）を含む。

【０４８３】

一部の実施形態では、５’及び／又は３’ＵＴＲを選択して、タンパク質発現が増強され得る。一部の実施形態では、過剰産生阻害が最小限に抑えられるようにタンパク質発現を修飾するように、５’及び／又は３’ＵＴＲを選択し得る。一部の実施形態では、ＵＴＲはコード配列の周囲にあり、例えば、コード配列の外側にあり、他の実施形態では、コード配列に近接している。一部の実施形態では、更なる調節エレメント（例えば、ｍｉＲＮＡ結合部位、シス調節部位）がＵＴＲに含まれる。

【０４８４】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムのオープンリーディングフレーム、例えば、遺伝子組換えポリペプチドをコードするｍＲＮＡ（若しくはｍＲＮＡをコードするＤＮＡ）のＯＲＦ又は異種目的配列のｍＲＮＡ（若しくはｍＲＮＡをコードするＤＮＡ）の１つ若しくは複数のＯＲＦは、その発現を増強する、５’及び／又は３’非翻訳領域（ＵＴＲ）によりフランキングされている。一部の実施形態では、システムのｍＲＮＡ成分（又はＤＮＡ成分から産生された転写物）の５’ＵＴＲは、配列５’－ＧＧＧＡＡＡＵＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧＵＡＡＧＡＡＧＡＡＡＵＡＵＡＡＧＡＧＣＣＡＣＣ－３’（配列番号４６２１）を含む。一部の実施形態では、システムのｍＲＮＡ成分（又はＤＮＡ成分から産生された転写物）の３’ＵＴＲは、配列

【化１２】

5′-
UGAUAAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCC
AGCCCCUCCUCCCCUUCCUGCACCCGUACCCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGA-
3′ (配列番号: 4622)

を含む。５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲのこの組合せは、Ｒｉｃｈｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１６８（６）：Ｐ１１１４－１１２５（２０１７）（その教示内容及び配列は、参照により本明細書に組み込まれる）により、作動可能に連結したＯＲＦの所望の発現をもたらすことが明らかにされている。一部の実施形態では、本明細書に記載のシステムは、転写物をコードするＤＮＡを含み、この場合、上記ＤＮＡは、上に挙げた配列中のＵをＴで置換した、対応する５’ＵＴＲ及び３’ＵＴＲを含む。一部の実施形態では、システムのＲＮＡ成分を生産するために用いられるＤＮＡベクターは、インビトロ転写を開始するために、５’ＵＴＲの上流にプロモータ、例えば、Ｔ７、Ｔ３、又はＳＰ６プロモータを含む。上記の５’ＵＴＲは、ＧＧＧで開始するが、これは、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼを用いた転写を最適化するのに好適な開始である。代替５’ＵＴＲに適合するように、転写レベルを調整し、且つ転写開始部位ヌクレオチドを改変するために、Ｄａｖｉｄｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｐａｃ　Ｓｙｍｐ　Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔ　４３３－４４３（２０１０）の教示には、これらの特性の両方を満たすＴ７プロモータ変異体、及びそれを見出す方法が記載されている。

【０４８５】

ウイルスベクター及びその成分

ウイルスは、例えば、本明細書で使用されるポリメラーゼ及びポリメラーゼ機能、例えば、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ、ＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ、ＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素の供給源として、本明細書に記載の関連酵素又はドメインの供給源に加え、本明細書に記載のシステムのため

の送達ビヒクルの有用な供給源である。一部の酵素、例えば、逆転写酵素は、複数の活性を有する可能性があり、例えば、ＲＮＡ依存性ＤＮＡ重合及びＤＮＡ依存性ＤＮＡ重合の両方（例えば、第１及び第２の鎖合成）が可能であり得る。一部の実施形態では、遺伝子組換え送達システム又はその成分の供給源として使用されるウイルスは、Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ Ｒｅｖ ３５（３）：２３５－２４１（１９７１）により記載される一群から選択され得る。

【０４８６】

一部の実施形態では、ウイルスは、Ｉ群ウイルスから選択され、例えば、ＤＮＡウイルスであり、ｄｓＤＮＡをビリオンにパッケージングする。一部の実施形態では、Ｉ群ウイルスは、例えば、アデノウイルス（Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ）、ヘルペスウイルス（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｕｓ）、ポックスウイルス（Ｐｏｘｖｉｒｕｓ）から選択される。

【０４８７】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＩＩ群ウイルスから選択され、例えば、ＤＮＡウイルスであり、ｓｓＤＮＡをビリオンにパッケージングする。一部の実施形態では、ＩＩ群ウイルスは、例えば、パルボウイルス（Ｐａｒｖｏｖｉｒｕｓ）から選択される。一部の実施形態では、パルボウイルス（ｐａｒｖｏｖｉｒｕｓ）は、ディペンドパルボウイルス属（ｄｅｐｅｎｄｏｐａｒｖｏｖｉｒｕｓ）、例えば、アデノ随伴ウイルス（ａｄｅｎｏ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ）（ＡＡＶ）である。

【０４８８】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＩＩＩ群ウイルスから選択され、例えば、ＲＮＡウイルスであり、ｄｓＲＮＡをビリオンにパッケージングする。一部の実施形態では、ＩＩＩ群ウイルスは、例えば、レオウイルス（Ｒｅｏｖｉｒｕｓ）から選択される。一部の実施形態では、こうしたビリオンに含有されるｄｓＲＮＡの一方又は両方の鎖は、宿主細胞への形質導入時にｍＲＮＡとして直接役立ち得るコーディング分子であり、例えば、介在核酸複製又は重合ステップを一切必要とせずに、宿主細胞への形質導入時に、タンパク質に直接翻訳され得る。

【０４８９】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＩＶ群ウイルスから選択され、例えば、ＲＮＡウイルスであり、ｓｓＲＮＡ（＋）をビリオンにパッケージングする。一部の実施形態では、ＩＶ群ウイルスは、例えば、コロナウイルス（Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｕｓ）、ピコルナウイルス（Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｕｓ）、トガウイルス（Ｔｏｇａｖｉｒｕｓ）から選択される。一部の実施形態では、こうしたビリオンに含有されるｓｓＲＮＡ（＋）は、宿主細胞への形質導入時にｍＲＮＡとして直接役立ち得るコーディング分子であり、例えば、介在核酸複製又は重合ステップを一切必要とせずに、宿主細胞への形質導入時に、タンパク質に直接翻訳され得る。

【０４９０】

一部の実施形態では、ウイルスは、Ｖ群ウイルスから選択され、例えば、ＲＮＡウイルスであり、ｓｓＲＮＡ（－）をビリオンにパッケージングする。一部の実施形態では、ＩＶ群ウイルスは、例えば、オルトミクソウイルス（Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｕｓｅｓ）、ラブドウイルス（Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｕｓ）から選択される。一部の実施形態では、ｓｓＲＮＡ（－）ゲノムを有するＲＮＡウイルスは、ビリオン内部に、ウイルスゲノムと一緒に宿主細胞に形質導入される酵素（例えば、ＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ）も担持しており、これは、ｓｓＲＮＡ（－）を、宿主によって直接翻訳され得るｓｓＲＮＡ（＋）にコピーすることができる。

【０４９１】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＶＩ群ウイルスから選択され、例えば、レトロウイルス（ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）であり、ｓｓＲＮＡ（＋）をビリオンにパッケージングする。一部の実施形態では、ＶＩ群ウイルスは、例えば、レトロウイルスから選択される。一部の実施形態では、レトロウイルス（ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）は、レンチウイルス（ｌｅｎｔｉｖｉｒｕｓ）、例えば、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、ＳＩＶ、ＢＩＶである。一部

の実施形態では、レトロウイルスは、スプマウイルス（ｓｐｕｍａｖｉｒｕｓ）、例えば、フォーミーウイルス（ｆｏａｍｙ　ｖｉｒｕｓ）、例えば、ＨＦＶ、ＳＦＶ、ＢＦＶである。一部の実施形態では、こうしたビリオンに含有されるｓｓＲＮＡ（＋）は、宿主細胞への形質導入時にｍＲＮＡとして直接役立ち得るコーディング分子であり、例えば、介在核酸複製又は重合ステップを一切必要とせずに、宿主細胞への形質導入時に、タンパク質に直接翻訳され得る。一部の実施形態では、ｓｓＲＮＡ（＋）は、まず逆転写され、コピーされて、ｄｓＤＮＡゲノム中間体を生成し、そこからｍＲＮＡが宿主に転写され得る。一部の実施形態では、ｓｓＲＮＡ（＋）ゲノムを有するＲＮＡウイルスは、ビリオン内部に、ウイルスゲノムと一緒に宿主細胞に形質導入される酵素（例えば、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ）も担持しており、これは、ｓｓＲＮＡ（＋）をｄｓＤＮＡにコピーすることができ、このｄｓＤＮＡは、宿主によりｍＲＮＡに転写されて、翻訳され得る。一部の実施形態では、ＶＩ群レトロウイルス由来の逆転写酵素は、遺伝子組換えポリペプチドの逆転写酵素ドメインとして組み込まれる。

【０４９２】

一部の実施形態では、ウイルスは、ＶＩＩ群ウイルスから選択され、例えば、レトロウイルス（ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）であり、ｄｓＲＮＡをビリオンにパッケージングする。一部の実施形態では、ＶＩＩ群ウイルスは、例えば、ヘパドナウイルス（Ｈｅｐａｄｎａｖｉｒｕｓ）から選択される。一部の実施形態では、こうしたビリオンに含有されるｄｓＲＮＡの一方又は両方の鎖は、宿主細胞への形質導入時にｍＲＮＡとして直接役立ち得るコーディング分子であり、例えば、介在核酸複製又は重合ステップを一切必要とせずに、宿主細胞への形質導入時に、タンパク質に直接翻訳され得る。一部の実施形態では、こうしたビリオンに含有されるｄｓＲＮＡの一方又は両方の鎖は、まず逆転写され、コピーされて、ｄｓＤＮＡゲノム中間体を生成し、そこからｍＲＮＡが宿主に転写され得る。一部の実施形態では、ｄｓＲＮＡゲノムを有するＲＮＡウイルスは、ビリオン内部に、ウイルスゲノムと一緒に宿主細胞に形質導入される酵素（例えば、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ）も担持しており、これは、ｄｓＲＮＡをｄｓＤＮＡにコピーすることができ、このｄｓＤＮＡは、宿主によりｍＲＮＡに転写されて、翻訳され得る。一部の実施形態では、ＶＩＩ群レトロウイルス由来の逆転写酵素は、遺伝子組換えポリペプチドの逆転写酵素ドメインとして組み込まれる。

【０４９３】

一部の実施形態では、本発明で核酸を送達するために用いられるビリオンは、遺伝子組換えのプロセスに関与する酵素も担持し得る。例えば、レトロウイルスビリオンは、核酸と一緒に宿主細胞に送達される逆転写酵素ドメインを含有し得る。一部の実施形態では、ＲＮＡ鋳型は、ビリオン内の遺伝子組換えポリペプチドを随伴し得、それにより、両方が、ウイルス粒子からの核酸の形質導入時に標的細胞に同時送達される。一部の実施形態では、ビリオン内の核酸は、ＤＮＡ、例えば、線状ｓｓＤＮＡ、線状ｄｓＤＮＡ、環状ｓｓＤＮＡ、環状ｄｓＤＮＡ、ミニサークルＤＮＡ、ｄｂＤＮＡ、ｃｅＤＮＡを含み得る。一部の実施形態では、ビリオン内の核酸は、ＲＮＡ、例えば、線状ｓｓＲＮＡ、線状ｄｓＲＮＡ、環状ｓｓＲＮＡ、環状ｄｓＲＮＡを含み得る。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、宿主細胞への形質導入時に環状化され得、例えば、線状ｓｓＲＮＡ分子は、共有結合を経て、環状ｓｓＲＮＡを形成することができ、線状ｄｓＲＮＡ分子は、共有結合を経て、環状ｄｓＲＮＡ又は１つ若しくは複数の環状ｓｓＲＮＡを形成し得る。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、宿主細胞内でのローリングサークル複製により複製し得る。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、単一核酸分子を含み得、例えば非セグメント化ゲノムを含み得る。一部の実施形態では、ウイルスゲノムは、２つ以上の核酸分子を含み得、例えばセグメント化ゲノムを含み得る。一部の実施形態では、ビリオン内の核酸は１つ若しくは複数のタンパク質を随伴し得る。一部の実施形態では、ビリオン内の１つ又は複数のタンパク質を、形質導入時に宿主細胞に送達することができる。一部の実施形態では、標的核酸に対するビリオンパッケージングシグナルの付加により、天然ウイルスを核酸の送達のために改変し得、その場合、宿主細胞を用いて、パッケージングシグナルを含

有する標的核酸をパッケージングする。
【０４９４】
一部の実施形態では、送達ビヒクルとして用いられるビリオンは、片利ヒトウイルスを含み得る。一部の実施形態では、送達ビヒクルとして用いられるビリオンは、アネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）を含み得、その使用は、国際公開第２０１８２３２０１７Ａ１号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。
【０４９５】
ＡＡＶ投与
一部の実施形態では、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）が、本明細書に記載されるシステム、鋳型核酸、及び／又はポリペプチドと一緒に使用される。一部の実施形態では、ＡＡＶは、本明細書に記載のシステム、鋳型核酸、及び／又はポリペプチドを送達、投与、又はパッケージングするために使用される。一部の実施形態では、ＡＡＶは組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）である。
【０４９６】
一部の実施形態では、システムは、（ａ）本明細書に記載のポリペプチド又はそれをコードする核酸、（ｂ）本明細書に記載の鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）、及び（ｃ）標的組織に特異的な１つ又は複数の第１組織特異的発現制御配列を含み、ここで、標的組織に特異的な１つ又は複数の第１組織特異的発現制御配列は、（ａ）、（ｂ）、又は（ａ）及び（ｂ）と機能的に関連しており、（ａ）と関連する場合、（ａ）はポリペプチドをコードする核酸を含む。
【０４９７】
一部の実施形態では、本明細書に記載のシステムは、第１組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）カプシドタンパク質を更に含み、ここで、（ａ）又は（ｂ）の少なくとも１つは、第１ｒＡＡＶカプシドタンパク質と会合し、（ａ）又は（ｂ）の少なくとも１つは、ＡＡＶ逆位末端リピート（ＩＴＲ）が隣接している。
【０４９８】
一部の実施形態では、（ａ）及び（ｂ）は、第１ｒＡＡＶカプシドタンパク質と会合している。
【０４９９】
一部の実施形態では、（ａ）及び（ｂ）は単一核酸上にある。
【０５００】
一部の実施形態では、システムは、第２ｒＡＡＶカプシドタンパク質を更に含み、ここで、（ａ）又は（ｂ）の少なくとも１つは、第２ｒＡＡＶカプシドタンパク質と会合し、第２ｒＡＡＶカプシドタンパク質と会合する（ａ）又は（ｂ）の少なくとも１つは、第１ｒＡＡＶカプシドタンパク質と会合する（ａ）又は（ｂ）の少なくとも１つと異なる。
【０５０１】
一部の実施形態では、（ａ）又は（ｂ）の少なくとも１つは、第１又は第２ｒＡＡＶカプシドタンパク質と会合し、第１又は第２ｒＡＡＶカプシドタンパク質の内部に分散しており、ここで、第１又は第２ｒＡＡＶカプシドタンパク質は、ＡＡＶカプシド粒子の形態である。
【０５０２】
一部の実施形態では、システムはナノ粒子を更に含み、ナノ粒子は（ａ）又は（ｂ）の少なくとも１つと会合している。
【０５０３】
一部の実施形態では、（ａ）及び（ｂ）は、それぞれａ）第１ｒＡＡＶカプシドタンパク質及び第２ｒＡＡＶカプシドタンパク質；ｂ）ナノ粒子及び第１ｒＡＡＶカプシドタンパク質；ｃ）第１ｒＡＡＶカプシドタンパク質；ｄ）第１アデノウイルスカプシドタンパク質；ｅ）第１ナノ粒子及び第２ナノ粒子；又はｆ）第１ナノ粒子と会合している。
【０５０４】

ウイルスベクターは、本発明によって提供されるシステムの全部又は一部を送達するために、例えば、本発明によって提供される方法における使用のために有用である。ポリペプチド又は核酸の送達には、異なるウイルスに由来するシステムが採用されており、例えば、インテグラーゼ欠損レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、単純ヘルペスウイルス、バキュロウイルス（Ｈｏｄｇｅ ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２０１７；Ｎａｒａｙａｎａｖａｒｉ ｅｔ ａｌ．Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２０１７；Ｂｏｅｈｍｅ ｅｔ ａｌ．Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ ２０１５で論評される）である。

【０５０５】

アデノウイルスは、明確に定義された生物学、遺伝的安定性、高い形質導入効率、及び大規模生産の容易さを考慮して、遺伝子送達ビヒクルとして使用されてきた一般的なウイルスである（例えば、Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅｓ ＆ Ｄｉｓｅａｓｅｓ ２０１７による論評を参照）。それらは線状ｄｓＤＮＡゲノムを有し、組織と細胞の向性が異なる様々な血清型がある。レシピエント細胞での感染性ウイルスの複製を防ぐために、パッケージングに使用されるアデノウイルスゲノムは、ウイルス産生細胞にトランスで提供される内因性ウイルスタンパク質の一部又は全てが欠失している。これにより、ゲノムはヘルパー依存性となる。つまり、ゲノムは、いわゆるヘルパー機能によって提供される欠損成分の存在下でのみ複製され、ウイルス粒子にパッケージングされる。全てのウイルスＯＲＦが除去されたヘルパー依存性アデノウイルスシステムは、最大３７ｋｂの外来ＤＮＡのパッケージングと適合性であり得る（Ｐａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｖｉｒｏｌ １９９７）。一部の実施形態では、アデノウイルスベクターは、遺伝子組換えシステムのポリペプチド又は鋳型成分に対応するＤＮＡを送達するために使用されるか、又は両方が別々の若しくは同じアデノウイルスベクターに含まれる。一部の実施形態では、アデノウイルスは、自己パッケージングができないヘルパー依存性アデノウイルス（ＨＤ－ＡｄＶ）である。一部の実施形態では、アデノウイルスは、アデノウイルス粒子へのパッケージングに必要な配列成分を保持しながら、内因性ウイルスＯＲＦの全て又は実質的な部分が欠失した高容量アデノウイルス（ＨＣ－ＡｄＶ）である。このベクター型の場合、ゲノムパッケージングに必要な唯一のアデノウイルス配列は、非コード配列：両端の逆位末端リピート（ＩＴＲ）及び５’末端のパッケージングシグナルである（Ｊａｇｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ ２００９）。一部の実施形態では、アデノウイルスゲノムは、最適な産生及び安定性のための最小ゲノムサイズを満たすスタッファーＤＮＡも含む（例えば、Ｈａｕｓｌ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ ２０１０を参照）。一部の実施形態では、アデノウイルスを使用して、遺伝子組換えシステムを肝臓に送達する。

【０５０６】

一部の実施形態では、アデノウイルスを使用して、遺伝子組換えシステムをＨＳＣ、例えば、ＨＤＡｄ５／３５＋＋に送達する。ＨＤＡｄ５／３５＋＋は、肝臓からベクターの標的を外す、血清型３５線維が改変されたアデノウイルスである（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ Ａｄｖ ２０１９）。一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムをＨＳＣに送達するアデノウイルスは、原始ＨＳＣ上で特異的に発現される受容体、例えばＣＤ４６を利用する。

【０５０７】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）はパルボウイルス（ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅ）科に属し、より具体的にはディペンドパルボウイルス（ｄｅｐｅｎｄｏｐａｒｖｏｖｉｒｕｓ）属を構成する。ＡＡＶゲノムは、約４．７キロベース（ｋｂ）を含む線状一本鎖ＤＮＡ分子で構成され、非構造Ｒｅｐ（複製）及び構造Ｃａｐ（カプシド）タンパク質をコードする２つの主要なオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）で構成される。アセンブリー活性化タンパク質（ＡＡＰ）をコードするキャップ遺伝子内の第２ＯＲＦが同定された。ＡＡＶコード領域に隣接するＤＮＡは、長さが約１４５ヌクレオチドの２つのシス作用性逆位末端リピート（ＩＴＲ）配列であり、ＤＮＡ複製のプライマーとして機能するエネルギー的に安定したヘアピン構造に折りたたむことができる中断されたパリンドローム配列を

有する。ＤＮＡ複製におけるその役割に加え、ＩＴＲ配列は、ウイルスＤＮＡの細胞ゲノムへの組込み、宿主ゲノム又はプラスミドからのレスキュー、及びウイルス核酸の成熟ビリオンへのカプシド形成に関与することが示されている（Ｍｕｚｙｃｚｋａ，（１９９２）Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５８：９７－１２９）。一部の実施形態では、１つ又は複数の遺伝子組換え核酸成分は、ウイルスパッケージングのためにＡＡＶに由来するＩＴＲが隣接する。例えば、国際公開第２０１９１１３３１０号パンフレットを参照されたい。

【０５０８】

一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムの１つ又は複数の成分が、少なくとも１つのＡＡＶベクターを介して輸送される。一部の実施形態では、少なくとも１つのＡＡＶベクターは、特定の細胞、組織、生物に対する向性について選択される。一部の実施形態では、ＡＡＶベクターはシュードタイプ化され（例えば、ＡＡＶ２／８）、ここで、ＡＡＶ２は構築物の設計を表すが、カプシドタンパク質はＡＡＶ８由来のものに置換される。記載されるベクターはいずれも、ＡＡＶゲノムをパッケージングするために使用されるカプシドタンパク質が異なるＡＡＶ血清型のものに由来するシュードタイプ誘導体であり得ることが理解される。ベクターの選択において制限されることを意図しないが、例示的なＡＡＶ血清型のリストは、表１８に見出すことができる。一部の実施形態では、遺伝子組換えに使用されるＡＡＶは、文献（例えば、Ｄａｖｉｄｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ　２０１９）で示されているように、新規細胞又は組織の向性について進化し得る。

【０５０９】

一部の実施形態では、ＡＡＶ送達ベクターは、２つのＡＡＶ逆位末端リピート（ＩＴＲ）及び目的のヌクレオチド配列（例えば、遺伝子組換えポリペプチド若しくはＤＮＡ鋳型又はその両方をコードする配列）を有するベクターであり、前記ＩＴＲはそれぞれ中断された（又は不連続な）パリンドローム配列、すなわち、３つのセグメント：５’→３’で読むと同一であるが、互いに反対に配置するとハイブリダイズする、最初のセグメント及び最後のセグメント並びに同一のセグメントを分離する異なるセグメントから構成される配列を有する。例えば、国際公開第２０１２１２３４３０号パンフレットを参照されたい。

【０５１０】

従来、カプシドを有するＡＡＶビリオンは、ｒＡＡＶ又はｓｃＡＡＶゲノム、Ｒｅｐタンパク質、及びＣａｐタンパク質をコードする１つ又は複数のプラスミドを導入することによって産生される（Ｇｒｉｍｍ　ｅｔ　ａｌ，１９９８）。これらのヘルパープラスミドがトランスで導入されると、ＡＡＶゲノムは宿主ゲノムから「レスキュー」され（すなわち、放出され、その後回復される）、更にカプシド化されて感染性ＡＡＶが産生される。一部の実施形態では、１つ又は複数の遺伝子組換え核酸は、ＩＴＲ隣接核酸をヘルパー機能と一緒にパッケージング細胞に導入することにより、ＡＡＶ粒子にパッケージングされる。

【０５１１】

一部の実施形態では、ＡＡＶゲノムは、ＩＴＲ間に位置する配列が、所望の核酸配列の逆相補体に加えて、所望の核酸配列（例えば、遺伝子組換えポリペプチド又は鋳型をコードするＤＮＡ、又はその両方）の両方を含み、これら２つの成分が折り畳まれて自己ハイブリダイズできるようにするように、いわゆる自己相補性ゲノム（ｓｃＡＡＶと呼ばれる）である。一部の実施形態では、自己相補性モジュールは、ＤＮＡがそれ自体に折り畳まれる（例えば、ステムループを形成する）ことを可能にする介在配列によって分離される。ｓｃＡＡＶには、最初にＩＴＲプライミングと第２の鎖合成に依存してｄｓＤＮＡを形成するのではなく、核に入ると転写の準備ができているという利点がある。一部の実施形態では、１つ又は複数の遺伝子組換え成分がｓｃＡＡＶとして設計され、ここで、ＡＡＶＩＴＲ間の配列は、自己ハイブリダイズしてｄｓＤＮＡを生成することができる２つの逆相補モジュールを含む。

【０５１２】

一部の実施形態では、細胞に送達される核酸（例えば、ポリペプチド、又は鋳型、又はその両方をコードする）は、閉鎖型線状デュープレックスＤＮＡ（ＣＥＬｉＤ　ＤＮＡ又はｃｅＤＮＡ）である。一部の実施形態では、ｃｅＤＮＡは、ＡＡＶゲノムの複製形態に由来する（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　２０１３）。一部の実施形態では、核酸（例えば、ポリペプチド若しくは鋳型ＤＮＡ、又はその両方をコードする）は、ＩＴＲ、例えば、ＡＡＶ　ＩＴＲによって隣接され、ここで、ＩＴＲの少なくとも１つは、末端分解部位及び複製タンパク質結合部位（複製タンパク質結合部位と呼ばれることもある）を含む。一部の実施形態では、ＩＴＲは、アデノ随伴ウイルス、例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、又はそれらの組み合わせに由来する。一部の実施形態では、ＩＴＲは対称的である。一部の実施形態では、ＩＴＲは非対称的である。一部の実施形態では、構築物の複製を可能にするために、少なくとも１つのＲｅｐタンパク質が提供される。一部の実施形態では、少なくとも１つのＲｅｐタンパク質は、アデノ随伴ウイルス、例えば、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ１２、又はそれらの組み合わせに由来する。一部の実施形態では、ｃｅＤＮＡは、産生細胞に、（ｉ）ＩＴＲ、例えば、ＡＡＶ　ＩＴＲが隣接するＤＮＡ、及び（ｉｉ）ＩＴＲ依存性複製に必要な成分、例えばＡＡＶタンパク質Ｒｅｐ７８及びＲｅｐ５２（又はタンパク質をコードする核酸）を提供することによって生成される。一部の実施形態では、ｃｅＤＮＡは、カプシドタンパク質を含まず、例えば、感染性ＡＡＶ粒子にパッケージングされていない。一部の実施形態では、ｃｅＤＮＡはＬＮＰに製剤化される（例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ１号パンフレットを参照）。

【０５１３】

一部の実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、２つの自己相補的配列、例えば、本明細書で定義される非対称又は対称又は実質的に対称なＩＴＲからなり、前記発現カセットに隣接し、ここで、ｃｅＤＮＡベクターはカプシドタンパク質と会合していない。一部の実施形態では、ｃｅＤＮＡベクターは、ＡＡＶゲノムに見出される２つの自己相補性配列を含み、ここで、少なくとも１つのＩＴＲは、作動可能なＲｅｐ結合エレメント（ＲＢＥ）（本明細書では「ＲＢＳ」とも呼ばれることもある）及びＡＡＶ又はＲＢＥの機能的バリアントの末端分解部位（ｔｒｓ）を含む。例えば、国際公開第２０１９１１３３１０号パンフレットを参照されたい。

【０５１４】

一部の実施形態では、ＡＡＶゲノムは、４つの複製タンパク質及び３つのカプシドタンパク質をそれぞれコードする２つの遺伝子を含む。一部の実施形態では、これらの遺伝子は、１４５ｂｐ逆位末端配列（ＩＴＲ）により両側がフランキングされている。一部の実施形態では、ビリオンは、例えば、１：１：１０の比で産生される、最大３つのカプシドタンパク質（Ｖｐ１、Ｖｐ２、及び／又はＶｐ３）を含む。一部の実施形態では、カプシドタンパク質は、同じオープンリーディングフレーム及び／又は異なるスプライシング（Ｖｐ１）並びに別の翻訳開始部位（それぞれＶｐ２及びＶｐ３）から産生される。一般に、Ｖｐ３は、ビリオン中で最も豊富なサブユニットであり、細胞表面での受容体認識に参加して、ウイルスの屈性を定める。一部の実施形態では、Ｖｐ１は、例えばＶｐ１のＮ末端において、ウイルスの感染力において機能するホスホリパーゼドメインを含む。

【０５１５】

一部の実施形態では、ウイルスベクターのパッケージング能力は、ベクターにパッケージングされ得る遺伝子組換えシステムのサイズを制限する。例えば、ＡＡＶのパッケージング能力は、例えば、１つ又は２つの逆位末端配列（ＩＴＲ）、例えば、１４５塩基ＩＴＲを含め、約４．５ｋｂ（例えば、約３．０、３．５、４．０、４．５、５．０、５．５若しくは６．０ｋｂ）であり得る。

【０５１６】

一部の実施形態では、組換えＡＡＶ（ｒＡＡＶ）は、ベクター導入遺伝子カセットをフ

ランキングするシス作用性１４５ｂｐ　ＩＴＲを含み、例えば、外来ＤＮＡのパッケージングのために最大４．５ｋｂを提供する。感染の後、ｒＡＡＶは、いくつかの事例において、本発明の融合タンパク質を発現し、円形の頭－尾コンカテマー内にエピソームとして存在することにより、宿主ゲノムに組み込まれることなく存続する。ｒＡＡＶは、例えば、インビトロ及びインビボで使用することができる。一部の実施形態では、ＡＡＶ媒介遺伝子送達のためには、遺伝子のコーディング配列の長さが野生型ＡＡＶゲノムと等しいか、又はそれ以上である必要がある。

【０５１７】

上記サイズを超える遺伝子のＡＡＶ送達及び／又は大きい生理学的調節エレメントの使用は、例えば、送達しようとするタンパク質を２つ以上の断片に分割することにより、達成することができる。一部の実施形態では、Ｎ－末端断片をインテイン－Ｎ配列と融合させる。一部の実施形態では、Ｃ－末端断片をインテイン－Ｃ配列と融合させる。複数の実施形態では、上記断片を２つ以上のＡＡＶベクターにパッケージングする。

【０５１８】

一部の実施形態では、大きい導入遺伝子発現カセットを２つの個別の半分（５’及び３’末端、又は頭及び尾）に分割することにより、デュアルＡＡＶベクターを作製し、例えば、カセットの各半分を単一のＡＡＶベクター（＜５ｋｂ）にパッケージングする。次に、一部の実施形態では、両方のデュアルＡＡＶベクターによる同じ細胞の同時感染時に、完全長導入遺伝子発現カセットの再アセンブリーを達成することができる。一部の実施形態では、同時感染の後に、（１）５’及び３’ゲノム同士の相同組換え（ＨＲ）（デュアルＡＡＶ重複ベクター）；（２）ＩＴＲ媒介による５’及び３’ゲノムの尾－頭コンカテマー化（デュアルＡＡＶトランス－スプライシングベクター）；及び／又は（３）これら２つの機構の組合せ（デュアルＡＡＶハイブリッドベクター）の１つ若しくは複数が続く。一部の実施形態では、インビボでのデュアルＡＡＶベクターの使用により、完全長タンパク質の発現が達成される。一部の実施形態では、デュアルＡＡＶベクタープラットフォームの使用は、サイズが約４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、又は５．０ｋｂ超の導入遺伝子のための効率的且つ実行可能な遺伝子移入戦略を表している。一部の実施形態では、ＡＡＶベクターは、例えば、核酸及びペプチドのインビトロ生産において、標的核酸で細胞を形質導入するために使用することもできる。一部の実施形態では、ＡＡＶベクターは、インビボ及びエクスビボ遺伝子療法手順に使用することができる（例えば、Ｗｅｓｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１６０：３８－４７（１９８７）；米国特許第４，７９７，３６８号明細書；国際公開第９３／２４６４１号パンフレット；Ｋｏｔｉｎ，Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　５：７９３－８０１（１９９４）；Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９４：１３５１（１９９４）を参照されたい；尚、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。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、そうしたものとして、米国特許第５，１７３，４１４号明細書；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）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）が挙げられる。

【０５１９】

一部の実施形態では、本明細書に記載の遺伝子組換えポリペプチド（例えば、１つ若しくは複数のガイド核酸を含む、又は含まない）は、ＡＡＶ、レンチウイルス、アデノウイルス、又は他のプラスミド若しくはウイルスベクタータイプを用いて送達することができ、とりわけ、例えば、米国特許第８，４５４，９７２号明細書（アデノウイルス用の製剤、用量）、米国特許第８，４０４，６５８号明細書（ＡＡＶ用の製剤、用量）、及び米国特許第５，８４６，９４６号明細書（ＤＮＡプラスミド用の製剤、用量）並びにレンチウ

イルス、ＡＡＶ及びアデノウイルスに関係する臨床試験及びそうした臨床試験に関する刊行物から得られる製剤及び用量を用いて、送達することができる。例えば、ＡＡＶの場合、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第８，４５４，９７２号明細書に記載される通り、及びＡＡＶに関係する臨床試験に記載の通りであり得る。アデノウイルスの場合、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第８，４０４，６５８号明細書に記載される通り、及びアデノウイルスに関係する臨床試験に記載の通りであり得る。プラスミド送達の場合、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第５，８４６，９４６号明細書に記載される通り、及びプラスミドに関係する臨床試験に記載の通りであり得る。用量は、平均７０ｋｇの個体（例えば、成人男性）を基準とするか又はそれに外挿され得、異なる体重及び種の患者、対象、哺乳動物について調節することができる。投与頻度は、患者又は対象の年齢、性別、健康全般、他の状態を含む通常の要因並びに対処しようとする具体的な病状又は症状に応じて、医学又は獣医療専門家（例えば、医師、獣医師）の範囲内である。一部の実施形態では、ウイルスベクターを目的の組織に注射することができる。細胞型特異的遺伝子組換えの場合、遺伝子組換えポリペプチド及び任意選択のガイド核酸の発現は、一部の実施形態では、細胞型特異的プロモータによって駆動することができる。

【０５２０】

一部の実施形態では、ＡＡＶは、免疫応答を活性化し得る細胞粒子の超遠心分離を必要としない精製方法のために、低毒性を可能にする。一部の実施形態では、ＡＡＶは、例えば、それが実質的に宿主ゲノムに組み込まれないことから、挿入突然変異誘発を引き起こす低い可能性を可能にする。

【０５２１】

一部の実施形態では、ＡＡＶは、約４．４、４．５、４．６、４．７、又は４．７５ｋｂのパッケージング限度を有する。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドコード化配列、プロモータ、及び転写終結因子は、単一のウイルスベクターに適合し得る。ＳｐＣａｓ９（４．１ｋｂ）は、いくつかの事例では、ＡＡＶにパッケージングするのが困難であり得る。従って、一部の実施形態では、他の遺伝子組換えポリペプチドコード配列又は塩基編集因子より長さが短い遺伝子組換えポリペプチドコード配列が使用される。一部の実施形態では、遺伝子組換えポリペプチドコード化配列は、約４．５ｋｂ、４．４ｋｂ、４．３ｋｂ、４．２ｋｂ、４．１ｋｂ、４ｋｂ、３．９ｋｂ、３．８ｋｂ、３．７ｋｂ、３．６ｋｂ、３．５ｋｂ、３．４ｋｂ、３．３ｋｂ、３．２ｋｂ、３．１ｋｂ、３ｋｂ、２．９ｋｂ、２．８ｋｂ、２．７ｋｂ、２．６ｋｂ、２．５ｋｂ、２ｋｂ、又は１．５ｋｂ未満である。

【０５２２】

ＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５又はそれらの任意の組合せであり得る。一部の実施形態では、ＡＡＶの種類は、ターゲティングしようとする細胞に関して選択され；例えば、脳又はニューロン細胞をターゲティングするためには、ＡＡＶ血清型１、２、５若しくはハイブリッドカプシドＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５又はそれらの任意の組合せを選択することができるか；又は心臓組織をターゲティングするためにＡＡＶ４を選択することができる。一部の実施形態では、肝臓への送達のために、ＡＡＶ８を選択する。これらの細胞に関する例示的なＡＡＶ血清型は、例えば、Ｇｒｉｍｍ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．８２：５８８７－５９１１（２００８）（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。一部の実施形態では、ＡＡＶは、あらゆる血清型、サブタイプ、及び天然に存在するＡＡＶ並びに組換えＡＡＶを指す。ＡＡＶが用いられるとき、ウイルス自体又はその誘導体を指す場合もある。一部の実施形態では、ＡＡＶとして、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６．２、ＡＡＶ７、ＡＡＶｒｈ．６４Ｒｌ、ＡＡＶｈｕ．３７、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．３２．３３、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ－ＤＪ、ＡＡＶ２／８、ＡＡＶｒｈｌＯ、ＡＡＶＬＫ０３、ＡＶ１０、ＡＡＶ１１、ＡＡＶ　１２、ｒｈｌＯ、及びそれらのハイブリッド、トリＡＡＶ、ウシＡＡＶ、イヌＡＡＶ、ウマＡＡＶ、霊長類ＡＡＶ、非霊長類ＡＡＶ、及びヒツジＡＡＶが挙げられる。ＡＡＶの様々な血清型のゲノム配列並びにネ

イティブ末端反復（ＴＲ）、Ｒｅｐタンパク質及びカプシドサブユニットの配列は、当技術分野で公知である。こうした配列は、文献又はＧｅｎＢａｎｋなどの公式データベースで見出すことができる。別の例示的なＡＡＶ血清型を表１８に挙げる。

【０５２３】

【表１８】

表 18. 例示的な AAV 血清型。

標的組織	ビヒクル	参照文献
肝臓	AAV (AAV8[1], AAVrh.8[1], AAVhu.37[1], AAV2/8, AAV2/rh10[2], AAV9, AAV2, NP40[3], NP59[2,3], AAV3B[5], AAV-DJ[4], AAV-LK01[4], AAV-LK02[4], AAV-LK03[4], AAV-LK19[4], AAV5[7] アデノウイルス (Ad5, HC-AdV[6])	1. Wang *et al.*, *Mol. Ther.* **18**, 118-25 (2010) 2. Ginn *et al.*, *JHEP Reports*, 100065 (2019) 3. Paulk *et al.*, *Mol. Ther.* **26**, 289-303 (2018). 4. L. Lisowski *et al.*, *Nature*. **506**, 382-6 (2014). 5. L. Wang *et al.*, *Mol. Ther.* **23**, 1877-87 (2015). 6. Hausl *Mol Ther* (2010) 7. Davidoff *et al.*, *Mol. Ther.* 11, 875-88 (2005)
肺	AAV (AAV4, AAV5, AAV6[1], AAV9, H22[2]) アデノウイルス (Ad5, Ad3, Ad21, Ad14)[3]	1. Duncan *et al.*, *Mol Ther Methods Clin Dev* (2018) 2. Cooney *et al.*, Am J Respir Cell Mol Biol (2019) 3. Li *et al.*, *Mol Ther Methods Clin Dev* (2019)
皮膚	AAV (AAV6[1], AAV-LK19[2])	1. Petek et al., *Mol. Ther.* (2010) 2. L. Lisowski *et al.*, *Nature*. **506**, 382-6 (2014).
HSC	アデノウイルス (HDAd5/35^{++})	Wang et al. *Blood Adv* (2019)

【０５２４】

一部の実施形態では、医薬組成物（例えば、本明細書に記載のＡＡＶを含む）は、１０％未満の空のカプシド、８％未満の空のカプシド、７％未満の空のカプシド、５％未満の空のカプシド、３％未満の空のカプシド、又は１％未満の空のカプシドを有する。一部の実施形態では、医薬組成物は、約５％未満の空のカプシドを有する。一部の実施形態では、空のカプシドの数は、検出限界未満である。一部の実施形態では、例えば、空のカプシドは、有害な反応（例えば、免疫応答、炎症性応答、肝臓の反応、及び／又は心臓の反応）を起こす恐れがあり、例えば、実質的な治療利益がほとんど若しくは全くないことから、医薬組成物は少量の空のカプシドを有するのが有利である。

【０５２５】

一部の実施形態では、医薬組成物中の残留宿主細胞タンパク質（ｒＨＣＰ）は、１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり１００ｎｇ／ｍｌ以下のｒＨＣＰ、例えば、１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり４０ｎｇ／ｍｌ以下のｒＨＣＰ又は１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり１～５０ｎｇ／ｍｌのｒＨＣＰである。一部の実施形態では、医薬組成物は、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり１０ｎｇ未満のｒＨＣＰ若しくは１．０×１０^{13}ｖｇ当たり５ｎｇ未満のｒＨＣＰ、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり４ｎｇ未満のｒＨＣＰ若しくは１．０×１０^{13}ｖｇ当たり３ｎｇ未満のｒＨＣＰ、又はこれらの間の任意の濃度を含む。一部の実施形態では、医薬組成物中の残留宿主細胞ＤＮＡ（ｈｃＤＮＡ）は、１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり５×１０^{6}ｐｇ／ｍｌ以下のｈｃＤＮＡ、１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり１．２×１０^{6}ｐｇ／ｍｌ以下のｈｃＤＮＡ、又は１×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり１×１０^{5}ｐｇ／ｍｌのｈｃＤＮＡである。一部の実施形態では、前記医薬組成物中の残留宿主細胞ＤＮＡは、１×１０^{13}ｖｇ当たり５．０×１０^{5}ｐｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり２．０×１０^{5}ｐｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり１．１×１０^{5}ｐｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり１．０×１０^{5}ｐｇ未満のｈｃＤＮＡ、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．９×１０^{5}ｐｇ未満のｈｃＤＮＡ、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．８×１０^{5}ｐｇ未満のｈｃＤＮＡ又はこれらの間の任意の濃度である。

【０５２６】
一部の実施形態では、医薬組成物中の残留プラスミドＤＮＡは、１．０×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり１．７×１０^{5}ｐｇ／ｍｌ以下、１×１．０×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり１×１０^{5}ｐｇ／ｍｌ、又は１．０×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ当たり１．７×１０^{6}ｐｇ／ｍｌである。一部の実施形態では、医薬組成物中の残留ＤＮＡプラスミドは、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり１０．０×１０^{5}ｐｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり８．０×１０^{5}ｐｇ未満、又は１．０×１０^{13}ｖｇ当たり６．８×１０^{5}ｐｇ未満である。一部の実施形態では、医薬組成物は、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．５ｎｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．３ｎｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．２２ｎｇ未満若しくは１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．２ｎｇ未満、又は任意の中間濃度のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含む。複数の実施形態では、医薬組成物中のベンゾナーゼは、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．２ｎｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．１ｎｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．０９ｎｇ未満、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり０．０８ｎｇ未満、又は任意の中間濃度である。複数の実施形態では、医薬組成物中のポロキサマー１８８は、約１０～１５０ｐｐｍ、約１５～１００ｐｐｍ又は約２０～８０ｐｐｍである。複数の実施形態では、医薬組成物中のセシウムは、５０ｐｇ／ｇ（ｐｐｍ）未満、３０ｐｇ／ｇ（ｐｐｍ）未満若しくは２０ｐｇ／ｇ（ｐｐｍ）未満、又は任意の中間濃度である。
【０５２７】
複数の実施形態では、医薬組成物は、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより測定して、１０％未満、８％未満、７％未満、６％未満、５％未満、４％未満、３％未満、２％未満又はそれらの間の任意のパーセンテージの総不純物を含む。複数の実施形態では、総不純物は、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより測定して、９０％超、９２％超、９３％超、９４％超、９５％超、９６％超、９７％超、９８％超又はそれらの間の任意のパーセンテージである。複数の実施形態では、単一の不特定関連不純物はいずれも、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより測定して、５％超、４％超、３％超若しくは２％超又はそれらの間の任意のパーセンテージである。複数の実施形態では、医薬組成物は、総カプシド（分析用超遠心により測定して、ピーク１＋ピーク２）に対して、８５％超、８６％超、８７％超、８８％超、８９％超、９０％超、９１％超、９１．９％超、９２％超、９３％超のパーセンテージ又はそれらの間の任意のパーセンテージの充填カプシドを含む。医薬組成物の複数の実施形態では、分析用超遠心によりピーク１で測定した充填カプシドのパーセンテージは、２０～８０％、２５～７５％、３０～７５％、３５～７５％、又は３７．４～７０．３％である。医薬組成物の複数の実施形態では、分析用超遠心によりピーク２で測定した充填カプシドのパーセンテージは、２０～８０％、２０～７０％、２２～６５％、２４～６２％、又は２４．９～６０．１％である。
【０５２８】
一実施形態では、医薬組成物は、１．０～５．０×１０^{13}ｖｇ／ｍＬ、１．２～３．０×１０^{13}ｖｇ／ｍＬ、又は１．７～２．３×１０^{13}ｖｇ／ｍｌのゲノム力価を含む。一実施形態では、医薬組成物は、５ＣＦＵ／ｍＬ未満、４ＣＦＵ／ｍＬ未満、３ＣＦＵ／ｍＬ未満、２ＣＦＵ／ｍＬ未満若しくは１ＣＦＵ／ｍＬ未満、又は任意の中間濃度の生物学的負荷を示す。複数の実施形態では、ＵＳＰ、例えば、ＵＳＰ＜８５＞（その全体が参照により組み込まれる）に従うエンドトキシンの量は、１．０ＥＵ／ｍＬ未満、０．８ＥＵ／ｍＬ未満、又は０．７５ＥＵ／ｍＬ未満である。複数の実施形態では、ＵＳＰ、例えば、ＵＳＰ＜７８５＞（その全体が参照により組み込まれる）に従う医薬組成物の浸透圧は、３５０～４５０ｍＯｓｍ／ｋｇ、３７０～４４０ｍＯｓｍ／ｋｇ又は３９０～４３０ｍＯｓｍ／ｋｇである。複数の実施形態では、医薬組成物は、容器当たり１２００個未満の２５μｍ超の粒子、容器当たり１０００個未満の２５μｍ超の粒子、容器当たり５００個未満の２５μｍ超の粒子、又は任意の中間値を含有する。複数の実施形態では、医薬組成物は、容器当たり１０，０００個未満の１０μｍ超の粒子、容器当たり８０００個未満の１０μｍ超の粒子又は容器当たり６００個未満の１０ｐｍ超の粒子を含有する。
【０５２９】

一実施形態では、医薬組成物は、０．５～５．０×１０^{13}ｖｇ／ｍＬ、１．０～４．０×１０^{13}ｖｇ／ｍＬ、１．５～３．０×１０^{13}ｖｇ／ｍｌ又は１．７～２．３×１０^{13}ｖｇ／ｍｌのゲノム力価を有する。一実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、以下の１つ又は複数を含む：１．０×１０^{13}ｖｇ当たり約０．０９ｎｇ未満のベンゾナーゼ、約３０ｐｇ／ｇ（ｐｐｍ）未満のセシウム、約２０～８０ｐｐｍのポロキサマー１８８、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり約０．２２ｎｇ未満のＢＳＡ、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり約６．８×１０^{5}ｐｇ未満の残留ＤＮＡプラスミド、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり約１．１×１０^{5}ｐｇ未満の残留ｈｃＤＮＡ、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり約４ｎｇ未満のｒＨＣＰ、ｐＨ７．７～８．３、約３９０～４３０ｍＯｓｍ／ｋｇ、容器当たり約６００個未満の粒径＞２５μｍの粒子、容器当たり約６０００個未満の粒径＞１０μｍの粒子、約１．７×１０^{13}～２．３×１０^{13}ｖｇ／ｍＬのゲノム力価、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり約３．９×１０^{8}～８．４×１０^{10}ＩＵの感染力価、１．０×１０^{13}ｖｇ当たり約１００～３００ｐｇの総タンパク質、約７．５×１０^{13}ｖｇ／ｋｇ用量のウイルスベクターを用いたＡ７ＳＭＡマウスで＞２４日の平均生存期間、インビトロ細胞アッセイに基づき約７０～１３０％の相対効力及び／又は約５％未満の空のカプシド。様々な実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、本明細書で扱うウイルス粒子のいずれかを含み、参照基準の±２０％、±１５％、±１０％又は±５％の効力を保持する。一部の実施形態では、好適なインビトロ細胞アッセイ又はインビボ動物モデルを用いて、効力を測定する。

【０５３０】

ＡＡＶ粒子の別の調製、特性決定、及び投与方法は、国際公開第２０１９０９４２５３号パンフレット（その全体が、参照により本明細書に組み込まれる）に教示されている。

【０５３１】

本発明と一致して使用することができる別のｒＡＡＶ構築物として、表１を含め、／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０３８／ｓ４１５７３－０１９－００１２－９で入手可能なＷａｎｇ　ｅｔ　ａｌ　２０１９（その全体が、参照により組み込まれる）に記載されているものが挙げられる。

【０５３２】

脂質ナノ粒子

本明細書で提供される方法及びシステムは、特定の実施形態では、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を含む任意の好適な担体又は送達方法を含み得る。脂質ナノ粒子は、一部の実施形態において、１つ若しくは複数のイオン脂質、例えば、非カチオン脂質（例えば、中性若しくはアニオン、又は双性イオン脂質）；１つ若しくは複数の共役脂質（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレットの表５に記載される、ＰＥＧ共役脂質又はポリマーと共役した脂質など）；１つ若しくは複数のステロール（例えば、コレステロール）；並びに任意選択で１つ若しくは複数のターゲティング分子（例えば、共役受容体、受容体リガンド、抗体）；又はこれらの組合せを含む。

【０５３３】

ナノ粒子形成（例えば、脂質ナノ粒子）に使用することができる脂質として、例えば、国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の表４に記載されるものが挙げられ、例えば、脂質含有ナノ粒子は、国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレットの表４に示される脂質の１つ又は複数を含み得る。脂質ナノ粒子は、ポリマー、例えば、国際公開第２０１９２１７９４１号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の表５に記載されるポリマーなどの別の要素を含み得る。

【０５３４】

一部の実施形態では、共役脂質は、存在する場合、ＰＥＧ－ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）（例えば、１－（モノメトキシ－ポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ））、ＰＥＧ－ジアルキルオキシプロピル（ＤＡＡ）、ＰＥＧ－リン脂質、ＰＥＧ－セラミド（Ｃｅｒ）、ペグ化ホスファチジルエタノールア

ミン（ＰＥＧ－ＰＥ）、ＰＥＧ－コハク酸ジアシルグリセロール（ＰＥＧＳ－ＤＡＧ）（例えば、４－０－（２’，３’－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル－１－０－（ｗ－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオエート（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ））、ＰＥＧジアルコキシプロピルカルバム、Ｎ－（カルボニル－１－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ナトリウム塩及び国際公開第２０１９０５１２８９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）並びにこれらの組合せの１つ又は複数を含む。

【０５３５】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子に組み込むことができるステロールは、コレステロール又はこれらのコレステロール誘導体、例えば、国際公開第２００９／１２７０６０号パンフレット又は米国特許出願公開第２０１０／０１３０５８８号明細書（参照により本明細書に組み込まれる）に記載のものなどを含む。別の例示的なステロールとして、フィトステロールが挙げられ、Ｅｙｇｅｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ（２０２０），ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０２１／ａｃｓ．ｎａｎｏｌｅｔｔ．０ｃ０１３８６（参照により本明細書に組み込まれる）に記載のものを含む。

【０５３６】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、イオン化性脂質、非カチオン脂質、粒子の凝集を阻害する共役脂質、及びステロールを含む。これらの成分の量は、独立して、且つ所望の特性を達成するように変動し得る。例えば、一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、総脂質の約２０ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％の量のイオン化性脂質（他の実施形態では、それは、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の２０～７０％（ｍｏｌ）、３０～６０％（ｍｏｌ）若しくは４０～５０％（ｍｏｌ）；約５０ｍｏｌ％～約９０ｍｏｌ％であり得る）、総脂質の約５ｍｏｌ％～約３０ｍｏｌ％の量の非カチオン脂質、総脂質の約０．５ｍｏｌ％～約２０ｍｏｌ％の量の共役脂質、及び総脂質の約２０ｍｏｌ％～約５０ｍｏｌ％の量のステロールを含む。核酸（例えば、遺伝子組換えポリペプチド又は鋳型核酸をコードする）に対する総脂質の比は、要望に応じて変動し得る。例えば、核酸に対する総脂質（質量又は重量）は、約１０：１～約３０：１であり得る。

【０５３７】

一部の実施形態では、イオン化性脂質は、カチオン性脂質、イオン化性カチオン性脂質、例えば、ｐＨに応じて正に帯電した形態又は中性の形態で存在することができるカチオン性脂質、又は容易にプロトン化され得るアミン含有脂質であり得る。一部の実施形態では、カチオン性脂質は、例えば生理学的条件下で、正に荷電することができる脂質である。例示的なカチオン性脂質には、正電荷を保持する１つ又は複数のアミン基が含まれる。一部の実施形態では、脂質粒子は、中性脂質、イオン化性アミン含有脂質、生分解性アルキン脂質、ステロイド、多価不飽和脂質を含むリン脂質、構造脂質（例えば、ステロール）、ＰＥＧ、コレステロール及びポリマー共役脂質の１つ又は複数とともに、製剤中にカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、カチオン性脂質は、イオン化可能なカチオン性脂質であり得る。本明細書に開示される例示的なカチオン性脂質は、６．０を超える有効ｐＫａを有し得る。実施形態では、脂質ナノ粒子は、第１カチオン性脂質と異なる有効ｐＫａ（例えば、第１有効ｐＫａより大きい）を有する第２カチオン性脂質を含み得る。脂質ナノ粒子は、脂質ナノ粒子内に封入されているか、又はそれと会合している、４０～６０モルパーセントのカチオン性脂質、中性脂質、ステロイド、ポリマー共役脂質、及び治療剤、例えば、本明細書に記載の核酸（例えば、ＲＮＡ）（例えば、鋳型核酸又は遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸）を含み得る。一部の実施形態では、核酸はカチオン性脂質と共製剤化される。核酸は、ＬＮＰ、例えば、カチオン性脂質を含むＬＮＰの表面に吸着され得る。一部の実施形態では、核酸は、ＬＮＰ、例えば、カチオン性脂質を含むＬＮＰに封入され得る。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、例えば、ターゲティング剤でコーティングされたターゲティング部分を含み得る。実施形態では、ＬＮＰ製剤は生分解性である。一部の実施形態では、本明細書に記載の１つ又は複数の脂質、例えば、式（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉ）、（ｖｉｉ）及び／又は（ｉｘ）を含む脂質ナノ粒子は

、少なくとも１％、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は１００％のＲＮＡ分子、例えば、鋳型ＲＮＡ及び／又は遺伝子組換えポリペプチドをコードするｍＲＮＡを封入する。

【０５３８】

一部の実施形態では、脂質と核酸の比（質量／質量比；ｗ／ｗ比）は、約１：１～約２５：１、約１０：１～約１４：１、約３：１～約１５：１、約４：１～約１０：１、約５：１～約９：１、又は約６：１～約９：１の範囲であり得る。脂質及び核酸の量は、所望のＮ／Ｐ比、例えば、３、４、５、６、７、８、９、又は１０以上のＮ／Ｐ比を提供するように、調節することができる。一般に、脂質ナノ粒子製剤の総脂質含量は、約５ｍｇ／ｍｌ～約３０ｍｇ／ｍｌであり得る。

【０５３９】

脂質ナノ粒子製剤に使用することができる例示的なイオン化性脂質は、限定されないが、国際公開第２０１９０５１２８９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の表１に列挙されるものを含む。別の例示的な脂質として、限定されないが、以下の式の１つ若しくは複数が挙げられる：米国特許出願公開第２０１６／０３１１７５９号明細書のＸ；米国特許出願公開第２０１５０３７６１１５号又は米国特許第２０１６／０３７６２２４号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１６０１５１２８４号明細書のＩ、ＩＩ又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１７０２１０９６７号明細書のＩ、ＩＡ、ＩＩ、又はＩＩＡ；米国特許出願公開第２０１５０１４００７０号明細書のＩ－ｃ；米国特許出願公開第２０１３／０１７８５４１号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／０３０３５８７号又は米国特許第２０１３／０１２３３３８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１５／０１４１６７８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１５／０２３９９２６号明細書のＩＩ、ＩＩＩ、ＩＶ、又はＶ；米国特許出願公開第２０１７／０１１９９０４号明細書のＩ；国際公開第２０１７／１１７５２８号パンフレットのＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１２／０１４９８９４号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１５／００５７３７３号明細書のＡ；国際公開第２０１３／１１６１２６号パンフレットのＡ；米国特許出願公開第２０１３／００９０３７２号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／０２７４５２３号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／０２７４５０４号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１３／００５３５７２号明細書のＡ；国際公開第２０１３／０１６０５８号パンフレットのＡ；国際公開第２０１２／１６２２１０号パンフレットのＡ；米国特許出願公開第２００８／０４２９７３号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１２／０１２８７６７０号明細書のＩ、ＩＩ、ＩＩＩ又はＩＶ；米国特許出願公開第２０１４／０２００２５７号明細書のＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１５／０２０３４４６号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１５／０００５３６３号明細書のＩ又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１４／０３０８３０４号明細書のＩ、ＩＡ、ＩＢ、ＩＣ、ＩＤ、ＩＩ、ＩＩＡ、ＩＩＢ、ＩＩＣ、ＩＩＤ、又はＩＩＩ－ＸＸＩＶ；米国特許出願公開第２０１３／０３３８２１０号明細書の；国際公開第２００９／１３２１３１号パンフレットのＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、又はＩＶ；米国特許出願公開第２０１２／０１０１１４７８号明細書のＡ；米国特許出願公開第２０１２／００２７７９６号明細書のＩ又はＸＸＸＶ；米国特許出願公開第２０１２／００５８１４４号明細書のＸＩＶ又はＸＶＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０３２３２６９号明細書の；米国特許出願公開第２０１１／０１１７１２５号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１１／０２５６１７５号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１２／０２０２８７１号明細書のＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、ＩＶ、Ｖ、ＶＩ、ＶＩＩ、ＶＩＩＩ、ＩＸ、Ｘ、ＸＩ、ＸＩＩ；米国特許出願公開第２０１１／００７６３３５号明細書のＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、ＩＶ、Ｖ、ＶＩ、ＶＩＩ、ＶＩＩＩ、Ｘ、ＸＩＩ、ＸＩＩＩ、ＸＩＶ、ＸＶ、又はＸＶＩ；米国特許出願公開第２００６／００８３７８号明細書のＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１２３３３８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１５／００６４２４２号明細

書のＩ又はＸ－Ａ－Ｙ－Ｚ；米国特許出願公開第２０１３／００２２６４９号明細書のＸＶＩ、ＸＶＩＩ、又はＸＶＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１１６３０７号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１１６３０７号明細書のＩ、ＩＩ、又はＩＩＩ；米国特許出願公開第２０１０／００６２９６７号明細書のＩ又はＩＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１８９３５１号明細書のＩ～Ｘ；米国特許出願公開第２０１４／００３９０３２号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書のＶ；米国特許出願公開第２０１６／０３１７４５８号明細書のＩ；米国特許出願公開第２０１３／０１９５９２０号明細書のＩ；米国特許第１０，２２１，１２７号明細書の５、６、又は１０；国際公開第２０１８／０８１４８０号パンフレットのＩＩＩ－３；国際公開第２０２０／０８１９３８号パンフレットのＩ－５又はＩ－８；米国特許第９，８６７，８８８号明細書の１８又は２５；米国特許出願公開第２０１９／０１３６２３１号明細書のＡ；国際公開第２０２０／２１９８７６号パンフレットのＩＩ；米国特許出願公開第２０１２／００２７８０３号明細書の１；米国特許出願公開第２０１９／０２４０３４９号明細書のＯＦ－０２；米国特許第１０，０８６，０１３号明細書の２３；Ｍｉａｏ　ｅｔ　ａｌ（２０２０）のｃＫＫ－Ｅ１２／Ａ６；国際公開第２０１０／０５３５７２号パンフレットのＣ１２－２００；Ｄａｈｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ（２０１７）の７Ｃ１；Ｗｈｉｔｅｈｅａｄ　ｅｔ　ａｌの３０４－Ｏ１３又は５０３－Ｏ１３；米国特許第９，７０８，６２８号明細書のＴＳ－Ｐ４Ｃ２；国際公開第２０２０／１０６９４６号パンフレットのＩ；国際公開第２０２０／１０６９４６号パンフレットのＩ。

【０５４０】

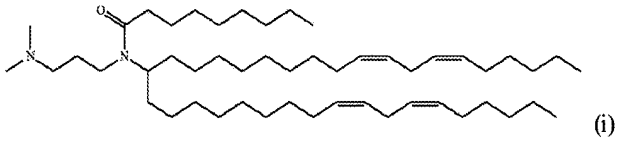
一部の実施形態では、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の実施例９に記載されているように、ＭＣ３（６Ｚ，９Ｚ，２８Ｚ，３　ｌＺ）－ヘプタトリアコンタ－６，９，２８，３，ｌ－テトラエン－ｌ９－イル－４－（ジメチルペンチルアミノ）ブタノエート（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ又はＭＣ３）である。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１０に記載されているように、脂質ＡＴＸ－００２である。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１１に記載されているように、（ｌ３Ｚ，ｌ６Ｚ）－Ａ，Ａ－ジメチル－３－ノニルドコサ－ｌ３、ｌ６－ジエン－１－アミン（化合物３２）である。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１２に記載されているように、化合物６又は化合物２２である。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、例えば、米国特許第９，８６７，８８８号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１に記載されている、ヘプタデカン－９－イル８－（（２－ヒドロキシエチル）（６－オキソ－６－（ウンデシルオキシ）ヘキシル）アミノ）オクタノエート（ＳＭ－１０２）である。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１５／０９５３４０号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１３で合成された、９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエート（ＬＰ０１）である。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、ジ（（Ｚ）－ノン－２－エン－１－イル）９－（（４－ジメチルアミノ）ブタノイル）オキシ）ヘプタデカンジオエート（Ｌ３１９）であり、例えば、米国特許出願公開第２０１２／００２７８０３号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例７、８、又は９で合成される。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、例えば、国際公開第２０１０／０５３５７２号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の実施例１４及び１６で合成された、１，１’－（（２－（４－（２－（（２－（ビス（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）（２－ヒドロキシドデシル）アミノ）エチル）ピペラジン－１－イル）エチル）アザンジイル）ビス（ドデカン－２－オール）（Ｃ１２－２００）であ

る。一部の実施形態では、イオン化性脂質は、イミダゾールコレステロールエステル（ＩＣＥ）脂質（３Ｓ，１０Ｒ，１３Ｒ，１７Ｒ）－１０，１３－ジメチル－１７－（（Ｒ）－６－メチルヘプタン－２－イル）－２，３，４，７，８，９，１０，１１，１２，１３，１４，１５，１６，１７－テトラデカヒドロ－１Ｈ－シクロペンタ［ａ］フェナントレン－３－イル３－（１Ｈ－イミダゾール－４－イル）プロパノエート、例えば、国際公開第２０２０／１０６９４６号パンフレット（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の構造（Ｉ）である。

【０５４１】

本明細書に記載の組成物、例えば、本明細書に記載の核酸（例えば、ＲＮＡ）（例えば、鋳型核酸又は遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸）、の送達のための脂質ナノ粒子を形成するために（例えば、他の脂質成分と組み合わせて）使用され得る脂質化合物のいくつかの非限定的な例は、

【化１３】



(i)

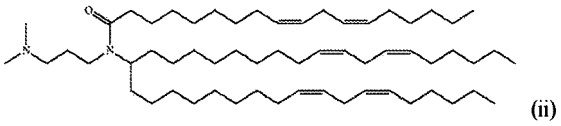
を含む。

【０５４２】

一部の実施形態では、式（ｉ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５４３】

【化１４】

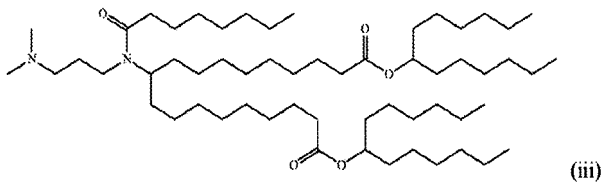


(ii)

一部の実施形態では、式（ｉｉ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５４４】

【化１５】

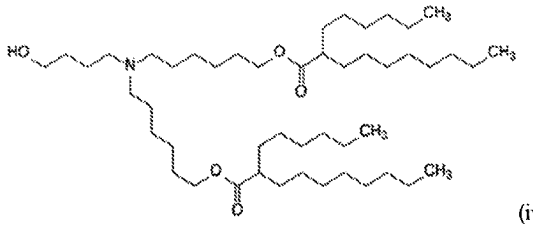


(iii)

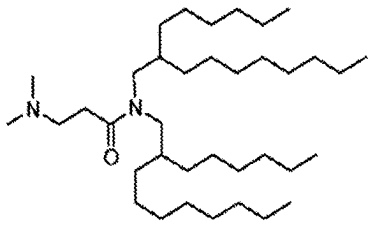
一部の実施形態では、式（ｉｉｉ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５４５】

【化１６】



(iv)

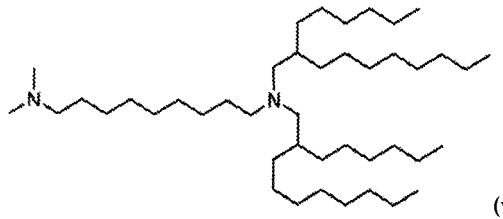


(v)

一部の実施形態では、式（ｖ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５４６】

【化１７】

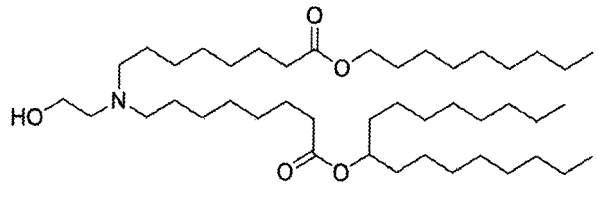


(vi)

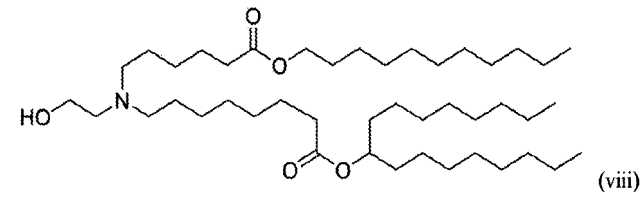
一部の実施形態では、式（ｖｉ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５４７】

【化１８】



(vii)

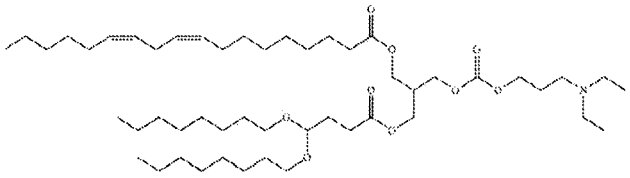


(viii)

一部の実施形態では、式（ｖｉｉｉ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５４８】

【化１９】

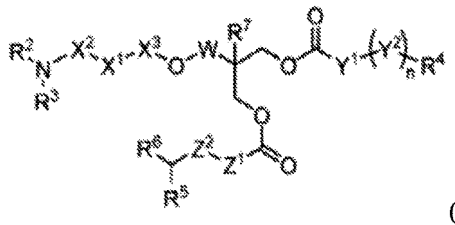


(ix)

一部の実施形態では、式（ｉｘ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５４９】

【化２０】

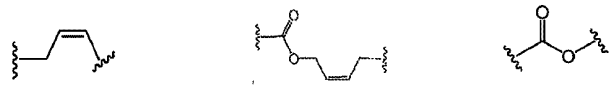


(x)

式中、

X^1はＯ、NR^1、又は直接結合であり、X^2はＣ２～５アルキレンであり、X^3はＣ（＝０）又は直接結合であり、R^1はＨ又はＭｅであり、R^3はＣｉ～３アルキルであり、R^2はＣｉ～３アルキルであるか、又はR^2はそれが結合している窒素原子及びX^2の１～３個の炭素原子と一緒になって、４、５、又は６員環を形成するか、又はX^1はNR^1、R^1及びR^2であり、それらが結合している窒素原子と一緒になって、５又は６員環を形成するか、又はR^2はR^3及びそれらが結合している窒素原子と一緒になって、５、６、又は７員環を形成し、Y^1はＣ２～１２アルキレンであり、Y^2は

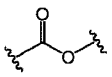
【化２１】



（いずれかの配向）、（いずれかの配向）、（いずれかの配向）

から選択され、ｎは０～３であり、R^4はＣｉ～１５アルキルであり、Z^1はＣｉ～６アルキレン又は直接結合であり、Z^2は

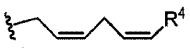
【化２２】



又は非存在であり、ただし、Z^1が直接結合である場合、Z^2は非存在であり；

R^5はＣ５～９アルキル又はＣ６～１０アルコキシであり、R^6はＣ５～９アルキル又はＣ６～１０アルコキシであり、Ｗはメチレン又は直接結合であり、R^7はＨ若しくはＭｅ、又はその塩であり、ただし、R^3及びR^2がＣ２アルキルである場合、X^1はＯであり、X^2は直鎖Ｃ３アルキレンであり、X^3はＣ（＝０）であり、Y^1は直鎖Ｃｅアルキレンであり、（Y^2）ｎ－R^4は

【化２３】



であり、R^4は直鎖Ｃ５アルキルであり、Z^1はＣ２アルキレンであり、Z^2は非存在であり、Ｗはメチレンであり、R^7はＨであり、R^5及びR^6はＣｘアルコキシでない。

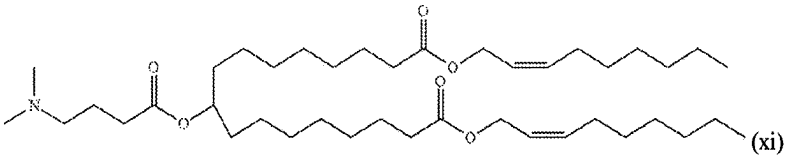
【０５５０】

一部の実施形態では、式（ｘｉｉ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子

組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５５１】

【化２４】

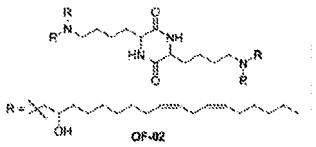


(xi)

一部の実施形態では、式（ｘｉ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

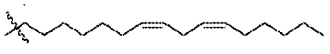
【０５５２】

【化２５】

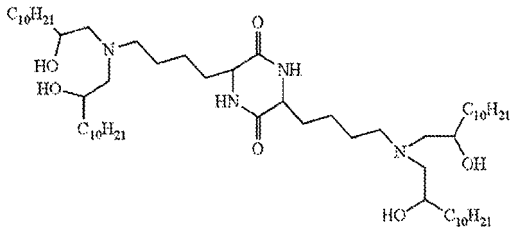


OF-02

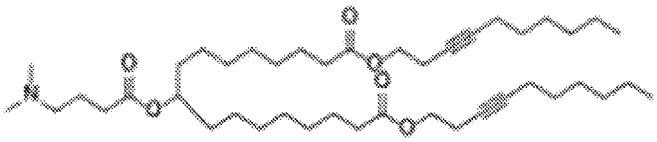
式中 R=



(xii)



(xiii)

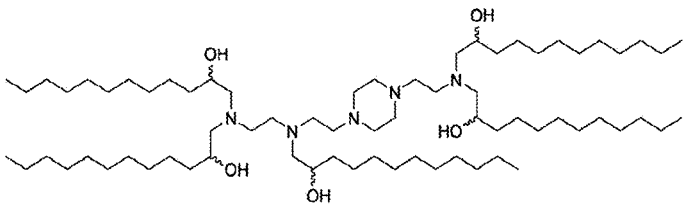


(xiv)

一部の実施形態では、ＬＮＰは、式（ｘｉｉｉ）の化合物及び式（ｘｉｖ）の化合物を含む。

【０５５３】

【化２６】

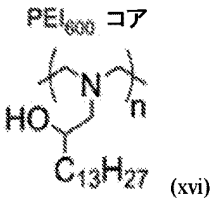


(xv)

一部の実施形態では、式（ｘｖ）を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肝臓及び／又は肝細胞に送達する。

【０５５４】

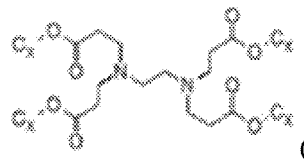
【化２７】



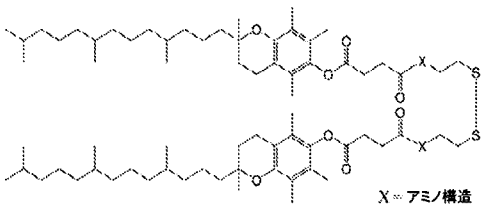
(xvi)

一部の実施形態では、式（ｘｖｉ）の製剤を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肺内皮細胞に送達する。

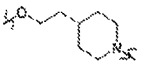
【化２８】



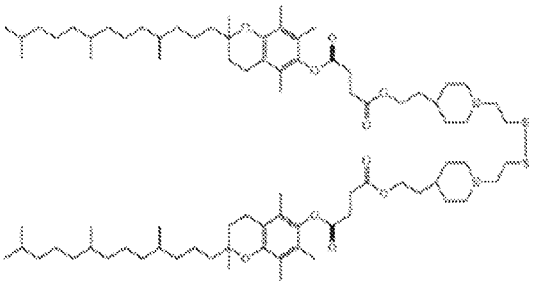
(xvii)



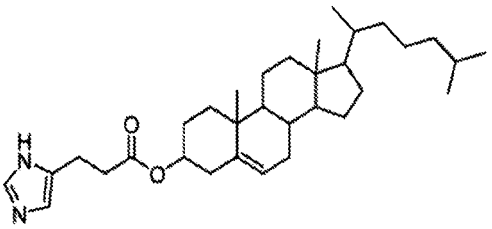
式中 X=



(xviii) (a)



(xviii)(b)

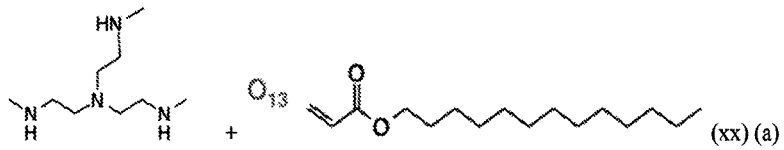


(xix)

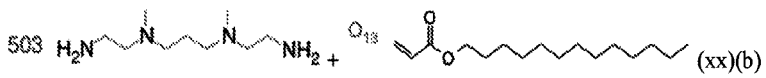
【０５５５】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物、例えば、本明細書に記載の核酸（例えば、ＲＮＡ）（例えば、鋳型核酸又は遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸）、の送達のための脂質ナノ粒子を形成するために使用される脂質化合物は、以下の反応の１つによって作製される：

【化２９】



(xx) (a)



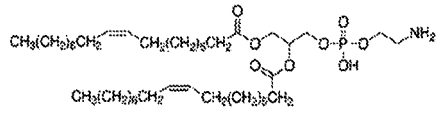
(xx)(b)

【０５５６】

例示的な非カチオン脂質として、限定されないが、以下のものが挙げられる：ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－ホスホエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルコリ

ン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、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）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＰＯＰＥ）、４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボン酸ジオレオイル－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジパルミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジステアロイル－ホスファチジル－エタノールアミン（ＤＳＰＥ）、モノメチル－ホスファチジルエタノールアミン（例えば、１６－Ｏ－モノメチルＰＥ）、ジメチル－ホスファチジルエタノールアミン（例えば、１６－Ｏ－ジメチルＰＥ）、１８－１－トランスＰＥ、１－ステアロイル－２－オレオイル－１－ホスファチジルエタノールアミン（ＳＯＰＥ）、水素添加ダイズホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、卵ホスファチジルコリン（ＥＰＣ）、ジオレオイルホスファチジルセリン（ＤＯＰＳ）、スフィンゴミエリン（ＳＭ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（ＤＭＰＧ）、ジステアロイルホスファチジルグリセロール（ＤＳＰＧ）、ジエルコイルホスファチジルコリン（ＤＥＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール（ＰＯＰＧ）、ジエライドイル－ホスファチジルエタノールアミン（ＤＥＰＥ）、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リソレシチン、リソホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン（ＥＳＭ）、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、リン酸ジセチル、リソホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン又はそれらの混合物。更に、他のジアセチルホスファチジルコリン及びジアセチルホスファチジルエタノールアミンリン脂質も使用できることが理解される。これらの脂質中のアシル基は、好ましくは、Ｃ１０～２４炭素鎖を有する脂肪酸由来のアシル基、例えば、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、又はオレオイルである。特定の実施形態における別の例示的な脂質として、限定しないが、Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．（２０２０）ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０２１／ａｃｓ．ｎａｎｏｌｅｔｔ．０ｃ０１３８６（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものが挙げられる。こうした脂質には、一部の実施形態では、ｍＲＮＡを用いた肝トランスフェクションを改善することが判明している植物脂質（例えば、ＤＧＴＳ）が含まれる。一部の実施形態では、非カチオン性脂質は、以下の構造を有し得る。

【化３０】



(xxi)

【０５５７】

脂質ナノ粒子での使用に適した非カチオン脂質の他の例として、限定しないが、無リン脂質、例えば、ステアリルアミン、ドデエイルアミン、ヘキサアデシルアミン、パルミチン酸アセチル、リシノール酸グリセロール、ステアリン酸ヘキサデシル、ミリスチン酸イソプロピル、両性アクリルポリマー、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキル－アリール硫酸塩ポリエトキシル化脂肪酸アミド、ジオクタデシルジメチルアンモニウム臭化物、セラミド、スフィンゴミエリンなどが挙げられる。他の非カチオン脂質は、国際公開第２０１７／０９９８２３号パンフレット又は米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書に記載されており、それらの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０５５８】

一部の実施形態では、非カチオン脂質は、米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の式Ｉ、ＩＩ若しくはＩＶのオレイン酸又は化合物である。非カチオン脂質は、例えば、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０～３０％（ｍｏｌ）を占め得る。一部の実施形態では、非カチオン脂質含有率は、例えば、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の５～２０％（ｍｏｌ）又は１０～１５％（ｍｏｌ）である。複数の実施形態では、イオン化性脂質と中性脂質のモル比は、約２：１～約８：１（例えば、約２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、又は８：１）の範囲である。

【０５５９】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、リン脂質を一切含まない。

【０５６０】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、膜完全性を賦与するために、ステロールなどの成分を更に含み得る。脂質ナノ粒子に使用することができるステロールの一例は、コレステロール及びその誘導体である。コレステロール誘導体の非限定的な例として、５ａ－コレスタノール、５３－コプロスタノール、コレステリル－（２－ヒドロキシ）－エチルエーテル、コレステリル－（４’－ヒドロキシ）－ブチルエーテル、及び６－ケトコレスタノールなどの極性類似体；５ａ－コレスタン、コレステノン、５ａ－コレスタノン、５ｐ－コレスタノン、及びデカン酸コレステリルなどの非極性類似体；並びにそれらの混合物が挙げられる。一部の実施形態では、コレステロール誘導体は、極性類似体、例えば、コレステリル－（４’－ヒドロキシ）－ブチルエステルである。例示的なコレステロール誘導体は、国際公開第２００９／１２７０６０号パンフレット及び米国特許出願公開第２０１０／０１３０５８８号明細書（これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０５６１】

一部の実施形態では、膜完全性を賦与する成分、例えば、ステロールなどは、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０～５０％（ｍｏｌ）（例えば、０～１０％、１０～２０％、２０～３０％、３０～４０％、又は４０～５０％）を含む。一部の実施形態では、こうした成分は、脂質ナノ粒子の総脂質の２０～５０％（ｍｏｌ）、３０～４０％（ｍｏｌ）である。

【０５６２】

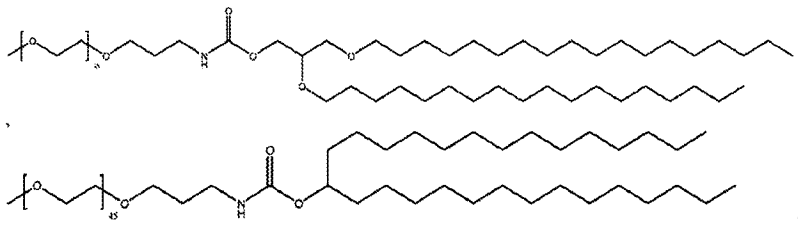
一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）又は共役脂質分子を含み得る。一般に、これらは、脂質ナノ粒子の凝集を阻害し、且つ／又は立体安定化をもたらす。例示的な共役脂質として、限定されないが、ＰＥＧ－脂質コンジュゲート、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）－脂質コンジュゲート、ポリアミド－脂質コンジュゲート（例えば、ＡＴＴＡ－脂質コンジュゲート）、カチオンポリマー脂質（ＣＰＬ）コンジュゲート、及びそれらの混合物が挙げられる。一部の実施形態では、共役脂質分子は、ＰＥＧ－脂質コンジュゲート、例えば、（メトキシポリエチレングリコール）共役脂質である。

【０５６３】

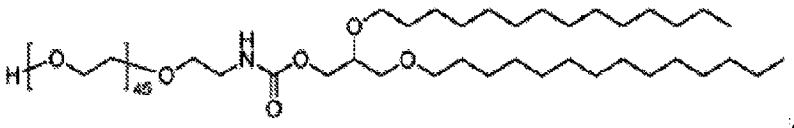
例示的なＰＥＧ－脂質コンジュゲートとして、限定されないが、ＰＥＧ－ジアシルグリセロール（ＤＡＧ）（例えば、１－（モノメトキシ－ポリエチレングリコール）－２，３－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ））、ＰＥＧ－ジアルキルオキシプロピル（ＤＡＡ）、ＰＥＧ－リン脂質、ＰＥＧ－セラミド（Ｃｅｒ）、ペグ化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ、メトキシポリエチレングリコール（ＤＭＧ－ＰＥＧ－２Ｋ）、ＰＥＧコハク酸ジアシルグリセロール（ＰＥＧＳ－ＤＡＧ）（例えば、４－０－（２’，３’－ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル－１－０－（ｗ－メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオエート（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ））、ＰＥＧジアルコキシプロピルカルバム、Ｎ－（カルボニル－１－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ナトリウム塩又はそれらの混合物が挙げられる。別の例示的

なＰＥＧ－脂質コンジュゲートは、例えば、米国特許第５，８８５，６ｌ３号明細書、米国特許第６，２８７，５９ｌ号明細書、米国特許出願公開第２００３／００７７８２９号明細書、米国特許出願公開第２００３／００７７８２９号明細書、米国特許出願公開第２００５／０１７５６８２号明細書、米国特許出願公開第２００８／００２００５８号明細書、米国特許出願公開第２０１１／０１１７１２５号明細書、米国特許出願公開第２０１０／０１３０５８８号明細書、米国特許出願公開第２０１６／０３７６２２４号明細書、米国特許出願公開第２０１７／０１１９９０４号明細書、及び米国特許出願公開第／０９９８２３号明細書に記載されており、これらは全て、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、米国特許出願公開第２０１８／００２８６６４号明細書（その内容は、全体が参照により本明細書に組み込まれる）の式ＩＩＩ、ＩＩＩ－ａ－Ｉ、ＩＩＩ－ａ－２、ＩＩＩ－ｂ－１、ＩＩＩ－ｂ－２の化合物である。一部の実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、米国特許出願公開第２０１５０３７６１１５号明細書又は米国特許出願公開第２０１６／０３７６２２４号明細書（いずれの内容も、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）の式ＩＩのものである。一部の実施形態では、ＰＥＧ－ＤＡＡコンジュゲートは、例えば、ＰＥＧ－ジラウロイルオキシプロピル、ＰＥＧ－ジミリスチルオキシプロピル、ＰＥＧ－ジパルミチルオキシプロピル、又はＰＥＧ－ジステアリルオキシプロピルであり得る。ＰＥＧ－脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧ、ＰＥＧ－ジラウリルグリセロール、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリセロール、ＰＥＧ－ジステリルグリセロール、ＰＥＧ－ジラウリルグリカミド、ＰＥＧ－ジミリスチルグリカミド、ＰＥＧ－ジパルミトイルグリカミド、ＰＥＧ－ジステリルグリカミド、ＰＥＧ－コレステロール（ｌ－［８’－（コレスト－５－エン－３［β］－オキシ）カルボキサミド－３’，６’－ジオキサオクタニル］カルバモイル－［ω］－メチル－ポリ（エチレングリコール）、ＰＥＧ－ＤＭＢ（３，４－ジテトラデコキシルベンジル－［ω］－メチル－ポリ（エチレングリコール）エーテル）、及び１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］の１つ若しくは複数であり得る。一部の実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、ＰＥＧ－ＤＭＧ、１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－２０００］を含む。一部の実施形態では、ＰＥＧ－脂質は、

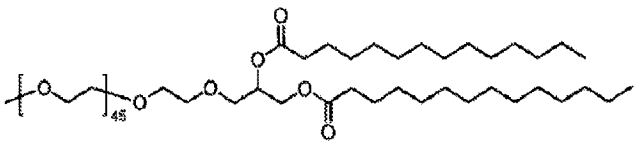
【化３１】



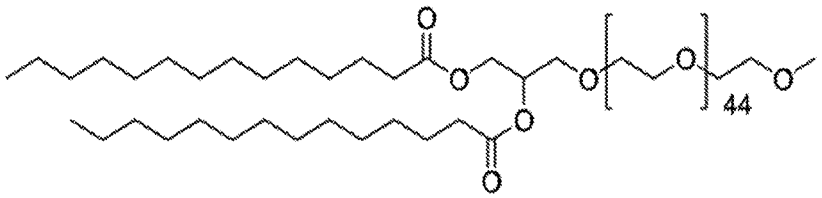
(xxii),



(xxiii),



(xxiv), 及び



(xxv)

から選択される構造を含む。

【０５６４】

一部の実施形態では、ＰＥＧ－脂質の代わりに、ＰＥＧ以外の分子と共役した脂質を使用することもできる。例えば、ＰＥＧ－脂質の代わりに、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）－脂質コンジュゲート、ポリアミド－脂質コンジュゲート（例えば、ＡＴＴＡ－脂質コンジュゲート）、及びカチオンポリマー脂質（ＧＰＬ）コンジュゲートを使用することができる。

【０５６５】

例示的な共役脂質、すなわちＰＥＧ－脂質、（ＰＯＺ）－脂質コンジュゲート、ＡＴＴＡ－脂質コンジュゲート、及びカチオンポリマー脂質は、国際公開第２０１９０５１２８９Ａ９号パンフレットの表２及び国際公開第２０２０１０６９４６Ａ１号パンフレットに列挙されるＰＣＴ及びＬＩＳ特許出願に記載されており、これらの内容は全て、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０５６６】

一部の実施形態では、ＬＮＰは、式（ｘｉｘ）の化合物、式（ｘｘｉ）の化合物及び式（ｘｘｖ）の化合物を含む。一部の実施形態では、式（ｘｉｘ）、式（ｘｘｉ）及び式（ｘｘｖ）の製剤を含むＬＮＰを使用して、本明細書に記載の遺伝子組換え組成物を肺又は肺細胞に送達する。

【０５６７】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子は、式（ｉ）、式（ｉｉ）、式（ｉｉｉ）、式（ｖｉｉ）、及び式（ｉｘ）から選択される１つ又は複数のカチオン性脂質を含み得る。一部の実施形態では、ＬＮＰは、１つ又は複数の中性脂質、例えばＤＳＰＣ、ＤＰＰＣ、ＤＭＰＣ、ＤＯＰＣ、ＰＯＰＣ、ＤＯＰＥ、ＳＭ、ステロイド、例えばコレステロール及び／又は１つ又は複数のポリマーと共役した脂質、例えばＰＥＧ化脂質、例えばＰＥＧ－ＤＡＧ、ＰＥＧ－ＰＥ、ＰＥＧ－Ｓ－ＤＡＧ、ＰＥＧ－ｃｅｒ又はＰＥＧジアルコキシプロピ

ルカルバメートを更に含む。

【０５６８】

一部の実施形態では、ＰＥＧ又は共役脂質は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０～２０％（ｍｏｌ）を占め得る。一部の実施形態では、ＰＥＧ又は共役脂質の含有率は、脂質ナノ粒子中に存在する総脂質の０．５～１０％又は２～５％（ｍｏｌ）である。イオン化性脂質、非カチオン脂質、ステロール、及びＰＥＧ／共役脂質のモル比は、必要に応じて変動し得る。例えば、脂質粒子は、組成物のモル又は総重量当たり３０～７０％のイオン化性脂質と、組成物のモル又は総重量当たり０～６０％のコレステロールと、組成物のモル又は総重量当たり０～３０％の非カチオン脂質と、組成物のモル又は総重量当たり１～１０％の共役脂質とを含み得る。好ましくは、組成物は、組成物のモル又は総重量当たり３０～４０％のイオン化性脂質と、組成物のモル又は総重量当たり４０～５０％のコレステロールと、組成物のモル又は総重量当たり１０～２０％の非カチオン脂質とを含む。一部の実施形態では、組成物は、組成物のモル又は総重量当たり５０～７５％のイオン化性脂質と、組成物のモル又は総重量当たり２０～４０％のコレステロールと、組成物のモル又は総重量当たり５～１０％の非カチオン脂質と、組成物のモル又は総重量当たり１～１０％の共役脂質である。組成物は、組成物のモル又は総重量当たり６０～７０％のイオン化性脂質と、組成物のモル又は総重量当たり２５～３５％のコレステロールと、組成物のモル又は総重量当たり５～１０％の非カチオン脂質とを含み得る。組成物はまた、組成物のモル又は総重量当たり最大９０％のイオン化性脂質と、組成物のモル又は総重量当たり２～１５％の非カチオン脂質とを含み得る。製剤は、例えば、組成物のモル若しくは総重量当たり８～３０％のイオン化性脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり５～３０％の非カチオン脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり０～２０％のコレステロールと；組成物のモル若しくは総重量当たり４～２５％のイオン化性脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり４～２５％の非カチオン脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり２～２５％のコレステロールと、組成物のモル若しくは総重量当たり１０～３５％の共役脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり５％のコレステロール；又は組成物のモル若しくは総重量当たり２～３０％のイオン化性脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり２～３０％の非カチオン脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり１～１５％のコレステロールと、組成物のモル若しくは総重量当たり２～３５％の共役脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり１～２０％のコレステロール；或いはまた組成物のモル若しくは総重量当たり最大９０％のイオン化性脂質と、組成物のモル若しくは総重量当たり２～１０％の非カチオン脂質と、又は組成物のモル若しくは総重量当たり１００％のカチオン脂質でもあり得る。一部の実施形態では、脂質粒子製剤は、５０：１０：３８．５：１．５のモル比で、イオン化性脂質、リン脂質、コレステロール及びＰＥＧ化脂質を含む。一部の他の実施形態では、脂質粒子製剤は、６０：３８．５：１．５のモル比で、イオン化性脂質、コレステロール及びＰＥＧ化脂質を含む。

【０５６９】

一部の実施形態では、脂質粒子は、イオン化性脂質、非カチオン脂質（例えば、リン脂質）、ステロール（例えば、コレステロール）及びＰＥＧ化脂質を含み、ここで、脂質のモル比は、イオン化性脂質の場合、２０～７０モル％の範囲で、目標は４０～６０であり、非カチオン脂質のモルパーセントは、０～３０の範囲で、目標は０～１５、ステロールのモルパーセントは、２０～７０の範囲で、目標は３０～５０、ＰＥＧ化脂質のモルパーセントは、１～６の範囲で、目標は２～５である。

【０５７０】

一部の実施形態では、脂質粒子は、５０：１０：３８．５：１．５のモル比で、イオン化性脂質／非カチオン脂質／ステロール／共役脂質を含む。

【０５７１】

一態様では、本開示は、リン脂質、レシチン、ホスファチジルコリン及びホスファチジルエタノールアミンを含む脂質ナノ粒子製剤を提供する。

【０５７２】

一部の実施形態では、１つ又は複数の別の化合物を含有させることができる。そうした化合物は個別に投与することもできるし、又は追加的化合物を本発明の脂質ナノ粒子に含有させることもできる。言い換えれば、脂質ナノ粒子は、核酸又は最初の核酸と異なる少なくとも１つの第２の核酸に加えて、他の化合物を含有することができる。限定はしないが、他の追加的化合物は、小若しくは大有機又は無機分子、単糖、二糖、三糖、オリゴ糖、多糖、ペプチド、タンパク質、ペプチド類似体及びその誘導体、ペプチド模倣物、核酸、核酸類似体及びその誘導体、生体材料から調製された抽出物、又はそれらの任意の組合せから選択することができる。

【０５７３】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子（又は脂質ナノ粒子を含む製剤）は、反応性不純物（例えば、アルデヒド又はケトン）を欠いているか、又は予め選択されたレベル未満の反応性不純物（例えば、アルデヒド又はケトン）を含む。特定の理論に束縛されることを意図しないが、一部の実施形態では、脂質試薬を使用して脂質ナノ粒子製剤を作製し、脂質試薬は、混入反応性不純物（例えば、アルデヒド又はケトン）を含み得る。脂質試薬は、予め選択されたレベル未満の反応性不純物（例えば、アルデヒド又はケトン）を有することに基づいて、製造のために選択され得る。特定の理論に束縛されることを意図しないが、一部の実施形態では、アルデヒドは、ＲＮＡの修飾及び損傷、例えば、塩基間の架橋及び／又は脂質のＲＮＡへの共有結合（例えば、脂質－ＲＮＡ付加物の形成）を引き起こし得る。これは、いくつかの事例では、逆転写酵素反応の失敗及び／又は不適切な塩基の組込み（例えば、損傷部位で）、例えば、新しく合成された標的ＤＮＡの変異につながる可能性がある。

【０５７４】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の総反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量を含む脂質試薬を使用して産生される。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の任意の単一反応性不純物（例えば、アルデヒド）種を含む脂質試薬を使用して産生される。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、（ｉ）５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の総反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量；及び（ｉｉ）５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の任意の単一反応性不純物（例えば、アルデヒド）種を含む、脂質試薬を使用して産生される。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、複数の脂質試薬を使用して産生され、複数の脂質試薬は各々独立して、この段落に記載された１つ又は複数の基準を満たす。一部の実施形態では、複数の各脂質試薬は、同じ基準、例えば、本段落の基準を満たす。

【０５７５】

一部の実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の総反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量を含む。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の任意の単一反応性不純物（例えば、アルデヒド）種を含む。一部の実施形態では、脂質ナノ粒子製剤は、（ｉ）５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の総反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量；及び（ｉｉ）５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の任意の単一反応性不純物（例えば、アルデヒド）種を含む。

【０５７６】

一部の実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子又はその製剤に使用される脂質試薬の１つ以上、又は任意選択で全ては、５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の総反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子又はその製剤に使用される脂質試薬の１つ以上、又は任意選択で全ては、５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の任意の単一反応性不純物（例えば、アルデヒド）種を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の脂質ナノ粒子又はその製剤に使用される脂質試薬の１つ以上、又は任意選択で全ては、（ｉ）５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の総反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量；及び（ｉｉ）５％、４％、３％、２％、１％、０．９％、０．８％、０．７％、０．６％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、又は０．１％未満の任意の単一反応性不純物（例えば、アルデヒド）種を含む。

【０５７７】

一部の実施形態では、総アルデヒド含有量及び／又は任意の単一反応性不純物（例えば、アルデヒド）種の量は、例えばタンデム質量分析（ＭＳ／ＭＳ）と組み合わせた、液体クロマトグラフィー（ＬＣ）により、例えばＰＣＴ／ＵＳ２１／２０９４８号明細書の実施例４０に記載の方法に従って決定される。一部の実施形態では、反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量及び／又は反応性不純物（例えば、アルデヒド）種の量は、例えば脂質試薬中の、反応性不純物（例えば、アルデヒド）の存在に関連した、核酸分子（例えば、ＲＮＡ分子、例えば、本明細書に記載されるもの）の１つ又は複数の化学修飾を検出することによって決定される。一部の実施形態では、反応性不純物（例えば、アルデヒド）含有量及び／又は反応性不純物（例えば、アルデヒド）種の量は、例えば、ＰＣＴ／ＵＳ２１／２０９４８号明細書の実施例４１に記載される方法に従い、例えば脂質試薬中の反応性不純物（例えば、アルデヒド）の存在に関連した、ヌクレオチド又はヌクレオシド（例えば、リボヌクレオチド又はリボヌクレオシド、例えば鋳型核酸に含まれるか、又は鋳型核酸から単離されたもの、例えば本明細書に記載されるもの）の１つ又は複数の化学修飾を検出することによって決定される。複数の実施形態では、核酸分子、ヌクレオチド、又はヌクレオシドの化学修飾は、例えば、ＰＣＴ／ＵＳ２１／２０９４８号明細書の実施例４１に記載される方法に従って、例えば、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析を用いて、１つ又は複数の修飾ヌクレオチド又はヌクレオシドの存在を決定することによって検出される。

【０５７８】

一部の実施形態では、本明細書に記載の核酸（例えば、ＲＮＡ）（例えば、鋳型核酸又は遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸）は、アルデヒド修飾を含まないか、又は予め選択された量未満のアルデヒド修飾を含む。一部の実施形態では、平均して、核酸は、１０００ヌクレオチドあたり５０、２０、１０、５、２、又は１未満のアルデヒド修飾を有し、例えば、２つのヌクレオチドの単一の架橋は単一のアルデヒド修飾である。一部の実施形態では、アルデヒド修飾はＲＮＡ付加（例えば、脂質ＲＮＡ付加）である。一部の実施形態では、アルデヒド修飾ヌクレオチドは、塩基間で架橋している。一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸（例えば、ＲＮＡ）は、ヌクレオチド間に５０、２０、１０、５、２、又は１未満の架橋を含む。

【０５７９】

一部の実施形態では、ターゲティングドメインの付加により、ＬＮＰを特定の組織に指向させる。例えば、生物学的リガンドをＬＮＰの表面に展示して、同種受容体を展示する細胞との相互作用を増強し、それにより上記受容体との結合並びに細胞が受容体を発現する組織へのカーゴ送達を駆動することができる。一部の実施形態では、生物学的リガンドは、肝臓への送達を駆動するリガンドであり得、例えば、ＧａｌＮＡｃを展示するＬＮＰは、アシアロ糖タンパク質受容体（ＡＳＧＰＲ）を展示する肝細胞に対する核酸カーゴの送達を達成する。Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ １８（７）：１３５７－

１３６４　２０１０）の論文は、観察可能なＬＮＰカーゴ効果（例えば、その中の図６を参照）についてＡＳＧＰＲに依存的なＬＮＰを取得するためのＰＥＧ－脂質に対する三価ＧａｌＮＡｃリガンド（ＧａｌＮＡｃ－ＰＥＧ－ＤＳＧ）の共役を教示している。例えば、葉酸塩、トランスフェリン、又は抗体を含む他のリガンド展示ＬＮＰ製剤は、国際公開第２０１７２２３１３５号パンフレット（参照により本明細書に組み込まれる）、更には、そこで使用される参照文献、すなわちＫｏｌｈａｔｋａｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ Ｔｅｃｈｎｏｌ．２０１１ ８：１９７－２０６；Ｍｕｓａｃｃｈｉｏ ａｎｄ Ｔｏｒｃｈｉｌｉｎ，Ｆｒｏｎｔ Ｂｉｏｓｃｉ．２０１１ １６：１３８８－１４１２；Ｙｕ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｍｅｍｂｒ Ｂｉｏｌ．２０１０ ２７：２８６－２９８；Ｐａｔｉｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｔｈｅｒ Ｄｒｕｇ Ｃａｒｒｉｅｒ Ｓｙｓｔ．２００８ ２５：１－６１；Ｂｅｎｏｉｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ．２０１１ １２：２７０８－２７１４；Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．２００８ ５：３０９－３１９；Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１０ １８：１３５７－１３６４；Ｓｒｉｎｉｖａｓａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１２ ８２０：１０５－１１６；Ｂｅｎ－Ａｒｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１２ ７５７：４９７－５０７；Ｐｅｅｒ ２０１０ Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ．２０：６３－６８；　Ｐｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２００７ １０４：４０９５－４１００；Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１１ ７２１：３３９－３５３；Ｓｕｂｒａｍａｎｙａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ．２０１０ １８：２０２８－２０３７；Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５ ２３：７０９－７１７；Ｐｅｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００８ ３１９：６２７－６３０；及びＰｅｅｒ ａｎｄ Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０１１ １８：１１２７－１１３３で論じられている。

【０５８０】

一部の実施形態では、イオン化性脂質、両性リン脂質、コレステロール及びポリ（エチレングリコール）（ＰＥＧ）脂質などの伝統的成分を含む製剤に対するＳｅｌｅｃｔｉｖｅ ＯＲｇａｎ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ（ＳＯＲＴ）分子の添加により、組織特異的活性についてＬＮＰを選択する。Ｃｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌ １５（４）：３１３－３２０（２０２０）の教示は、補足的「ＳＯＲＴ」成分の添加により、インビボＲＮＡ送達プロファイルを厳密に改変し、ＳＯＲＴ分子のパーセンテージ及び生物物理学的特性に応じて組織特異的（例えば、肺、肝臓、脾臓）遺伝子送達を媒介することを実証している。

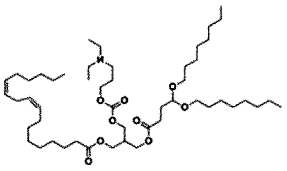
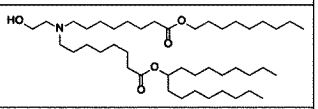
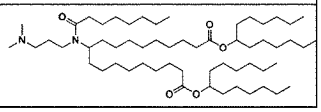
【０５８１】

一部の実施形態では、ＬＮＰは、生分解性、イオン化性脂質を含む。一部の実施形態では、ＬＮＰは、オクタデカ－９，１２－ジエン酸（９Ｚ，ｌ２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルを含み、これは、（９Ｚ，ｌ２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエン酸）３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルとも呼ばれる。例えば、国際公開第２０１９／０６７９９２号パンフレット、国際公開第２０１７／１７３０５４号パンフレット、国際公開第２０１５／０９５３４０号パンフレット及び国際公開第２０１４／１３６０８６号パンフレット並びにそこに記載される参照文献に記載の脂質を参照されたい。一部の実施形態では、ＬＮＰ脂質に関して、カチオン（性）及びイオン化性という用語は互換可能であり、例えば、イオン化性脂質は、ｐＨによってはカチオン性である。

【０５８２】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるＬＮＰは、表１９に記載される脂質を含む。

【０５８３】
【表１９】
表 19 例示的な脂質

脂質ID	化学名	分子量	構造
LIPIDV003	(9Z,12Z)-3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-((((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノエート	852.29	
LIPIDV004	ヘプタデカン-9-イル8-((2-ヒドロキシエチル)(8-(ノニルオキシ)-8-オキソオクチル)アミノ)オクタノエート	710.18	
LIPIDV005		919.56	

【０５８４】
一部の実施形態では、遺伝子組換えシステムの複数の構成要素を単一のＬＮＰ製剤として調製し得、例えば、ＬＮＰ製剤は、遺伝子組換えポリペプチドコードするｍＲＮＡ及びＲＮＡ鋳型を含む。核酸成分の比は、治療薬の特性を最大にするために変動させ得る。一部の実施形態では、ＲＮＡ鋳型と、遺伝子組換えポリペプチドコードするｍＲＮＡの比は、モル比で約１：１～１００：１、例えば、約１：１～２０：１、約２０：１～４０：１、約４０：１～６０：１、約６０：１～８０：１、又は約８０：１～１００：１である。他の実施形態では、複数の核酸のシステムは、個別の製剤、例えば、鋳型ＲＮＡを含む１つのＬＮＰ製剤と、遺伝子組換えポリペプチドコードするｍＲＮＡを含む第２のＬＮＰ製剤により調製され得る。一部の実施形態では、システムは、ＬＮＰに製剤化された３つ以上の核酸成分を含み得る。一部の実施形態では、システムは、少なくとも１つのＬＮＰに製剤化された、タンパク質、例えば、遺伝子組換えシステム、及び鋳型ＲＮＡを含み得る。

【０５８５】
一部の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ径は、例えば、動的光散乱法（ＤＬＳ）により測定して、数１０ｎｍ～数１００ｎｍであり得る。一部の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ径は、約４０ｎｍ～約１５０ｎｍ、例えば、約４０ｎｍ、４５ｎｍ、５０ｎｍ、５５ｎｍ、６０ｎｍ、６５ｎｍ、７０ｎｍ、７５ｎｍ、８０ｎｍ、８５ｎｍ、９０ｎｍ、９５ｎｍ、１００ｎｍ、１０５ｎｍ、１１０ｎｍ、１１５ｎｍ、１２０ｎｍ、１２５ｎｍ、１３０ｎｍ、１３５ｎｍ、１４０ｎｍ、１４５ｎｍ又は１５０ｎｍであり得る。一部の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ径は、約５０ｎｍ～約１００ｎｍ、約５０ｎｍ～約９０ｎｍ、約５０ｎｍ～約８０ｎｍ、約５０ｎｍ～約７０ｎｍ、約５０ｎｍ～約６０ｎｍ、約６０ｎｍ～約１００ｎｍ、約６０ｎｍ～約９０ｎｍ、約６０ｎｍ～約８０ｎｍ、約６０ｎｍ～約７０ｎｍ、約７０ｎｍ～約１００ｎｍ、約７０ｎｍ～約９０ｎｍ、約７０ｎｍ～約８０ｎｍ、約８０ｎｍ～約１００ｎｍ、約８０ｎｍ～約９０ｎｍ又は約９０ｎｍ～約１００ｎｍであり得る。一部の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ径は、約７０ｎｍ～約１００ｎｍであり得る。一部の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ径は、約８０ｎｍであり得る。一部の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ径は、約１００ｎｍであり得る。一部の実施形態では、ＬＮＰ製剤の平均ＬＮＰ径は、約１ｍｍ～約５００ｍｍ、約５ｍｍ～約２００ｍｍ、約１０ｍｍ～約１００ｍｍ、約２０ｍｍ～約８０ｍｍ、約２５ｍｍ～約６０ｍｍ、約３０ｍｍ～約５５ｍｍ、約３５ｍｍ～約５０ｍｍ、又は約３８ｍｍ～約４２ｍｍの範囲である。

【０５８６】
ＬＮＰは、いくつかの事例では、比較的均質であり得る。多分散指数を用いて、ＬＮＰ

の均質性、例えば、脂質ナノ粒子の粒度分布を示すことができる。低い（例えば、０．３未満の）多分散指数は、概して、狭い粒度分布を示す。ＬＮＰは、約０～約０．２５、例えば、０．０１、０．０２、０．０３、０．０４、０．０５、０．０６、０．０７、０．０８、０．０９、０．１０、０．１１、０．１２、０．１３、０．１４、０．１５、０．１６、０．１７、０．１８、０．１９、０．２０、０．２１、０．２２、０．２３、０．２４、又は０．２５の多分散指数を有し得る。一部の実施形態では、ＬＮＰの多分散指数は、約０．１０～約０．２０であり得る。

【０５８７】

ＬＮＰのゼータ電位を用いて、組成物の界面動電位を示すことができる。一部の実施形態では、ゼータ電位は、ＬＮＰの表面電荷を表し得る。高度に荷電された種は、身体内の細胞、組織、及び他の要素と不必要に相互作用する可能性があるため、正又は負の比較的低い電荷を持つ脂質ナノ粒子が一般的に望ましい。一部の実施形態では、ＬＮＰのゼータ電位は、約－１０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－１０ｍＶ～約０ｍＶ、約－１０ｍＶ～約－５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約－５ｍＶ～約＋５ｍＶ、約－５ｍＶ～約０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋２０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１５ｍＶ、約０ｍＶ～約＋１０ｍＶ、約０ｍＶ～約＋５ｍＶ、約＋５ｍＶ～約２０ｍＶ、約＋５ｍＶ～約１５ｍＶ又は約＋５ｍＶ～約１０ｍＶであり得る。

【０５８８】

タンパク質及び／又は核酸、例えば、遺伝子組換えポリペプチド若しくはポリペプチドをコードするｍＲＮＡの封入の効率は、提供される初期量と比較して、封入されるか若しくは調製後にＬＮＰと結合されるタンパク質及び／又は核酸の量を表す。封入効率は、高い（例えば、１００％近く）のが望ましい。封入効率は、例えば、１若しくは複数種の溶媒又はデタージェントで脂質ナノ粒子を分解する前と後で、脂質ナノ粒子を含有する溶液中のタンパク質又は核酸の量を比較することにより、測定することができる。アニオン交換樹脂を用いて、溶液中の遊離タンパク質又は核酸（例えば、ＲＮＡ）の量を測定することができる。蛍光を用いて、溶液中の遊離タンパク質又は核酸（例えば、ＲＮＡ）の量を測定することができる。本明細書に記載の脂質ナノ粒子の場合、タンパク質及び／又は核酸の封入効率は、少なくとも５０％、例えば、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％若しくは１００％であり得る。一部の実施形態では、封入効率は、少なくとも８０％であり得る。一部の実施形態では、封入効率は、少なくとも９０％であり得る。一部の実施形態では、封入効率は、少なくとも９５％であり得る。

【０５８９】

ＬＮＰは、任意選択で、１つ又は複数のコーティングを含み得る。一部の実施形態では、ＬＮＰは、コーティングを有するカプセル、フィルム又は錠剤に製剤化され得る。本明細書に記載の組成物を含むカプセル、フィルム又は錠剤は、任意の有用なサイズ、引張強度、硬度若しくは密度を有し得る。

【０５９０】

ＬＮＰの更に別の例示的な脂質、製剤、方法、及び特性決定は、国際公開第２０２００６１４５７号パンフレットに教示されており、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０５９１】

一部の実施形態では、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭａｘ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）又はＴｒａｎｓＩＴ－ｍＲＮＡ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｍｉｒｕｓ Ｂｉｏ）を用いて、インビトロ又はエクスビボ細胞リポフェクションを実施する。特定の実施形態では、ＧｅｎＶｏｙ＿ＩＬＭ ｉｏｎｉｚａｂｌｅ ｌｉｐｉｄ ｍｉｘ（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ ＮａｎｏＳｙｓｔｅｍｓ）を用いて、ＬＮＰを製剤化する。特定の実施形態では、ＬＮＰは、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）又はジリノレ

イルメチル－４－ジメチルアミノ酪酸塩（ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ若しくはＭＣ３）を用いて、ＬＮＰを製剤化するが、その製剤及びインビボでの使用については、Ｊａｙａｒａｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．Ａｎｇｅｗ　Ｃｈｅｍ　Ｉｎｔ　Ｅｄ　Ｅｎｇｌ　５１（３４）：８５２９－８５３３（２０１２）に教示されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０５９２】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステム、例えば、Ｃａｓ９－ｇＲＮＡ　ＲＮＰ、ｇＲＮＡ、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡの送達のために最適化されたＬＮＰ製剤は、国際公開第２０１９０６７９９２号パンフレット及び国際公開第２０１９０６７９１０号パンフレットに記載されており、そのいずれも参照により本明細書に組み込まれる。

【０５９３】

核酸の送達に有用な別の具体的なＬＮＰ製剤は、米国特許第８１５８６０１号明細書及び米国特許第８１６８７７５号明細書（そのいずれも参照により本明細書に組み込まれる）に記載されており、これは、ＯＮＰＡＴＴＲＯの名称で販売されているパチシランに使用される製剤を含む。

【０５９４】

遺伝子組換えＬＮＰの例示的な用量としては、約０．１、０．２５、０．３、０．５、１、２、３、４、５、６、８、１０、又は１００　ｍｇ／ｋｇ（ＲＮＡ）を挙げることができる。システムの１つ若しくは複数の成分をコードする核酸を含むＡＡＶの例示的な用量としては、約10^{11}、10^{12}、10^{13}、及び10^{14}ｖｇ／ｋｇのＭＯＩを挙げることができる。

【０５９５】

キット、製品、及び医薬組成物

一態様では、本開示は、例えば、本明細書に記載される、遺伝子組換えポリペプチド又は遺伝子組換えシステムを含むキットを提供する。一部の実施形態では、キットは、遺伝子組換えポリペプチド（又はポリペプチドをコードする核酸）及び鋳型ＲＮＡ（又は鋳型ＲＮＡをコードするＤＮＡ）を含む。一部の実施形態では、キットは、細胞にシステムを導入するための試薬、例えば、トランスフェクション試薬、ＬＮＰなどを更に含む。一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載される方法のいずれかに好適である。一部の実施形態では、キットは、例えば、製品内に配置されるような、１つ若しくは複数のエレメント、組成物（例えば、医薬組成物）、遺伝子組換えポリペプチド、及び／又は遺伝子組換えシステム又はその機能的フラグメント若しくは成分を含む。一部の実施形態では、キットは、その使用説明書を含む。

【０５９６】

一態様では、本開示は、製品、例えば、その中に本明細書に記載されるキット、又はその要素が配置される製品を提供する。

【０５９７】

一態様では、本開示は、例えば、本明細書に記載される、遺伝子組換えポリペプチド又は遺伝子組換えシステムを含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される担体又は賦形剤を更に含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、鋳型ＲＮＡ及び／又はポリペプチドをコードするＲＮＡを含む。複数の実施形態では、医薬組成物は、以下の特徴の１つ又は複数（例えば、１、２、３若しくは４つ）を有する：

（ａ）例えば、モル基準で、鋳型ＲＮＡ及び／又はポリペプチドをコードするＲＮＡに対して、１％未満（例えば、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％若しくは０．１％未満）のＤＮＡ鋳型；

（ｂ）例えば、モル基準で、鋳型ＲＮＡ及び／又はポリペプチドをコードするＲＮＡに対して、１％未満（例えば、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％若しくは０．１％未満）の非キャップＲＮＡ；

（ｃ）例えば、モル基準で、鋳型ＲＮＡ及び／又はポリペプチドをコードするＲＮＡに

対して、１％未満（例えば、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％若しくは０．１％未満）の部分長ＲＮＡ；
（ｄ）未反応キャップジヌクレオチドを実質的に含まない。
【０５９８】
化学、製造、及び制御（ＣＭＣ）
タンパク質治療薬の精製は、例えば、Ｆｒａｎｋｓ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ，Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ｓｔａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２０１３）；及びＣｕｔｌｅｒ，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ），Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ（２０１０）に記載されている。
【０５９９】
一部の実施形態では、遺伝子組換えシステム、ポリペプチド、及び／又は鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、特定の品質基準を満たす。一部の実施形態では、本明細書に記載される方法により生産された遺伝子組換えシステム、ポリペプチド、及び／又は鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）は、特定の品質基準を満たす。従って、本開示は、いくつかの態様では、例えば、前記品質基準が検定される、特定の品質基準を満たす遺伝子組換えシステム、ポリペプチド、及び／又は鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）を製造する方法に関する。本開示は、いくつかの態様では、遺伝子組換えシステム、ポリペプチド、及び／又は鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）で前記品質基準を検定する方法にも関する。一部の実施形態では、品質基準として、限定はしないが、以下の１つ又は複数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２）が挙げられる：
（ｉ）鋳型ＲＮＡの長さ、例えば、鋳型ＲＮＡが、標準長さを超えるか、又は標準長さ範囲内の長さを有するか否か、例えば、存在する鋳型ＲＮＡの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、１００、１２５、１５０、１７５若しくは２００ヌクレオチド長を超えるか否か；
（ｉｉ）鋳型ＲＮＡ上のポリＡテールの存在、非存在、及び／又は長さ、例えば、存在する鋳型ＲＮＡの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、ポリＡテール（例えば、少なくとも５、１０、２０、３０、５０、７０、１００ヌクレオチド長のポリＡテール）を含むか否か；
（ｉｉｉ）鋳型ＲＮＡ上の５’キャップの存在、非存在、及び／又は種類、例えば、存在する鋳型ＲＮＡの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、５’キャップを含むか否か、例えば、上記キャップが、７－メチルグアノシンキャップ、例えば、Ｏ－Ｍｅ－ｍ７Ｇキャップであるか否か；
（ｉｖ）鋳型ＲＮＡ中の１つ若しくは複数の修飾ヌクレオチド（例えば、プソイドウリジン、ジヒドロウリジン、イノシン、７－メチルグアノシン、１－Ｎ－メチルプソイドウリジン（１－Ｍｅ－Ψ）、５－メトキシウリジン（５－ＭＯ－Ｕ）、５－メチルシチジン（５ｍＣ）、又はロックドヌクレオチドから選択される）の存在、非存在、及び／又は種類、例えば、存在する鋳型ＲＮＡの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、１つ又は複数の修飾ヌクレオチドを含むか否か；
（ｖ）鋳型ＲＮＡの安定性（例えば、時間経過による及び／若しくは予め選択した条件下で）、例えば、鋳型ＲＮＡの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、安定性試験の後、インタクトなままである（例えば、１００、１２５、１５０、１７５、又は２００ヌクレオチド長を超える）か否か；
（ｖｉ）ＤＮＡを修飾するためのシステム中の鋳型ＲＮＡの効力、例えば、鋳型ＲＮＡを含むシステムを効力について検定した後に、標的部位の少なくとも１％が修飾されているか否か；
（ｖｉｉ）ポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドの長さ、例えば、ポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドが、標準長さを超えるか、又は標準長さ範囲内の長さを有するか否か、例えば、存在するポリペプチド、第１の

ポリペプチド、又は第２のポリペプチドの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１０５０、１１００、１１５０、１２００、１２５０、１３００、１３５０、１４００、１４５０、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００若しくは２０００アミノ酸長を超える（且つ任意選択で、２５００、２０００、１５００、１４００、１３００、１２００、１１００、１０００、９００、８００、７００若しくは６００アミノ酸長以下である）か否か；

（ｖｉｉｉ）ポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドに対する翻訳後修飾の存在、非存在、及び／又は種類、例えば、ポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドの少なくとも８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８若しくは９９％が、リン酸化、メチル化、アセチル化、ミリストイル化、パルミトイル化、イソプレニル化、グリピヤチヨン若しくはリポイル化又はそれらの任意の組合せを含むか否か；

（ｉｘ）ポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチド中の１つ若しくは複数の人工、合成、又は非標準アミノ酸（例えば、オルニチン、β－アラニン、ＧＡＢＡ、δ－アミノレブリン酸、ＰＡＢＡ、Ｄ－アミノ酸（例えば、Ｄ－アラニン若しくはＤ－グルタミン酸）、アミノイソ酪酸、デヒドロアラニン、シスタチオニン、ランチオニン、ジェンコル酸、ジアミノピメリン酸、ホモアラニン、ノルバリン、ノルロイシン、ホモノルロイシン、ホモセリン、Ｏ－メチル－ホモセリン及びＯ－エチル－ホモセリン、エチオニン、セレノシステイン、セレノホモシステイン、セレノメチオニン、セレノエチオニン、テルロシステイン若しくはテルロメチオニンから選択される）の存在、非存在、及び／又は種類、例えば、存在するポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、１つ又は複数の人工、合成、又は非標準アミノ酸を含むか否か；

（ｘ）ポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドの安定性（例えば、時間経過による及び／若しくは予め選択した条件下で）、例えば、ｗｈｅｔｈｅｒポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドの少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％が、安定性試験の後に、インタクトなままである（例えば、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、１０００、１０５０、１１００、１１５０、１２００、１２５０、１３００、１３５０、１４００、１４５０、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００若しくは２０００アミノ酸長を超える（且つ任意選択で、２５００、２０００、１５００、１４００、１３００、１２００、１１００、１０００、９００、８００、７００若しくは６００アミノ酸長以下である））か否か；

（ｘｉ）ＤＮＡを修飾するためのシステム中のポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドの効力、例えば、ポリペプチド、第１のポリペプチド、又は第２のポリペプチドを含むシステムを効力について検定した後に、標的部位の少なくとも１％が修飾されているか否か；又は

（ｘｉｉ）パイロジェン、ウイルス、真菌、細菌性病原体、又は宿主細胞タンパク質の１つ又は複数の存在、非存在、及び／若しくはレベル、例えば、システムが、パイロジェン、ウイルス、真菌、細菌性病原体、又は宿主細胞タンパク質混入を含まないか若しくは実質的に含まないか否か。

【０６００】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるシステム又は医薬組成物は、エンドトキシンを含まない。

【０６０１】

一部の実施形態では、パイロジェン、ウイルス、真菌、細菌性病原体、及び／又は宿主細胞タンパク質の１つ又は複数の存在、非存在、及び／若しくはレベルが決定される。複数の実施形態では、システムが、パイロジェン、ウイルス、真菌、細菌性病原体、及び／又は宿主細胞タンパク質混入を含まないか若しくは実質的に含まないか否かが決定される

。
【０６０２】
一部の実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物又はシステムは、以下の特徴１つ又は複数（例えば、１、２、３若しくは４つ）を有する：
（ａ）例えば、モル基準で、鋳型ＲＮＡ及び／又はポリペプチドをコードするＲＮＡに対して、１％未満（例えば、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％若しくは０．１％未満）のＤＮＡ鋳型；
（ｂ）例えば、モル基準で、鋳型ＲＮＡ及び／又はポリペプチドをコードするＲＮＡに対して、１％未満（例えば、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％若しくは０．１％未満）の非キャップＲＮＡ；
（ｃ）例えば、モル基準で、鋳型ＲＮＡ及び／又はポリペプチドをコードするＲＮＡに対して、１％未満（例えば、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％若しくは０．１％未満）の部分長ＲＮＡ；
（ｄ）未反応キャップジヌクレオチドを実質的に含まない。
【実施例】
【０６０３】
本発明を以下の実施例により更に説明する。これらの実施例は、説明の目的で提供されるものであるに過ぎず、本発明の範囲又は内容を限定するものとして決して解釈すべきではない。
【０６０４】
実施例１：ヒト細胞での正確な編集を可能にするための、様々なＰｏｌドメインとのＣａｓ－Ｐｏｌ融合を含む遺伝子組換えシステム
この実施例は、Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合が、ヒト細胞内のゲノムＤＮＡに突然変異をプログラム可能にインストールする能力を説明する。より具体的には、Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合のポリメラーゼドメイン、例えば、本出願に記載されるポリメラーゼドメイン、例えば、ヒトＤＮＡ　Ｐｏｌθを変化させて、新規なポリメラーゼ組合せを使用するＣａｓ－Ｐｏｌ融合のゲノム編集能力を決定する。鋳型核酸は、Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合の標的編集活性を決定するために、ヒト細胞内のＣａｓ－Ｐｏｌ発現プラスミドと共に同時送達される。
【０６０５】
ゲノム改変ポリペプチドのドメインライブラリーを生成するために、Ｃａｓエフェクタータンパク質が選択される；表３及び表４を参照されたい。本明細書に記載されるゲノム改変ポリペプチドで使用するために、更なるＣａｓ９ドメインを更に選択し、標的配列のＰＡＭ要件、ニッカーゼ活性を付与するための予測突然変異（例えば、ＳｐＣａｓ９についてＤ１０Ａ、Ｈ８４０Ａ又はＮ８６３Ａ）、及び単一ガイド組成物を含むｇＲＮＡ特徴、例えば、コグネイトＣａｓ酵素に対するポリペプチド結合を付与するための特定のスペーサーパラメータ及びｇＲＮＡスカフォールド配列を含む特徴を決定することができる（表８）。融合タンパク質を最適化するために、長さ、柔軟性、及び組成の多様性の検索に基づいて、Ｃａｓ及びＰｏｌドメインを接続するためのリンカー配列を収集する（表６）。ポリメラーゼドメインは、本出願に記載されるように、文献及びポリメラーゼタンパク質ドメインシグネチャーを使用して、多様な供給源から利用する。これは、ＲＮＡ及び／又はＤＮＡ依存性ＤＮＡ重合活性の能力を有する野生型ポリメラーゼ、改善された特性（例えば、熱安定性、処理能力、忠実度）を有する誘導されたポリメラーゼ、不活性化又は再活性化機能ドメインを有する誘導されたポリメラーゼ（例えば、５’－３’若しくは３’－５’エキソヌクレアーゼ活性、プルーフリーディング活性、ヘリカーゼ活性若しくはＲＮａｓｅ活性を付与する不活性化又は再活性化ドメイン）並びに合成的に進化したＲＮＡ依存性及び／又はＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性を有するポリメラーゼ（例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれるＥｌｌｅｆｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　３５２（６２９３）：１５９０－１５９３（２０１６）に記載される、サーモコッカス・コダカレンシス（Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ　ｋｏｄａｋａｒｅｎｓｉｓ）（ＫＯＤ）のＰｏｌＢに由来するＲＴＸポリメラーゼ）を含む。

【０６０６】
具体的には、遺伝子組換えポリペプチドとの関連で新規なＰｏｌドメインを使用して、ゲノムの編集に成功することを評価するために、Ｃａｓ９（Ｎ８６３Ａ）ニッカーゼへの融合について例示的なＰｏｌドメインのサブセットを選択する。簡潔に述べると、単量体ヒトポリメラーゼのタンパク質配列が、ＵｎｉＰｒｏｔ（Ｔｈｅ ＵｎｉＰｒｏｔ Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４９（Ｄ１）：Ｄ４８０－Ｄ４８９（２０２１））を用いて決定され、機能ドメインが、ＩｎｔｅｒＰｒｏ（Ｂｌｕｍｅｔ ａｌ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ４９（Ｄ１）：Ｄ３４４－Ｄ３５４（２０２１））及びＩｎｔｅｒＰｒｏＳｃａｎ（Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ３０（９）：１２３６－１２４０（２０１４））（その中の表Ｘ）を用いて更に予測され、注釈を付けられる。そのような例に限定されることは意図しないが、単一のサブユニットを含む、ポリメラーゼファミリーＹ、Ｘ、及びＡからのタンパク質が記載されている（例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ｈｏｉｔｓｍａ ｅｔ ａｌ Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ ７７（１）：３５－５９（２０２０）を参照）。
【０６０７】
ゲノム改変システムＣａｓ－Ｐｏｌ融合を使用して正確な編集を生成するために、鋳型核酸を構築して、Ｐｏｌドメインによるゲノム標的部位への編集の重合を鋳型化する。鋳型核酸は、（ｉ）Ｃａｓ－Ｐｏｌを標的領域にガイドするためのｇＲＮＡスペーサー配列、例えば、ＨＥＫ３遺伝子座の２０ヌクレオチド配列に相補的な配列；（ｉｉ）標的プライミング重合のためのニックＤＮＡの一本鎖と相補的な塩基対形成が可能なプライマー結合配列（ＰＢＳ）；（ｉｉｉ）意図された最終標的配列を更に含む重合のための鋳型を提供する異種目的配列；及び（ｉｖ）Ｃａｓ９－ＰｏｌポリペプチドＣａｓ９ドメインに関連するｇＲＮＡスカフォールド配列を含むように設計される。ここで採用された構築物は、具体的には５’から３’の配向（ｉ）、（ｉｖ）、（ｉｉｉ）、（ｉｉ）に従う。一部の実施形態では、（ｉｉｉ）は、ＲＮＡ及び／又はＤＮＡヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、（ｉｉ）は、ＲＮＡ及び／又はＤＮＡヌクレオチドを含み得る。例に限定されることは意図しないが、（ｉ）及び（ｉｖ）は、これらの実験においてＲＮＡヌクレオチドを含む。鋳型組成物が、表２１（鋳型Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３）に記載され、ここで、（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）はそれぞれ、ＲＮＡ又はＤＮＡヌクレオチドのいずれかとして含まれ得る。鋳型分子は、任意選択で、５’キャップ及び３’ポリＡテールを更に含む。
【０６０８】

【表２０】

表20: 実施例1において使用される鋳型核酸及び第2ニックgRNA

名称	記述	スペーサー (i)	配列番号	スカフォールド (iv)	配列番号	Pol鋳型 (iii)	配列番号	PBS (ii)	配列番号	完全な鋳型分子	配列番号
鋳型P1	HEK3_8PBS_10RT(CTTat1)	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	4623	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4595	TCTGCCATCAAAG	4627	CGTGCTCA		GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCA	4632
鋳型P2	HEK3_13PBS_10RT(CTTat1)	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	4623	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4595	TCTGCCATCAAAG	4627	CGTGCTCAGTCTG	4629	GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTG	4633
鋳型P3	HEK3_17PBS_10RT(CTTat1)	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	4623	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4595	TCTGCCATCAAAG	4627	CGTGCTCAGTCTGGGCC	4630	GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTGGGCC	4634
鋳型P4	HBB_13PBS_10RT(1toAat4)	GCATGGTGCACCTGACTCCTG	4624	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4595	AGACTTCTCCACAG	4628	GAGTCAGGTGCAC	4631	GCATGGTGCACCTGACTCCTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCAGACTTCTCCACAGGAGTCAGGTGCAC	4635
2gRNA P5	HEK3_+90	GTCAACCAGTATCCCGGTGC	4625	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4595	NA		NA		NA	
2gRNA P6	HBB_+72	GCCTTGATACCAACCTGCCCA	4626	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC	4595	NA		NA		NA	

【０６０９】

Ｕ２ＯＳ又はＨＥＫ２９３Ｔ細胞は、約８００ｎｇのＣａｓ９－Ｐｏｌ融合（例えば、ｐｏｌθ融合）発現プラスミド、２００ｎｇの化学的に合成された鋳型核酸分子、及び任意選択で８３ｎｇの更なる第２のニックｇＲＮＡ（鋳型Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３について２ｇＲＮＡ　Ｐ５又は鋳型Ｐ４について２ｇＲＮＡ　Ｐ６）（表２１）で、２５０，０００個の細胞／ウェルのエレクトロポレーションによってトランスフェクトされる。Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合のゲノム編集能力を評価するために、トランスフェクション後３日目にゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）を収集する。標的遺伝子座（鋳型Ｐ１、Ｐ２、Ｐ３についてＨＥＫ３又は鋳型Ｐ４についてＨＢＢ）での意図した編集（設計どおりの正確で傷のない編集）と意図しない編集（標的配列への意図しない変更）の頻度を、アンプリコン配列決定によって分析する。本明細書で使用される場合、標的部位のアンプリコン配列決定は、標的部位のＰＣＲ増幅における部位特異的プライマーの使用、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑでのアンプリコンの配列決定並びにＣＲＩＳＰＲｅｓｓｏ２パイプラインを使用した編集事象の検出及び特性決定を含む（Ｃｌｅｍｅｎｔ　ｅｔ　ａｌ　Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　３７（３）：２２４－２２６（２０１９））。一部の実施形態では、活性なＣａｓ－Ｐｏｌ融合は、検出可能なレベルの編集をもたらし、例えば、少なくとも０．１％のシーケンシングリードが、標的部位編集を実証する。一部の実施形態では、望ましいＣａｓ－Ｐｏｌ融合は、意図しない編集に対してより高い意図した編集の頻度、例えば、意図しない編集に対して少なくとも２倍高い意図した編集の頻度を実証する。

【０６１０】

実施例２：リンカーの選択によるＣａｓ－Ｐｏｌ融合の発現の改善

この実施例は、哺乳動物細胞におけるタンパク質発現を改善するためのＣａｓ－Ｐｏｌ

融合の最適化を示す。上記の実施例１に記載されるように、新しい機能ドメインの置換による新規なＣａｓ－Ｐｏｌ融合の構築は、ゲノム改変ポリペプチドの低又は中程度の発現を生じ得る。従って、融合の改変された構成が、異なるドメインの状況において有利である可能性があると考えられる。例に限定されることは意図しないが、新しい融合の発現及び安定性を改善するためのそのようなアプローチの１つは、リンカーライブラリーの使用によるものである。ここでは、Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合のＣａｓドメインとＰｏｌドメインの間のペプチドリンカー配列は、リンカー配列のライブラリーを使用して変更される。より具体的には、以下の表２１からのリンカーを使用して、Ｃａｓ９融合構築物の新しい変異体を生成し、ヒト細胞に送達して、改善されたＣａｓ－Ｐｏｌタンパク質発現についてスクリーニングする。

【０６１１】

長さ、柔軟性、疎水性、及び二次構造の程度が異なる２２個のペプチドリンカーのセット（表２１）を最初に使用して、元のリンカーの置換によりＣａｓ－Ｐｏｌ融合タンパク質の変異体を生成する（上記に言及される実施例３０を参照）。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞は、２００ｎｇのシングルガイドＲＮＡプラスミドと共に、約８００ｎｇの各Ｃａｓ９－Ｐｏｌ融合プラスミドで、２５０，０００個の細胞／ウェルのエレクトロポレーションによってトランスフェクトされる。Ｃａｓ９－Ｐｏｌ融合の発現レベルを評価するために、トランスフェクション後２日目に細胞溶解物を収集し、Ｃａｓ９に対する一次抗体を使用してウェスタンブロットによって分析する。

【０６１２】

【表２１】

表21. Cas-Pol融合を含むゲノム改変ポリペプチドにおけるCas及びPolドメインの間のリンカーとしての使用のためのペプチド配列

#	リンカー配列	SEQ ID NO:	注記
1	GGS		短い
2	GGGGS	4027	柔軟、短い
3	(GGGGS)2	4108	柔軟
4	(GGGGS)3	4109	柔軟、長い
5	(GGGGS)4	4110	柔軟、非常に長い
6	(G)6	4116	柔軟
7	(G)8	4118	柔軟
8	GSAGSAAGSGEF	4221	柔軟
9	(GSSGSS)	4120	中
10	(GSSGSS)2	4122	中、柔軟
11	(GSSGSS)3	4124	中
12	SGSETPGTSESATPES	4220	XTEN
13	(EAAAK)	4028	剛直ヘリックス、短い
14	(EAAAK)2	4126	剛直ヘリックス、中
15	(EAAAK)3	4127	剛直ヘリックス、長い
16	PAP		剛直、短い
17	PAPAP	4132	剛直、短い
18	PAPAPAPAP	4134	剛直、中
19	A(EAAAK)4ALEA(EAAAK)4A	4217	剛直、らせんを有し非常に長い
20	GGGGS(EAAAK)GGGGS	4218	柔軟-ヘリックス-柔軟
21	(EAAAK)GGGGS(EAAAK)	4219	ヘリックス-柔軟-ヘリックス
22	SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	柔軟-XTEN-柔軟

【０６１３】

実施例３：ＨＥＫ２９３Ｔ及びＵ２ＯＳ細胞におけるプールスクリーニングによる遺伝子組換えポリペプチド選択

この実施例は、ヒトゲノムにおけるコード配列の標的化編集のためのＲＮＡ遺伝子組換えシステムの使用を説明する。より具体的には、この実施例は、例えば、プールスクリーニング手法により、ヒト細胞内の活性を編集するための新規な遺伝子組換えポリペプチドを評価する手段としての、遺伝子組換え候補のライブラリーによるＨＥＫ２９３Ｔ及びＵ２ＯＳ細胞の感染、続いて、細胞内のインビトロ遺伝子組換えのための鋳型ガイドＲＮＡ（ｔｇＲＮＡ）のトランスフェクションを説明する。

【０６１４】

本明細書においてアッセイされる遺伝子組換えポリペプチドライブラリー候補は、それぞれ以下を含む：１）１つのエンドヌクレアーゼ活性部位を不活性化するＮ８６３Ａ突然変異を含有する化膿性レンサ球菌（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ）（Ｓｐｙ）Ｃａｓ９ニッカーゼ；２）表６に示される１２２のペプチドリンカーの１つ；及び３）レトロウイルス由来の表２からの逆転写酵素（ＲＴ）ドメイン。用いられる特定のレトロウイルスＲＴドメイ

ンは、それらがモノマーとして機能することが予想される場合に選択された。各選択されたＲＴドメインについて、野生型配列及び一次野生型配列に導入された点突然変異を有する形態が試験された。特に、野生型であるか又は様々な突然変異を含む１４３のＲＴドメインが試験された。合計で、１７，４４６のＣａｓ－リンカー－ＲＴ遺伝子組換えポリペプチドが試験された。

【０６１５】

本明細書に記載されるシステムは、１）レンチウイルスカセット内のヒトコドン最適化遺伝子組換えポリペプチドライブラリー候補をコードする発現プラスミド、及び２）Ｃａｓによって認識され、それを目的のゲノム遺伝子座に局在化し、またＵ６プロモータによって駆動されるＲＴドメインによって所望の編集の逆転写をゲノムに鋳型化するノンコーディングｔｇＲＮＡ配列を発現するｔｇＲＮＡ発現プラスミドを含む２成分システムである。レンチウイルスカセットは、（ｉ）哺乳動物細胞内の発現のためのＣＭＶプロモータ；（ｉｉ）示されるような遺伝子組換えポリペプチドライブラリー候補；（ｉｉｉ）自己切断Ｔ２Ａポリペプチド；（ｉｖ）哺乳動物細胞における選択を可能にするピューロマイシン耐性遺伝子；及び（ｖ）ポリＡテール終結シグナルを含む。

【０６１６】

遺伝子組換えポリペプチドライブラリー候補を発現する細胞のプールを調製するために、ＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞に、遺伝子組換え候補プラスミドライブラリーのプールされたレンチウイルス調製物を形質導入した。ＨＥＫ２９３　Ｌｅｎｔｉ－Ｘ細胞を、レンチウイルスプラスミドトランスフェクションの前に、１５ｃｍプレートに播種した（１２×10^6個の細胞）。Ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ　Ｐａｃｋａｇｉｎｇ　Ｍｉｘ（Ｂｉｏｓｅｔｔｉａ、２７ｕｇ）及び遺伝子組換え候補ライブラリーのためのプラスミドＤＮＡ（２７ｕｇ）を用いたレンチウイルスプラスミドトランスフェクションを、製造業者のプロトコルに従って、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００及びＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地を用いて、翌日に行った。細胞外ＤＮＡを、翌日、完全な培地交換によって除去し、ウイルス含有培地を、４８時間後に収集した。レンチウイルス培地を、Ｌｅｎｔｉ－Ｘ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ（ＴａＫａＲａ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて濃縮し、５ｍＬのレンチウイルスアリコートを作製し、－８０℃で貯蔵した。レンチウイルス力価測定を、ピューロマイシン選択後にコロニー形成単位を計数することによって行った。ＢＦＰ発現ゲノムランディングパッドを担持するＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞を、培養プレート中６×10^7個の細胞で播種し、細胞当たりの多重感染を最小限に抑えるために０．３感染多重度（ＭＯＩ）で形質導入した。ピューロマイシン（２．５ｕｇ／ｍＬ）を、感染細胞の選択を可能にするために、感染の４８時間後に加えた。細胞を、少なくとも７日間にわたってピューロマイシン選択下に置き、次に、ｔｇＲＮＡエレクトロポレーションのためにスケールアップした。

【０６１７】

アッセイにおける遺伝子組換えライブラリー候補のゲノム編集能力を決定するために、次に、感染されたＢＦＰ発現ＨＥＫ２９３Ｔ又はＵ２ＯＳ細胞を、ライブラリー候補につき＞１０００×カバレージのために十分な細胞数で、ＢＦＰをＧＦＰに変換するように設計された２００ｎｇのｔｇＲＮＡ（ｇ４又はｇ１０のいずれか）プラスミドによる、２５０，０００個の細胞／ウェルのエレクトロポレーションによってトランスフェクトした。

【０６１８】

ｇ４　ｔｇＲＮＡ（５’－３’）は、以下のとおりである：２０ヌクレオチドスペーサー領域（ＧＣＣＧＡＡＧＣＡＣＴＧＣＡＣＧＣＣＧＴ（配列番号４６３６））、スカフォールド領域（ＧＴＴＴＴＡＧＡＧＣＴＡＧＡＡＡＴＡＧＣＡＡＧＴＴＡＡＡＡＴＡＡＧＧＣＴＡＧＴＣＣＧＴＴＡＴＣＡＡＣＴＴＧＡＡＡＡＡＧＴＧＧＣＡＣＣＧＡＧＴＣＧＧＴＧＣ（配列番号４５９５））、ＢＦＰをＧＦＰに変化させる単一の塩基対置換（太字）及び機能遺伝子組換え反応の完了時に遺伝子組換えポリペプチドの再エンゲージメントを防ぐＳｐｙＣａｓ９　ＰＡＭ（ＮＧＧからＮＣＧ）における同義点突然変異を導入するＰＡＭ不活性化（下線）をコードする鋳型領域（

【化３２】
(ACCCTGACGTACG) (配列番号: 4637)

）、及び１３ヌクレオチドＰＢＳ（ＧＣＧＴＧＣＡＧＴＧＣＴＴ（配列番号４６３８））。

【０６１９】
同様に、ｇ１０　ｔｇＲＮＡ（５’－３’）は、以下のとおりである：２０ヌクレオチドスペーサー領域（ＡＧＡＡＧＴＣＧＴＧＣＴＧＣＴＴＣＡＴＧ（配列番号４６３９））、スカフォールド領域（ＧＴＴＴＴＡＧＡＧＣＴＡＧＡＡＡＴＡＧＣＡＡＧＴＴＡＡＡＡＴＡＡＧＧＣＴＡＧＴＣＣＧＴＴＡＴＣＡＡＣＴＴＧＡＡＡＡＡＧＴＧＧＣＡＣＣＧＡＧＴＣＧＧＴＧＣ（配列番号４５９５））、ＢＦＰをＧＦＰに変化させる単一の塩基対置換（太字）及び機能遺伝子組換え反応の完了時に遺伝子組換えポリペプチドの再エンゲージメントを防ぐＳｐｙＣａｓ９　ＰＡＭ（ＮＧＧからＮＧＡ）における同義点突然変異を導入するＰＡＭ不活性化（下線）をコードする鋳型領域（

【化３３】
(ACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCGGCCGCTACCCCGATCACAT)(配列番号: 4640)

）、及び１３ヌクレオチドＰＢＳ（ＧＡＡＧＣＡＧＣＡＣＧＡＣ（配列番号４６４１））。

【０６２０】
アッセイにおいて様々な構築物のゲノム編集能力を評価するために、細胞を、エレクトロポレーションの６～７日後に、ＧＦＰ発現のために蛍光活性化細胞ソーティング（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ－Ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｏｒｔｉｎｇ）（ＦＡＣＳ）によってソートした。細胞をソートし、非編集（ＢＦＰ＋）細胞、編集（ＧＦＰ＋）細胞及び不完全な編集（ＢＦＰ－、ＧＦＰ－）細胞の異なる集団として収集した。非ソート細胞のサンプルも、分析中の富化を決定するために、入力集団として収集した。

【０６２１】
どの遺伝子組換えライブラリー候補が、このアッセイにおいてゲノム編集能力を有するかを決定するために、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）を、ソート及び非ソート細胞集団から収集し、各集団における遺伝子組換えライブラリー候補をシーケンシングすることによって分析した。簡潔に述べると、遺伝子組換え配列を、レンチウイルスカセットに特異的なプライマーを用いてゲノムから増幅し、ゲノムＤＮＡを希釈するために第２回のＰＣＲにおいて増幅し、次に、製造業者のプロトコルに従って、Ｏｘｆｏｒｄ　Ｎａｎｏｐｏｒｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙを用いてシーケンシングした。

【０６２２】
シーケンシングリードの品質管理の後、少なくとも１５００且つ３２００ヌクレオチド以下のリードを、遺伝子組換えポリペプチドライブラリー配列にマップし、ライブラリー配列との最小で８０％の一致を含むものが、所与の候補と問題なく整列されたと見なされた。アッセイにおいて遺伝子編集を行うことが可能な遺伝子組換え候補を同定するために、編集された集団における各ライブラリー候補のリードカウントを、最初の非ソート集団におけるそのリードカウントと比較した。このプールされたスクリーンのために、ゲノム編集能力を有する遺伝子組換え候補を、非ソート（入力）細胞と比べて変換された（ＧＦＰ＋）集団において富化された候補として選択し、富化は、参照（エレメントＩＤ番号：１７３８０）の富化レベルであるか又はそれを超えると決定された。

【０６２３】
多数の遺伝子組換えポリペプチド候補が、ＧＦＰ＋細胞集団において富化されていることが決定された。例えば、試験された１７，４４６の候補のうち、３，３００超が（非ソートと比べて）ＧＦＰ＋ソート集団において富化を示し、これは、表Ｄに示される、同様の実験条件（ｇ４　ｔｇＲＮＡを用いたＨＥＫ２９３Ｔ；ｇ１０　ｔｇＲＮＡを用いたＨＥＫ２９３Ｔ細胞；又はｇ４　ｔｇＲＮＡを用いたＵ２ＯＳ細胞）下の参照のものと少な

くとも同等であった。１７，４４６の候補は、ｇ１０　ｔｇＲＮＡを用いたＵ２ＯＳ細胞でも試験されたが、プールされたスクリーンでは、その実験条件下における非ソート（入力）細胞と比べて、変換された（ＧＦＰ＋）集団において富化された候補を得られず；これらの結果を説明するために、更なる調査が必要とされる。

【０６２４】

【表Ｄ－１】

表D. スクリーニングされるリンカー及びRT配列の組合せ。この表中の各RTのアミノ酸配列は、表6に示される。

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKGSS	4152	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVMS_P03355_PLV919
PAPEAAAK	4156	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKPAPGGG	4208	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGGEAAAK	4209	MLVAV_P03356_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAK	4151	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKPAPGGS	4190	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	MLVFF_P26809_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	XMRV6_A1Z651_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	MLVFF_P26809_3mutA
PAPEAAAKGSS	4216	MLVFF_P26809_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	AVIRE_P03360_3mutA
PAPAPAPAPAP	4135	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAPAPAPAP	4135	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGGSPAP	4189	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAP		MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGGGSS	4203	WMSV_P03359_3mutA
SGSETPGTSESATPES	4220	MLVFF_P26809_3mutA
PAPEAAAKGSS	4216	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGSGGG	4167	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGS	4108	MLVFF_P26809_3mutA
GGGPAPGSS	4200	MLVAV_P03356_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MLVCB_P08361_3mutA
GSSPAP	4153	AVIRE_P03360_3mutA

【０６２５】

【表Ｄ－２】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKGSSPAP	4213	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGGGEAAAK	4195	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPAPAPAP	4134	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGSPAP	4189	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGGSEAAAK	4191	AVIRE_P03360_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MLVCB_P08361_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	WMSV_P03359_3mutA
GSS		MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSSGSS	4122	MLVMS_P03355_PLV919
GSSPAPEAAAK	4212	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSPAPEAAAK	4188	MLVFF_P26809_3mutA
GGGEAAAKGGS	4166	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGGGG	4118	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGPAP	4149	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAPAPAPAPAP	4136	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	MLVCB_P08361_3mutA
PAP		MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPAPAPAPAPAP	4136	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKPAPGSS	4214	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGS	4142	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKPAPGSS	4214	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGGS	4168	MLVMS_P03355_PLV919
GGSPAP	4143	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGGPAP	4207	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	MLVFF_P26809_3mutA
PAP		MLVCB_P08361_3mutA
EAAAK	4028	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGSSPAP	4181	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAKGGG	4196	MLVAV_P03356_3mutA
GGGEAAAKGGS	4166	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MLVAV_P03356_3mutA

【０６２６】

【表Ｄ－３】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	AVIRE_P03360_3mutA
SGSETPGTSESATPES	4220	AVIRE_P03360_3mutA
GGGEAAAKPAP	4205	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGSSGGG	4198	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	WMSV_P03359_3mut
GGSGGSGGSGGS	4104	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSEAAAKPAP	4187	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGSSGGG	4198	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGS	4027	MLVFF_P26809_3mutA
GGGEAAAKGSS	4194	MLVMS_P03355_PLV919
PAPAPAPAPAP	4136	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	MLVCB_P08361_3mutA
GGGEAAAKGSS	4194	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGSGSS	4185	MLVFF_P26809_3mutA
GSAGSAAGSGEF	4221	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGSEAAAK	4191	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGSS	4139	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGGGGSS	4203	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSS	4121	XMRV6_A1Z651_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAK	4028	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSSGSS	4122	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGGGGSS	4203	MLVCB_P08361_3mutA
GGGEAAAKGGS	4166	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGGEAAAK	4209	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGGSPAP	4171	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGS	4142	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPEAAAK	4156	MLVAV_P03356_3mutA
GGSGGSGGSGGS	4104	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGPAPGGS	4172	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSSGSS	4122	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKPAPGGS	4190	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSS	4120	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	FLV_P10273_3mutA
GSS		MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAK	4126	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPEAAAKGGG	4210	MLVAV_P03356_3mutA

【０６２７】

【表Ｄ－４】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGSGSSEAAAK	4175	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	PERV_Q4VFZ2
GSSEAAAKPAP	4211	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGG	4148	MLVFF_P26809_3mutA
GSSPAPGGG	4202	MLVCB_P08361_3mutA
GGGPAPGSS	4200	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGGS	4138	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPAPAPAP	4134	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSSEAAAK	4193	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGS	4104	MLVCB_P08361_3mutA
PAPEAAAKGGS	4192	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGPAP	4207	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	MLVMS_P03355_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	FLV_P10273_3mutA
GGSEAAAKGGG	4164	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGPAPGGS	4172	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAPAPAPAPAP	4136	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGSSGGG	4158	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGSSGGG	4158	MLVCB_P08361_3mutA
GGGEAAAKGGS	4166	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAK	4028	MLVCB_P08361_3mutA
GGSPAPGSS	4182	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSSEAAAK	4193	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPAPAPAPAP	4135	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGGSGSS	4159	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPAPAPAPAPAP	4136	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGGGGS	4162	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGSSGGG	4204	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGGPAP	4169	MLVCB_P08361_3mutA

【０６２８】

【表Ｄ－５】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGGGGG	4117	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	MLVCB_P08361_3mutA
GGGPAPGGS	4172	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGGSGGG	4167	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGGGSS	4197	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPAPAPAPAP	4135	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKGGS	4166	MLVMS_P03355_PLV919
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	MLVMS_P03355_3mut
GSAGSAAGSGEF	4221	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGGSGSS	4179	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGGG	4150	MLVFF_P26809_3mutA
GGGPAPGSS	4200	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPEAAAKGGS	4192	AVIRE_P03360_3mutA
PAPGGGEAAAK	4209	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSSEAAAK	4193	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAK	4028	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGGGEAAAK	4163	MLVMS_P03355_PLV919
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	MLVFF_P26809_3mutA
GSSPAPGGS	4184	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGGGPAP	4169	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAK	4028	AVIRE_P03360_3mutA
GSS		XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGGSGGS	4103	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	AVIRE_P03360_3mut
PAPEAAAKGGG	4210	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSEAAAK	4165	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGSSGGG	4158	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGGG	4117	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSEAAAKPAP	4211	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGSEAAAK	4165	WMSV_P03359_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	MLVFF_P26809_3mut
GGGEAAAKGGS	4166	AVIRE_P03360_3mutA
GGSPAPGGG	4170	AVIRE_P03360_3mutA
GSAGSAAGSGEF	4221	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAK	4028	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKPAPGSS	4214	WMSV_P03359_3mutA

【０６２９】

【表Ｄ－６】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSEAAAKPAP	4187	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAPAPAPAPAP	4136	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSPAPGGG	4170	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSEAAAKGGG	4164	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGSGGSGGS	4104	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	MLVFF_P26809_3mutA
GGG		AVIRE_P03360_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGSGGSGGS	4104	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGEAAAK	4147	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGGPAP	4201	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSEAAAKPAP	4211	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAK	4126	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MLVCB_P08361_3mut
GGGGGG	4116	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGSSGGG	4158	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGGGEAAAK	4195	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPAPAPAPAP	4135	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKGGSGGG	4167	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSSPAP	4199	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGEAAAKPAP	4205	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGGPAP	4169	BAEVM_P10272_3mutA
PAPGSSGGS	4186	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGGPAP	4169	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGSPAP	4189	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGSGGG	4167	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGSSGGG	4204	MLVFF_P26809_3mutA
GSSEAAAKGGS	4178	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGSSEAAAK	4215	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGSSEAAAK	4215	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGSSGGG	4198	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGGGS	4168	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	MLVMS_P03355_PLV919
PAPAPAPAPAPAP	4136	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	MLVCB_P08361_3mutA

【０６３０】

【表Ｄ－７】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPGGSEAAAK	4191	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGSSEAAAK	4215	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPEAAAKGSS	4216	AVIRE_P03360_3mutA
GGSPAPGSS	4182	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGSGGG	4173	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGSGSS	4179	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGG	4137	MLVFF_P26809_3mutA
GGSEAAAKGSS	4176	KORV_Q9TTC1_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAPAPAPAPAP	4136	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPEAAAK	4156	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSEAAAKGGG	4164	MLVMS_P03355_PLV919
GSSPAP	4153	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSS	4145	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKPAP	4205	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKPAPGGS	4190	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGGGPAP	4207	MLVAV_P03356_3mutA
PAPGGSEAAAK	4191	BAEVM_P10272_3mutA
PAPGGSGSS	4185	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGGSGSS	4185	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGGGPAP	4169	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSSPAP	4199	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGGGPAP	4201	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSSGGS	4160	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGG	4137	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGGGGGS	4162	MLVMS_P03355_PLV919
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGGSGSS	4159	KORV_Q9TTC1_3mut
GGGEAAAKGGS	4166	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGGG	4137	BAEVM_P10272_3mutA
PAPAPAP	4133	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	SFV3L_P27401_2mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	4195	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGSEAAAK	4177	MLVFF_P26809_3mutA
PAP		MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS

【０６３１】

【表Ｄ－８】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPAP	4132	AVIRE_P03360_3mutA
PAP		MLVFF_P26809_3mutA
GSSGGG	4146	MLVMS_P03355_3mut
GSSPAPGGS	4184	MLVFF_P26809_3mutA
PAPAPAPAP	4134	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGSSGGS	4180	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPEAAAKGGG	4210	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGGS	4144	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGG	4148	MLVCB_P08361_3mutA
GSSEAAAKPAP	4211	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGS	4144	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGGS	4142	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	FLV_P10273_3mutA
PAPGGSEAAAK	4191	MLVAV_P03356_3mutA
GSS		MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSSGSS	4122	AVIRE_P03360_3mutA
GSSGSSGSS	4121	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGGG	4146	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAK	4028	MLVFF_P26809_3mutA
GGSPAPEAAAK	4188	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGSS	4139	MLVCB_P08361_3mutA
GSSPAPGGG	4202	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	FLV_P10273_3mutA
GGGGSS	4145	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSPAPGSS	4182	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPEAAAKGGG	4210	FLV_P10273_3mutA
EAAAKPAPGGS	4190	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPAP	4132	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVMS_P03355_PLV919
GSSPAPGGG	4202	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGPAP	4207	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPEAAAK	4156	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGGEAAAK	4209	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGSSGGS	4180	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAK	4151	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSS	4122	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	MLVMS_P03355_3mutA_WS

【０６３２】

【表Ｄ－９】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MLVMS_P03355_3mut
GGS		MLVCB_P08361_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGSSPAP	4181	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPAPAPAPAP	4135	BAEVM_P10272_3mutA
PAPAPAPAPAP	4135	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGGSGGS	4103	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKPAPGSS	4214	MLVMS_P03355_PLV919
GSS		MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPEAAAKGGS	4192	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGPAPGGS	4172	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGGSS	4197	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	MLVFF_P26809_3mut
SGSETPGTSESATPES	4220	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAKGGG	4164	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	AVIRE_P03360_3mutA
PAPAPAPAPAP	4136	AVIRE_P03360_3mut
GGSGGS	4102	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGSSEAAAK	4215	MLVCB_P08361_3mut
GGSPAPEAAAK	4188	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGGGS	4168	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGGSGGSGGS	4104	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSSEAAAK	4193	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAKGGG	4196	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGGS	4144	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGSGGG	4167	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGG	4148	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGS	4144	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSPAPGGG	4202	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPEAAAKGGG	4210	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSEAAAKGGG	4196	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGSEAAAK	4191	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGGS	4138	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSPAPEAAAK	4188	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGPAP	4149	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGSSGGG	4204	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGSSGGG	4204	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS

【０６３３】

【表Ｄ－１０】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGEAAAKGSS	4194	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSEAAAKGGS	4178	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGSGSS	4185	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	BAEVM_P10272_3mutA
PAPAPAP	4133	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGG	4116	MLVAV_P03356_3mutA
GSSPAPEAAAK	4212	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGGSGGS	4103	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGPAPGGS	4172	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGPAPEAAAK	4206	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGGG	4137	AVIRE_P03360_3mutA
SGSETPGTSESATPES	4220	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGSSPAP	4213	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAK	4151	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSGGSGGG	4161	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	WMSV_P03359_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGGGSS	4203	MLVMS_P03355_3mutA_WS
SGSETPGTSESATPES	4220	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSPAPEAAAK	4188	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSEAAAKGGG	4196	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSEAAAK	4151	WMSV_P03359_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	AVIRE_P03360_3mutA
GSS		WMSV_P03359_3mutA
PAPGGSEAAAK	4191	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGS	4027	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGPAP	4149	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKPAPGSS	4214	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKPAPGSS	4214	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGGG	4116	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKPAPGGS	4190	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGGEAAAK	4209	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	AVIRE_P03360_3mutA
GSSEAAAKPAP	4211	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGGSEAAAK	4191	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGSS	4154	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGG	4148	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKPAP	4155	MLVCB_P08361_3mutA

【０６３４】

【表Ｄ－１１】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPEAAAKGGS	4192	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSPAPGGG	4170	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGSGSS	4185	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGGPAP	4169	MLVMS_P03355_PLV919
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	MLVMS_P03355
PAPEAAAKGSS	4216	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGSS	4152	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGS	4102	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	FLV_P10273_3mutA
GGSEAAAKGGG	4164	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGGG	4148	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGSEAAAK	4165	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKPAPGGS	4190	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGSGSS	4159	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGSSEAAAK	4215	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSEAAAKPAP	4211	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	MLVAV_P03356_3mutA
GGGPAPGGS	4172	WMSV_P03359_3mutA
GGSPAP	4143	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSEAAAKGGG	4164	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGGGG	4118	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSPAPGGG	4202	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGGG	4116	AVIRE_P03360_3mutA
GSSGGS	4140	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSPAPGSS	4182	MLVFF_P26809_3mutA
PAPEAAAKGGG	4210	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGGPAP	4207	MLVFF_P26809_3mutA
GGGEAAAKGGS	4166	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGSSPAP	4181	MLVFF_P26809_3mutA
SGSETPGTSESATPES	4220	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGSEAAAK	4191	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGG	4137	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSSPAP	4199	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAKGSS	4194	MLVAV_P03356_3mutA

【０６３５】

【表Ｄ－１２】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPAPAPAPAP	4136	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	PERV_Q4VFZ2
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGGSEAAAK	4165	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGSSEAAAK	4215	MLVCB_P08361_3mutA
GSAGSAAGSGEF	4221	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MLVFF_P26809_3mutA
GGSPAPGGG	4170	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSEAAAKGGG	4196	AVIRE_P03360_3mutA
GGGEAAAKPAP	4205	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGPAP	4149	AVIRE_P03360_3mutA
GGSEAAAK	4141	MLVCB_P08361_3mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKPAPGGS	4190	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGGGGG	4118	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGSS	4154	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAK	4028	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSAGSAAGSGEF	4221	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGGGEAAAK	4209	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSSGGS	4180	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	BAEVM_P10272_3mut
PAPGGGEAAAK	4209	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSEAAAKPAP	4187	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPAP	4132	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAP	4132	MLVFF_P26809_3mutA
GGSPAP	4143	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGSSGGS	4180	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGSSGGS	4186	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPAPAP	4133	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGGSGSS	4159	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSSEAAAK	4215	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSEAAAKPAP	4187	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	XMRV6_A1Z651_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	WMSV_P03359_3mut
GGSGGGEAAAK	4163	XMRV6_A1Z651_3mutA

【０６３６】

【表Ｄ－１３】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGEAAAK	4147	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGGGGGS	4162	MLVMS_P03355_3mut
PAPGGSEAAAK	4191	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGSPAP	4183	MLVMS_P03355_3mutA_WS
SGSETPGTSESATPES	4220	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSGGGGS	4108	MLVMS_P03355_PLV919
PAPAPAPAPAP	4135	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSS	4120	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSEAAAKPAP	4211	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGSSGGG	4158	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAK	4126	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSSGSS	4122	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSPAPGGG	4202	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	MLVMS_P03355_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	SFV1_P23074_2mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MLVMS_P03355_PLV919
GSAGSAAGSGEF	4221	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSSEAAAK	4215	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSEAAAK	4141	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSEAAAKPAP	4187	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGSGGS	4103	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGSGSS	4179	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	FLV_P10273_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGSSPAP	4181	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGSS	4139	WMSV_P03359_3mutA
PAPEAAAK	4156	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKPAP	4155	BAEVM_P10272_3mutA
GSSPAP	4153	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGPAP	4149	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	4179	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGGG	4137	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSPAP	4153	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGSSEAAAK	4175	BAEVM_P10272_3mutA

【０６３７】

【表Ｄ－１４】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPGSSGGS	4186	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGGG	4116	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGGSEAAAK	4191	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGS	4144	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGSGGSGGS	4104	BAEVM_P10272_3mutA
GSSPAP	4153	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAPAPAP	4134	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGG	4116	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSEAAAKGGS	4178	BAEVM_P10272_3mutA
GGSEAAAK	4141	FLV_P10273_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSPAPEAAAK	4212	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKPAPGGS	4190	MLVMS_P03355_3mut
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	FLV_P10273_3mut
GGSPAPEAAAK	4188	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKGGSGGG	4167	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVFF_P26809_3mutA
GSSPAP	4153	WMSV_P03359_3mutA
PAPAPAPAP	4134	MLVAV_P03356_3mutA
PAPGGSEAAAK	4191	KORV_Q9TTC1_3mut
GGSGSSEAAAK	4175	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGG	4146	MLVCB_P08361_3mutA
GGGEAAAKGSS	4194	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGSGGG	4173	MLVFF_P26809_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	FFV_O93209
PAPGGGGSS	4203	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGS	4142	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGSGGS	4103	WMSV_P03359_3mutA
PAPAP	4132	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	4195	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGSSEAAAK	4193	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGSSGGS	4180	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGGGG	4118	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSS	4121	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKPAP	4205	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSGSS	4159	MLVMS_P03355_3mutA_WS

【０６３８】

【表Ｄ－１５】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGGGGG	4117	MLVMS_P03355_PLV919
GGS		MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGG	4146	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	4179	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGSSEAAAK	4215	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAKPAP	4211	MLVMS_P03355_PLV919
GGSPAPGSS	4182	BAEVM_P10272_3mutA
GSAGSAAGSGEF	4221	MLVCB_P08361_3mut
GGSPAPGGG	4170	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSSGSS	4121	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	MLVCB_P08361_3mutA
GGSEAAAKGSS	4176	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGGGEAAAK	4209	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	4195	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGSS	4120	MLVCB_P08361_3mut
PAPAPAPAPAPAP	4136	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSPAPGGG	4170	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAK	4126	MLVFF_P26809_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	GALV_P21414_3mut
PAPAPAPAPAPAP	4136	WMSV_P03359_3mutA
GGGEAAAKGGS	4166	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGGGPAP	4207	KORV_Q9TTC1_3mut
PAPEAAAKGSS	4216	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPEAAAKGSS	4216	FLV_P10273_3mutA
PAPGGSEAAAK	4191	MLVMS_P03355_3mut
GSSPAPGGG	4202	BAEVM_P10272_3mutA
GGGEAAAKPAP	4205	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGGSGGGGS	4108	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKGSS	4194	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGGGGSS	4203	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSEAAAK	4151	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGGGGG	4118	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSSGGS	4186	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	BAEVM_P10272_3mutA
PAP		MLVMS_P03355_3mut

【０６３９】

【表Ｄ－１６】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKGSSPAP	4213	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPEAAAKGGS	4192	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGGGEAAAK	4195	BAEVM_P10272_3mutA
PAPAPAP	4133	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSEAAAKGGG	4164	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAK	4151	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGG	4114	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGS	4138	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSSEAAAK	4193	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSEAAAKGSS	4176	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGSSGGS	4186	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSPAP	4143	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSSEAAAK	4193	BAEVM_P10272_3mut
GGSGGSGGSGGS	4104	AVIRE_P03360_3mutA
PAPGSSGGS	4186	MLVFF_P26809_3mutA
GSSPAPGGG	4202	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGGG	4117	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGGGS	4168	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGSGGG	4167	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSSEAAAK	4193	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGSS	4120	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGG	4137	MLVMS_P03355_PLV919
PAPEAAAKGGG	4210	AVIRE_P03360_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
GGGGGSGSS	4159	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGSPAP	4171	FLV_P10273_3mut
GGGEAAAK	4147	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGS	4104	FLV_P10273_3mutA
GGG		MLVMS_P03355_PLV919
GGSPAPEAAAK	4188	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKEAAAK	4126	FLV_P10273_3mutA
GGGEAAAKPAP	4205	BAEVM_P10272_3mutA
GGGEAAAKGGS	4166	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGSGGS	4103	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGGPAP	4207	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAK	4028	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS

【０６４０】

【表Ｄ－１７】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPEAAAKGGG	4210	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSS	4152	MLVCB_P08361_3mutA
GGSEAAAKGGG	4164	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	BAEVM_P10272_3mut
GGGGSSPAP	4199	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAKPAP	4205	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAK	4126	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGSSEAAAK	4175	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPEAAAKGSS	4216	WMSV_P03359_3mutA
PAPAPAPAPAP	4135	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSGGGEAAAK	4195	MLVMS_P03355_PLV919
GSSPAPGGG	4202	MLVFF_P26809_3mutA
GGSPAPEAAAK	4188	MLVFF_P26809_3mut
PAPGGSEAAAK	4191	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSS	4145	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGSSGGG	4158	BAEVM_P10272_3mutA
GSSGGGEAAAK	4195	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGS	4142	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGPAPGGS	4172	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKEAAAK	4126	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSS	4121	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKPAP	4205	MLVAV_P03356_3mutA
SGSETPGTSESATPES	4220	FLV_P10273_3mutA
PAPAPAPAPAP	4135	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	BAEVM_P10272_3mutA
PAPGSSGGG	4204	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	4195	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSSPAP	4199	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGGGPAP	4169	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSS		PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSSPAP	4213	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGG	4148	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSGSSGSSGSS	4122	WMSV_P03359_3mutA
PAPEAAAKGSS	4216	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAK	4151	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGGSGSS	4179	AVIRE_P03360_3mutA
GSSEAAAK	4151	MLVMS_P03355_3mut

【０６４１】

【表Ｄ－１８】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGSGSSEAAAK	4175	MLVMS_P03355_PLV919
GGSEAAAKGGG	4164	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	MLVAV_P03356_3mutA
PAPAPAPAPAP	4136	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKPAPGSS	4214	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPGSSEAAAK	4215	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGSSPAP	4199	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGGGS	4168	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGEAAAKGGS	4166	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSSGGG	4158	MLVMS_P03355_3mut
GGGPAPGGS	4172	MLVAV_P03356_3mutA
PAPGGGGGS	4174	MLVMS_P03355_PLV919
GGGPAPGSS	4200	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGGG	4117	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGGGGSS	4157	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGGG	4116	FLV_P10273_3mutA
GGSEAAAKGSS	4176	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSPAPGGG	4170	BAEVM_P10272_3mutA
GGSPAPGSS	4182	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGGSGGSGGS	4104	KORV_Q9TTC1_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPGSSGGS	4186	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKGGGGSS	4197	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGSGGG	4173	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSSGGG	4204	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGSS	4120	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKGSS	4152	MLVFF_P26809_3mutA
GGGPAP	4149	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGS	4168	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGGSPAP	4189	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	WMSV_P03359_3mutA
GSSPAPGGG	4202	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGEAAAKGSS	4194	AVIRE_P03360_3mutA
GGGGSSEAAAK	4193	AVIRE_P03360_3mutA
GGGGGGGG	4118	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGSSEAAAK	4215	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKGSS	4152	MLVFF_P26809_3mut
GSSEAAAKGGG	4196	MLVCB_P08361_3mutA
GGSEAAAK	4141	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS

【０６４２】

【表Ｄ－１９】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GSSEAAAKGGG	4196	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGSGGG	4173	WMSV_P03359_3mutA
GSSGGSGGG	4161	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGSSGGG	4198	FLV_P10273_3mutA
GSSEAAAK	4151	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGGGEAAAK	4195	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSGGGGS	4108	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGGG	4148	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGSPAP	4189	MLVMS_P03355_PLV919
GGGPAPGGS	4172	AVIRE_P03360_3mutA
GSSEAAAK	4151	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	4195	PERV_Q4VFZ2_3mut
SGSETPGTSESATPES	4220	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGSSPAP	4181	MLVMS_P03355_3mut
GGGGGG	4116	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSPAPGGG	4170	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGSS	4139	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAP		MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKPAPGSS	4214	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGG	4148	MLVMS_P03355_3mut
GSSEAAAKPAP	4211	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGSS	4145	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGSSEAAAK	4175	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSS	4145	BAEVM_P10272_3mutA
PAPAP	4132	MLVFF_P26809_3mut
PAPEAAAKGGG	4210	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKGGS	4142	MLVMS_P03355_PLV919
PAPAPAPAPAP	4136	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSEAAAK	4165	MLVMS_P03355_3mut
PAPGGS	4144	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSS	4145	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGS	4027	MLVAV_P03356_3mutA
GSSPAPEAAAK	4212	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSSGGS	4160	MLVFF_P26809_3mutA
PAPEAAAKGSS	4216	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGSSEAAAK	4175	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGG	4148	MLVAV_P03356_3mutA
PAPGSSEAAAK	4215	FLV_P10273_3mutA
EAAAKGSSGGG	4198	MLVCB_P08361_3mutA

【０６４３】

【表Ｄ－２０】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPEAAAK	4156	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSPAPEAAAK	4188	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	MLVAV_P03356_3mutA
GSSEAAAKPAP	4211	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGGEAAAK	4195	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPGGSGGG	4173	AVIRE_P03360_3mutA
PAPGGSEAAAK	4191	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGS	4027	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPAPAPAPAP	4135	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	MLVMS_P03355_3mut
GSSGGSEAAAK	4177	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGS	4104	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGSSGGG	4198	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGG	4148	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
SGSETPGTSESATPES	4220	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGSSGGS	4186	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPEAAAKGSS	4216	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPEAAAK	4156	AVIRE_P03360_3mutA
GSSEAAAKGGG	4196	BAEVM_P10272_3mutA
GSSPAP	4153	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVFF_P26809_3mut
PAPGGSGSS	4185	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGSEAAAK	4177	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGS	4142	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGGS	4142	MLVFF_P26809_3mutA
GGSPAP	4143	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGSS	4139	MLVMS_P03355_PLV919
SGSETPGTSESATPES	4220	WMSV_P03359_3mut
GGGGGGG	4117	WMSV_P03359_3mut
GGSPAPGSS	4182	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGSSGGS	4160	WMSV_P03359_3mut
PAPGGS	4144	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSSGGS	4186	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	MLVFF_P26809_3mut
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	BAEVM_P10272_3mutA
GSSEAAAK	4151	PERV_Q4VFZ2_3mut

【０６４４】

【表Ｄ－２１】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	MLVMS_P03355_3mut
PAPAPAPAPAP	4136	MLVMS_P03355_3mut
GGSPAPEAAAK	4188	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAK	4028	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGSSGGS	4180	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGGGSS	4157	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGEAAAKPAP	4205	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGSGGG	4167	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGGSEAAAK	4165	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGGGG	4116	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGGG	4116	MLVMS_P03355_3mut
GGGGGGG	4117	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	AVIRE_P03360
PAPGSSGGS	4186	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGS	4138	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKPAP	4155	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGG		MLVMS_P03355_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	FLV_P10273_3mut
EAAAKGSSPAP	4213	MLVMS_P03355_3mut
SGSETPGTSESATPES	4220	BAEVM_P10272_3mutA
GGSPAPEAAAK	4188	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSSGSSGSS	4122	MLVAV_P03356_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	MLVMS_P03355_3mut
GGSPAP	4143	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGGSEAAAK	4165	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGG	4115	MLVFF_P26809_3mutA
GSSEAAAK	4151	MLVAV_P03356_3mutA
GGS		BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGGSPAP	4189	MLVCB_P08361_3mutA
PAPAPAPAP	4134	FLV_P10273_3mutA
PAPGGGEAAAK	4209	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGSSEAAAK	4193	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGG	4115	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGG	4115	MLVMS_P03355_3mut
PAPEAAAKGGG	4210	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGGPAP	4201	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGSPAP	4189	PERV_Q4VFZ2_3mut

【０６４５】

【表Ｄ－２２】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GSSGGSEAAAK	4177	MLVMS_P03355_PLV919
GSS		PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGS	4142	WMSV_P03359_3mutA
GGGGGSPAP	4171	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGSS	4152	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGSS	4197	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGSSGGG	4204	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSSEAAAK	4193	MLVFF_P26809_3mut
PAPAPAP	4133	MLVMS_P03355_3mut
GSSGGSEAAAK	4177	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPEAAAKGSS	4216	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGSSPAP	4181	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSSPAP	4199	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGS	4027	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAK	4126	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPGGGEAAAK	4209	BAEVM_P10272_3mutA
GSSGGSEAAAK	4177	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	FLV_P10273_3mut
GSSEAAAKPAP	4211	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKPAPGSS	4214	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGSPAP	4183	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSEAAAKGGG	4196	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAKGGS	4166	WMSV_P03359_3mutA
GSSEAAAKGGG	4196	MLVFF_P26809_3mut
PAPAPAP	4133	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGGSPAP	4189	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGGSEAAAK	4191	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGS	4027	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGSSGGG	4198	KORV_Q9TTC1_3mut
EAAAKGGGPAP	4207	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGSS	4152	BAEVM_P10272_3mutA
GGSPAPGGG	4170	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGEAAAKGGS	4166	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGGGSS	4197	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGPAP	4207	MLVFF_P26809_3mut
GSSPAP	4153	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGS	4142	MLVMS_P03355_3mut

【０６４６】

【表Ｄ－２３】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGGSS	4145	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGPAP	4149	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSSGGS	4180	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGGG	4150	MLVAV_P03356_3mutA
GSSPAPEAAAK	4212	BAEVM_P10272_3mutA
GGGPAP	4149	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGGGGS	4162	AVIRE_P03360_3mutA
SGSETPGTSESATPES	4220	MLVMS_P03355_PLV919
GGGPAP	4149	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGGGGSS	4197	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSSPAP	4199	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	MLVMS_P03355_3mut
GSSPAP	4153	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGSSEAAAK	4175	FLV_P10273_3mutA
SGSETPGTSESATPES	4220	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGGG	4150	AVIRE_P03360_3mutA
GGGEAAAKPAP	4205	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	4179	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSPAPGGG	4170	MLVAV_P03356_3mutA
PAPGGSGSS	4185	BAEVM_P10272_3mutA
GSSGGSPAP	4183	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGSSGGG	4198	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGS	4108	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGGGGS	4162	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSSGGS	4160	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGGS	4142	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSS	4122	MLVMS_P03355_3mut
GGS		MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGSEAAAK	4177	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	XMRV6_A1Z651
GGGGG	4115	FLV_P10273_3mutA
PAPEAAAKGSS	4216	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGG	4116	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGG	4148	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSS	4145	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	4195	KORV_Q9TTC1_3mut
GGSGSS	4139	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKPAP	4155	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	FLV_P10273_3mutA

【０６４７】

【表Ｄ－２４】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGG	4114	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSPAPGGS	4184	BAEVM_P10272_3mutA
GSSGGGGGS	4162	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSSGGS	4160	MLVAV_P03356_3mutA
GGS		PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGG	4115	WMSV_P03359_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	FLV_P10273_3mutA
PAPGGGGSS	4203	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGGGGG	4118	BAEVM_P10272_3mutA
SGSETPGTSESATPES	4220	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGG	4150	BAEVM_P10272_3mutA
GSSGSSGSS	4121	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGSS	4139	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	WMSV_P03359_3mutA
GGGGGGGG	4118	FLV_P10273_3mutA
GSSGSS	4120	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPEAAAKGGS	4192	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKEAAAK	4126	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSSEAAAK	4193	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSSEAAAK	4193	BAEVM_P10272_3mutA
PAPGGSGSS	4185	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGGEAAAK	4163	MLVFF_P26809_3mut
PAPEAAAKGGS	4192	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGPAPGSS	4200	AVIRE_P03360_3mut
PAPGGSGGG	4173	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGGGG	4118	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSEAAAK	4151	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGS	4142	MLVMS_P03355_3mut
GGGGGSGSS	4159	MLVCB_P08361_3mut
GGGPAP	4149	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKPAPGGG	4208	MLVCB_P08361_3mut
GSSGGSPAP	4183	MLVCB_P08361_3mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	MLVMS_P03355_3mut
PAPAPAPAP	4134	MLVMS_P03355_3mut
GSSGGS	4140	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSEAAAKGGG	4196	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSSPAP	4181	MLVMS_P03355_3mutA_WS

【０６４８】

【表Ｄ－２５】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GSSEAAAKGGS	4178	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	BAEVM_P10272_3mut
PAPGGGGSS	4203	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGSS	4152	MLVMS_P03355_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	FFV_O93209_2mut
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGGG	4116	MLVMS_P03355_PLV919
PAPEAAAK	4156	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGSSEAAAK	4175	MLVAV_P03356_3mutA
GGG		MLVCB_P08361_3mutA
GGGGG	4115	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGGSGGSGGS	4104	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSEAAAKPAP	4211	FLV_P10273_3mutA
GGGEAAAKPAP	4205	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSS	4121	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPAPAPAP	4134	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGG	4148	MLVMS_P03355_PLV919
PAPAPAPAPAPAP	4136	FLV_P10273_3mutA
EAAAKGGSGSS	4179	MLVMS_P03355_3mut
GGGGGG	4116	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGG	4150	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGGSGSS	4159	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSGGSGGS	4103	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKPAPGGG	4208	MLVMS_P03355_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	XMRV6_A1Z651
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	FLV_P10273_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGPAPGSS	4200	AVIRE_P03360_3mutA
GGGGG	4115	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSGGGGS	4108	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGSPAP	4189	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	AVIRE_P03360_3mutA
PAPGGSGSS	4185	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSS		MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSS		WMSV_P03359_3mut
GGGPAPGSS	4200	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKPAP	4155	MLVMS_P03355_3mut

【０６４９】

【表Ｄ－２６】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GSSPAPEAAAK	4212	FLV_P10273_3mutA
GGSPAPGSS	4182	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGGSEAAAK	4165	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPEAAAKGGG	4210	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGG	4150	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSPAPEAAAK	4188	WMSV_P03359_3mutA
GGSGGGGSS	4157	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGGGSS	4197	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGSPAP	4189	AVIRE_P03360_3mut
GGSGGGGSS	4157	WMSV_P03359_3mutA
PAPGSSEAAAK	4215	MLVFF_P26809_3mut
GSSEAAAK	4151	MLVMS_P03355_PLV919
GSAGSAAGSGEF	4221	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGGSGSS	4179	MLVMS_P03355_3mut
GGSEAAAKPAP	4187	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGSSEAAAK	4215	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGSSPAP	4199	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPAPAP	4133	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKPAPGGG	4208	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGPAPGSS	4200	BAEVM_P10272_3mutA
PAP		MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGGSGGG	4173	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPAPAPAP	4134	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSPAPGGG	4202	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSPAPGGG	4202	MLVMS_P03355_3mut
PAPGGG	4150	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKGSS	4194	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGSS	4152	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGGS	4142	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPEAAAKGGG	4210	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGSSGGG	4198	MLVFF_P26809_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	PERV_Q4VFZ2
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGGSGGG	4161	MLVFF_P26809_3mut
GSSGSSGSSGSS	4122	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSPAPGGG	4170	MLVMS_P03355_PLV919
GSS		BAEVM_P10272_3mut

【０６５０】

【表Ｄ－２７】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGPAPGSS	4200	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSS	4145	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSGGSGGG	4161	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	MLVCB_P08361_3mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	FLV_P10273_3mutA
PAPGGGGGS	4174	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPAPAPAPAP	4135	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAK	4028	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGG		MLVCB_P08361_3mut
GGSEAAAKGGG	4164	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGGSGSS	4159	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGSGGS	4103	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKPAPGGG	4208	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGPAPEAAAK	4206	FLV_P10273_3mutA
GGSPAPEAAAK	4188	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGGSGSS	4179	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKGGS	4166	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPAPAPAP	4134	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKPAP	4155	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKEAAAK	4126	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGGG	4148	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGSS	4152	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	MLVFF_P26809_3mut
GGGPAPGSS	4200	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGG	4114	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGSGSS	4179	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAK	4028	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSS	4145	PERV_Q4VFZ2
PAPEAAAKGGS	4192	MLVCB_P08361_3mut
GSS		MLVMS_P03355_3mut
GSAGSAAGSGEF	4221	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGGSGGGGS	4108	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAK	4028	MLVMS_P03355_3mut
GGGPAPGGS	4172	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	MLVMS_P03355_PLV919

【０６５１】

【表Ｄ－２８】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPGGG	4150	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGEAAAKPAP	4205	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKPAPGSS	4214	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGSS	4154	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSAGSAAGSGEF	4221	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGGGSS	4203	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGGEAAAK	4195	MLVCB_P08361_3mutA
GSS		AVIRE_P03360_3mutA
GSSGSSGSSGSS	4122	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPEAAAKGGG	4210	MLVMS_P03355_PLV919
GGGPAPEAAAK	4206	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGGGGS	4174	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSPAP	4171	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	PERV_Q4VFZ2
GSSPAPEAAAK	4212	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSPAPEAAAK	4188	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGGG	4146	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGSSGGS	4180	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGSSEAAAK	4175	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGPAPEAAAK	4206	MLVFF_P26809_3mutA
GGGPAPGGS	4172	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGG	4115	MLVMS_P03355_PLV919
GGGEAAAKPAP	4205	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGSGGGGS	4108	WMSV_P03359_3mut
GGGPAPEAAAK	4206	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGSSEAAAK	4175	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGPAP	4207	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPAP	4132	WMSV_P03359_3mutA
GGSPAPGSS	4182	MLVAV_P03356_3mutA
GGSGGGPAP	4169	MLVMS_P03355_3mut
GGSPAP	4143	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGSPAP	4189	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSPAPGGG	4202	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSAGSAAGSGEF	4221	MLVMS_P03355_3mut
GGSPAP	4143	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSS	4120	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut

【０６５２】

【表Ｄ－２９】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGPAPGSS	4200	MLVMS_P03355_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	FOAMV_P14350
PAPGSSGGG	4204	MLVMS_P03355_PLV919
GGSEAAAKPAP	4187	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGGS	4138	MLVCB_P08361_3mutA
PAPEAAAKGGS	4192	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	BAEVM_P10272_3mutA
GGSEAAAK	4141	BAEVM_P10272_3mutA
GSSPAPEAAAK	4212	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGGG	4150	WMSV_P03359_3mut
EAAAKPAP	4155	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	WMSV_P03359_3mut
PAPGGG	4150	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGGEAAAK	4163	BAEVM_P10272_3mutA
PAPGGS	4144	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGSGGSGGS	4104	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAKGGG	4164	WMSV_P03359_3mutA
GGGPAP	4149	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSPAPGSS	4182	KORV_Q9TTC1_3mut
GGGPAPGSS	4200	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSSGGS	4160	BAEVM_P10272_3mutA
GGGEAAAKGSS	4194	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPAP	4132	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSPAPGGG	4170	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGSS	4154	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGSPAP	4183	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSEAAAKGGS	4178	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPAPAPAP	4134	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSEAAAKPAP	4187	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGS	4144	FLV_P10273_3mutA
EAAAKGGGPAP	4207	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGSSGGG	4158	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGGSGSS	4179	BAEVM_P10272_3mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	MLVCB_P08361_3mutA
GSSEAAAKGGS	4178	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGG	4115	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	SFV3L_P27401_2mutA

【０６５３】

【表Ｄ－３０】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGEAAAKGSS	4194	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGGG	4148	AVIRE_P03360_3mut
GGSGGG	4137	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGSSGGG	4158	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	KORV_Q9TTC1_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPAPAPAPAP	4135	FLV_P10273_3mutA
GGS		MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGGSEAAAK	4165	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSSGGG	4158	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAP		MLVFF_P26809_3mut
GSSPAPEAAAK	4212	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGGGGSS	4197	MLVMS_P03355_3mut
GGGEAAAKGGS	4166	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSGGGPAP	4169	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSAGSAAGSGEF	4221	BAEVM_P10272_3mutA
GSSEAAAK	4151	MLVCB_P08361_3mut
PAPGSS	4154	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	MLVAV_P03356_3mutA
GSAGSAAGSGEF	4221	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSGSSGSSGSS	4122	BAEVM_P10272_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGGSSEAAAK	4193	WMSV_P03359_3mut
GSSGGGEAAAK	4195	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKPAP	4155	MLVFF_P26809_3mutA
GGSPAPGGG	4170	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPEAAAK	4156	FLV_P10273_3mutA
GSSGSSGSS	4121	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	4195	FLV_P10273_3mutA
GGSPAP	4143	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSAGSAAGSGEF	4221	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGGSEAAAK	4191	MLVMS_P03355_PLV919
GGSPAPEAAAK	4188	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGGSPAP	4171	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGSSPAP	4213	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGGPAP	4207	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGSS	4154	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA

【０６５４】

【表Ｄ－３１】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGSGSSGGG	4158	BAEVM_P10272_3mut
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	FFV_O93209-Pro_2mut
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	WMSV_P03359_3mutA
GGSGGSGGS	4103	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGG	4115	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGPAP	4149	FLV_P10273_3mutA
PAPGGSGGG	4173	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKGSSGGG	4198	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGSEAAAK	4177	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGSGSS	4179	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPAPAPAPAP	4135	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGGG	4117	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAK	4028	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGEAAAKGGS	4166	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGEAAAKGGS	4166	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSPAP	4171	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	MLVFF_P26809_3mut
GGGGGGG	4117	MLVFF_P26809_3mut
PAPAPAPAPAPAP	4136	AVIRE_P03360_3mutA
GSSPAPGGG	4202	FLV_P10273_3mutA
GGGGGSPAP	4171	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	KORV_Q9TTC1_3mut
GSSEAAAKGGS	4178	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGGGGS	4168	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGGGGS	4162	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAKPAP	4205	MLVMS_P03355_3mut
GSSGGSPAP	4183	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGGPAP	4201	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGGSGSS	4159	MLVMS_P03355_PLV919
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	BAEVM_P10272_3mut
PAPEAAAK	4156	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	FLV_P10273_3mutA
GGSGSSGGG	4158	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGS	4142	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSSPAP	4213	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGGSGSS	4179	WMSV_P03359_3mutA

【０６５５】

【表Ｄ－３２】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GSSGSS	4120	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPAPAPAP	4134	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGG	4137	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSS		MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAP		KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGSSEAAAK	4175	MLVFF_P26809_3mut
PAPEAAAKGSS	4216	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGGS	4102	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGGGG	4117	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSPAPEAAAK	4188	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSPAP	4143	MLVMS_P03355_3mut
GGSEAAAKGGG	4164	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGS	4108	FLV_P10273_3mutA
GGGEAAAK	4147	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	SFV3L_P27401_2mut
GGSEAAAKPAP	4187	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGGEAAAK	4195	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGGSEAAAK	4165	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGSGGG	4167	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSSPAP	4199	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKEAAAK	4126	MLVMS_P03355_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	SFV3L_P27401_2mut
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGG	4146	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGS	4140	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSGGGGS	4108	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGSS	4154	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGPAPEAAAK	4206	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGS	4142	MLVFF_P26809_3mut
GSS		KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGG	4114	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGSEAAAK	4165	AVIRE_P03360_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGSGGG	4173	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGPAP	4149	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGPAPEAAAK	4206	AVIRE_P03360_3mutA
GGGEAAAK	4147	MLVCB_P08361_3mut
GGG		MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKPAPGSS	4214	XMRV6_A1Z651_3mutA

【０６５６】

【表Ｄ－３３】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGSGSSEAAAK	4175	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGSS	4152	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSSEAAAK	4175	BAEVM_P10272_3mut
GGSGGG	4137	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGPAP	4149	MLVMS_P03355_PLV919
GGSPAPGGG	4170	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSEAAAK	4165	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKGSSGGS	4180	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPAP	4132	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSPAPGGS	4184	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSEAAAKGGG	4196	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGGGGS	4168	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGGGSS	4197	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSS	4152	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGGS	4142	MLVCB_P08361_3mut
GSSGGSEAAAK	4177	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKPAPGGS	4190	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGS	4102	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGSSGGG	4198	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGGSGGSGGS	4104	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGGGG	4118	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGSSEAAAK	4175	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKGGG	4148	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGSGGSGGS	4104	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPAPAPAPAP	4135	WMSV_P03359_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGSGGS	4103	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGGGGSS	4203	BAEVM_P10272_3mutA
GSSEAAAKGGS	4178	MLVCB_P08361_3mut
GSSGGGPAP	4201	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGSS	4139	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGGSEAAAK	4165	MLVAV_P03356_3mutA
GSSEAAAK	4151	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSGSS	4159	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	4179	MLVFF_P26809_3mut
PAP		FLV_P10273_3mutA
GGGGG	4115	MLVMS_P03355_3mutA_WS

【０６５７】

【表Ｄ－３４】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAK	4028	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSS		FLV_P10273_3mutA
PAPAPAPAPAP	4136	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPGGSGGG	4173	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGGPAP	4169	WMSV_P03359_3mutA
GGGGSSEAAAK	4193	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGGGGSS	4203	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGSGGSGGS	4104	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGSGGG	4173	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSPAPGGS	4184	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSSGSS	4121	MLVFF_P26809_3mut
PAPGGGGGS	4174	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSPAP	4153	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGG	4137	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSPAPEAAAK	4188	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKPAP	4155	BAEVM_P10272_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGGGSS	4197	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKEAAAK	4126	MLVCB_P08361_3mut
GSSEAAAKGGS	4178	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSPAP	4143	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	BAEVM_P10272_3mut
PAPEAAAK	4156	MLVMS_P03355_3mut
GSSGGSPAP	4183	PERV_Q4VFZ2
GGGPAPGGS	4172	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKPAPGGS	4190	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGS	4108	PERV_Q4VFZ2
GGGEAAAK	4147	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAKGGGGGS	4168	FLV_P10273_3mutA
GGSPAPGSS	4182	MLVMS_P03355_3mut
GSSPAPEAAAK	4212	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSAGSAAGSGEF	4221	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAK	4028	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKGGGGSS	4197	BAEVM_P10272_3mutA
GGG		WMSV_P03359_3mut
GGSGSSPAP	4181	BAEVM_P10272_3mut

【０６５８】

【表Ｄ－３５】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGSEAAAKPAP	4187	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	4179	MLVCB_P08361_3mut
PAPGSS	4154	MLVAV_P03356_3mutA
PAPEAAAKGGG	4210	MLVCB_P08361_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	FOAMV_P14350-Pro_2mut
GSSGSSGSS	4121	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGG	4150	MLVMS_P03355_3mut
PAPGGS	4144	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGGG	4146	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	WMSV_P03359_3mut
PAP		AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSS	4122	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	AVIRE_P03360
GGGGS	4027	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSSGGG	4198	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGGG	4116	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGSGSSEAAAK	4175	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSPAPEAAAK	4212	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGSGGGGS	4108	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGGGGS	4162	MLVAV_P03356_3mutA
GSAGSAAGSGEF	4221	WMSV_P03359_3mutA
GGGEAAAKGSS	4194	BAEVM_P10272_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	FFV_O93209-Pro_2mut
PAPGGSGGG	4173	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	SFV3L_P27401_2mut
GGSGSSPAP	4181	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGGG	4116	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSSPAP	4213	MLVFF_P26809_3mut
GGGPAPGGS	4172	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	SFV3L_P27401
PAP		PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGS	4142	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGSEAAAK	4177	WMSV_P03359_3mutA
GGSGSSEAAAK	4175	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	PERV_Q4VFZ2
GGSGGGEAAAK	4163	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGSS	4152	XMRV6_A1Z651_3mutA

【０６５９】

【表Ｄ－３６】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GSSGGGGGS	4162	WMSV_P03359_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGSS	4139	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGPAP	4207	PERV_Q4VFZ2
GGSEAAAKGGG	4164	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSPAPEAAAK	4212	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSSGSSGSS	4122	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAK	4141	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGGGGG	4118	MLVMS_P03355_3mut
GSSGGG	4146	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGS	4142	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGS	4027	BAEVM_P10272_3mutA
GGSEAAAKGGG	4164	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGSSGGG	4158	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGSSEAAAK	4175	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGSGSS	4179	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGS		BAEVM_P10272_3mutA
GGGPAPGSS	4200	WMSV_P03359_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	AVIRE_P03360_3mut
GGGEAAAKPAP	4205	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSGGG	4146	MLVFF_P26809_3mutA
GGSPAPGSS	4182	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGS	4144	MLVCB_P08361_3mut
PAPAPAPAPAP	4135	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSGGS	4140	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGGSEAAAK	4177	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGSSGGS	4180	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGG	4148	WMSV_P03359_3mut
PAPGGGGGS	4174	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGS		KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGSPAP	4183	BAEVM_P10272_3mutA
GGG		MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSS	4154	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGSEAAAKGGG	4164	FLV_P10273_3mutA

【０６６０】

【表Ｄ－３７】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGSEAAAKPAP	4187	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGSSPAP	4199	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGG	4114	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSEAAAKPAP	4187	MLVMS_P03355_3mut
PAPGSSGGG	4204	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPEAAAKGGS	4192	AVIRE_P03360_3mut
GGGGSSPAP	4199	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAK	4147	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSS	4145	MLVFF_P26809_3mut
GGSPAPGSS	4182	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGS	4027	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGSSGGS	4180	FLV_P10273_3mutA
GSS		MLVMS_P03355_PLV919
GGGG	4114	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGS	4140	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGSGGSGGS	4104	MLVMS_P03355_3mut
PAPEAAAKGGS	4192	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGSSGGG	4198	BAEVM_P10272_3mutA
GSSEAAAK	4151	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSAGSAAGSGEF	4221	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGGGSEAAAK	4165	MLVCB_P08361_3mut
GGGG	4114	WMSV_P03359_3mut
GGGGSSEAAAK	4193	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGG	4150	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGSGGG	4167	MLVAV_P03356_3mutA
GGGPAPGGS	4172	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKPAP	4155	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGSSGSS	4121	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSPAPGGS	4184	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGGSPAP	4171	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGSSGGG	4158	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGEAAAKGSS	4194	AVIRE_P03360_3mut
GSSEAAAK	4151	FLV_P10273_3mutA
EAAAK	4028	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGSGSS	4179	WMSV_P03359_3mut
GSSEAAAKGGG	4196	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGSSGGG	4204	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKGGGGGS	4168	MLVMS_P03355_3mut

【０６６１】

【表Ｄ－３８】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGSEAAAKPAP	4187	AVIRE_P03360_3mut
GGGPAPGGS	4172	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGS	4027	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGPAP	4149	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAKPAP	4155	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSEAAAK	4141	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAKPAP	4211	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGSS	4139	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKPAPGGG	4208	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSPAPEAAAK	4188	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSEAAAKGGG	4164	AVIRE_P03360_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGGEAAAK	4195	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGGGPAP	4207	WMSV_P03359_3mut
GSSPAP	4153	XMRV6_A1Z651_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	SFV3L_P27401-Pro
GGSEAAAKGSS	4176	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGSEAAAK	4177	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSEAAAKGSS	4176	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGGG	4148	AVIRE_P03360_3mutA
GSSGGSEAAAK	4177	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPGSSEAAAK	4215	MLVMS_P03355_3mut
PAPEAAAK	4156	WMSV_P03359_3mut
PAPGGSGSS	4185	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGSS	4154	BAEVM_P10272_3mut
PAPGGGGGS	4174	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKPAPGSS	4214	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSPAPGGS	4184	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGSSEAAAK	4175	MLVMS_P03355_3mut
GGGGGG	4116	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSPAPGSS	4182	MLVMS_P03355_PLV919
PAPAPAPAPAP	4135	MLVCB_P08361_3mut
GGSGSSPAP	4181	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGSGGG	4167	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	PERV_Q4VFZ2_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSGGGEAAAK	4195	WMSV_P03359_3mutA

【０６６２】

【表Ｄ－３９】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GSSGGSEAAAK	4177	FLV_P10273_3mutA
GGGGGGGG	4118	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGSEAAAK	4191	FLV_P10273_3mutA
GGGGSSPAP	4199	BAEVM_P10272_3mutA
PAPAPAPAP	4134	WMSV_P03359_3mut
GGSEAAAKPAP	4187	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGSGGG	4173	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGGPAP	4169	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGPAPEAAAK	4206	MLVFF_P26809_3mut
GGGGGSGSS	4159	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSS		MLVCB_P08361_3mut
GGGGGSPAP	4171	MLVMS_P03355_PLV919
GGSPAP	4143	MLVAV_P03356_3mutA
GGGPAPGGS	4172	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGSSGGG	4204	FLV_P10273_3mutA
PAPGSSGGG	4204	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGS	4144	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGEAAAKGSS	4194	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSEAAAKGSS	4176	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGGSEAAAK	4191	MLVCB_P08361_3mut
GGSEAAAKGGG	4164	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGGGGSS	4157	WMSV_P03359_3mut
GGGEAAAKPAP	4205	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGSS	4152	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPEAAAKGSS	4216	MLVFF_P26809_3mut
GSAGSAAGSGEF	4221	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGGGGS	4168	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGSSPAP	4213	WMSV_P03359_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSEAAAKPAP	4211	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGGGG	4116	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGS	4144	BAEVM_P10272_3mut
PAP		AVIRE_P03360_3mut
PAPAPAP	4133	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGG	4114	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGSEAAAK	4177	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSGGGGSS	4157	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSSGGS	4160	AVIRE_P03360_3mutA

【０６６３】

【表Ｄ－４０】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GSSPAPGGG	4202	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSEAAAKPAP	4187	MLVMS_P03355_PLV919
PAP		KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GSSGGS	4140	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGG	4115	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGGGPAP	4201	FLV_P10273_3mutA
GSSEAAAKGGG	4196	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	MLVCB_P08361_3mut
GGSEAAAKPAP	4187	MLVCB_P08361_3mut
PAPAPAPAPAPAP	4136	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKPAPGSS	4214	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPEAAAKGSS	4216	MLVAV_P03356_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	AVIRE_P03360_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAKGGG	4164	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGGGSS	4157	MLVFF_P26809_3mutA
PAPEAAAKGSS	4216	MLVCB_P08361_3mut
GGG		PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGGEAAAK	4163	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGGGSS	4197	WMSV_P03359_3mut
GSSPAPGGG	4202	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGSSGGG	4198	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGGEAAAK	4163	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKPAPGGS	4190	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSEAAAK	4165	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSPAP	4153	MLVFF_P26809_3mut
GGGEAAAKPAP	4205	AVIRE_P03360_3mut
GSSGGSEAAAK	4177	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKPAPGGS	4190	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGG	4150	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GSSPAPEAAAK	4212	MLVFF_P26809_3mut
GGSGGGEAAAK	4163	MLVFF_P26809_3mutA
GSSGSSGSS	4121	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGS	4142	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKPAPGGS	4190	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKPAPGGS	4190	BAEVM_P10272_3mutA

【０６６４】

【表Ｄ－４１】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GSSGGGGGS	4162	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGGGSS	4203	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSSGSS	4121	WMSV_P03359_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	WMSV_P03359_3mut
GGS		AVIRE_P03360_3mut
EAAAKPAPGSS	4214	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGGG	4148	KORV_Q9TTC1_3mut
PAPGSSEAAAK	4215	MLVMS_P03355_3mut
PAPGSSGGS	4186	MLVMS_P03355_PLV919
GSSPAPEAAAK	4212	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	WMSV_P03359_3mutA
GGGGS	4027	BAEVM_P10272_3mut
GSSPAP	4153	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKEAAAK	4126	WMSV_P03359_3mutA
GGGGSSGGS	4160	MLVCB_P08361_3mutA
PAPGGSEAAAK	4191	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGGSPAP	4189	MLVFF_P26809_3mut
GSSGGSGGG	4161	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGS	4140	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGSGSS	4185	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	4179	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPAP	4132	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGSSPAP	4213	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKPAPGGG	4208	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKGGGGSS	4197	MLVMS_P03355_PLV919
PAPEAAAK	4156	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKPAPGSS	4214	BAEVM_P10272_3mutA
GGSPAP	4143	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGS	4102	BAEVM_P10272_3mutA
PAPEAAAKGSS	4216	KORV_Q9TTC1_3mut
PAPGSS	4154	MLVMS_P03355_PLV919
PAPAPAPAPAP	4135	MLVAV_P03356_3mutA
GGG		XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGPAP	4149	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSPAPEAAAK	4212	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAP		BAEVM_P10272_3mutA
GGSPAP	4143	BAEVM_P10272_3mutA
PAPEAAAKGGS	4192	MLVMS_P03355_PLV919

【０６６５】

【表Ｄ－４２】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPGSSGGS	4186	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPAPAPAPAP	4136	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKPAPGGS	4190	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGS	4102	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKPAP	4155	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSEAAAK	4141	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGSGGG	4137	KORV_Q9TTC1_3mut
GGSGGGEAAAK	4163	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPEAAAKGGG	4210	AVIRE_P03360
PAPAP	4132	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSS		KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGSSGGG	4198	MLVAV_P03356_3mutA
GGSPAPGSS	4182	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPEAAAK	4156	MLVAV_P03356_3mut
EAAAKGGSPAP	4189	BAEVM_P10272_3mutA
PAPAPAPAP	4134	WMSV_P03359_3mutA
PAPGGSEAAAK	4191	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGSGGSGGS	4104	WMSV_P03359_3mut
GGGGGSGSS	4159	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPGGSGGG	4173	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGS		MLVMS_P03355_3mut
EAAAK	4028	WMSV_P03359_3mut
GGGEAAAKGSS	4194	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSPAPGSS	4182	MLVCB_P08361_3mut
GGSEAAAKPAP	4187	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	MLVCB_P08361_3mutA
GGSGSS	4139	BAEVM_P10272_3mutA
GGGEAAAKGSS	4194	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGSPAP	4189	WMSV_P03359_3mut
GSSPAPEAAAK	4212	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGSGGSGGS	4104	MLVMS_P03355_PLV919
GSSPAPEAAAK	4212	WMSV_P03359_3mut
GSSGSSGSSGSS	4122	PERV_Q4VFZ2
GGSGSSEAAAK	4175	WMSV_P03359_3mutA
GGSGGG	4137	MLVFF_P26809_3mut
GGSPAPGGG	4170	MLVFF_P26809_3mut
GGSGGSGGS	4103	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSSEAAAK	4193	MLVBM_Q7SVK7_3mut

【０６６６】

【表Ｄ－４３】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGSPAPGSS	4182	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKPAPGSS	4214	AVIRE_P03360_3mut
GGGGSSGGS	4160	FLV_P10273_3mutA
GGSPAPEAAAK	4188	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAK	4141	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSS	4122	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGG	4115	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAKGSS	4176	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGGG	4146	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGSSGGG	4204	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGGS	4102	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGGGGGS	4168	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGSSPAP	4181	MLVCB_P08361_3mut
PAPGSSGGG	4204	KORV_Q9TTC1
PAPGGSGGG	4173	MLVMS_P03355_3mut
GGGG	4114	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGSPAP	4189	MLVCB_P08361_3mut
GSSGSS	4120	FLV_P10273_3mutA
GGSEAAAKPAP	4187	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKGSSGGS	4180	MLVAV_P03356_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGGSGSS	4179	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGG	4115	MLVCB_P08361_3mut
GGGEAAAK	4147	BAEVM_P10272_3mut
GGSGGSGGSGGS	4104	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	PERV_Q4VFZ2
PAPAPAPAPAP	4135	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAK	4126	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSGGSEAAAK	4177	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGSEAAAK	4191	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGGGPAP	4207	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPGGSGSS	4185	PERV_Q4VFZ2
SGSETPGTSESATPES	4220	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGS	4102	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGS	4142	FLV_P10273_3mut
GGSPAPGSS	4182	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	FFV_O93209_2mut
GSSGGSGGG	4161	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGSSEAAAK	4215	WMSV_P03359_3mut

【０６６７】

【表Ｄ－４４】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPAPAPAPAP	4136	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGGSS	4145	BAEVM_P10272_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	AVIRE_P03360_3mut
GSSPAPEAAAK	4212	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPEAAAKGGG	4210	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKEAAAK	4126	WMSV_P03359_3mut
EAAAK	4028	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSGGSGGG	4161	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGEAAAKPAP	4205	WMSV_P03359_3mutA
GGSGGS	4102	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	FOAMV_P14350_2mutA
GGGGG	4115	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGGSEAAAK	4177	BAEVM_P10272_3mut
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	SFV1_P23074
GGSGGGPAP	4169	MLVCB_P08361_3mut
GGSGSS	4139	PERV_Q4VFZ2_3mut
SGSETPGTSESATPES	4220	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGGSPAP	4189	MLVMS_P03355_3mut
PAPAP	4132	PERV_Q4VFZ2_3mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGGGS	4138	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKEAAAK	4126	AVIRE_P03360_3mut
GSSGGSEAAAK	4177	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAK	4147	WMSV_P03359_3mut
GSSGGGEAAAK	4195	AVIRE_P03360_3mutA
GGG		XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	BAEVM_P10272_3mut
GGGG	4114	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGS	4102	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGSGGGGSS	4157	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSPAPGGS	4184	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSPAPEAAAK	4212	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGS	4142	WMSV_P03359_3mut
GGSGGSGGSGGS	4104	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSSEAAAK	4193	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPAPAPAPAP	4136	MLVAV_P03356_3mut
EAAAKGSSGGG	4198	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGG	4115	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	FFV_O93209_2mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut

【０６６８】

【表Ｄ－４５】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGSPAPGGG	4170	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGEAAAKGGS	4166	MLVMS_P03355_3mut
GGGEAAAK	4147	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPEAAAKGGG	4210	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	BAEVM_P10272_3mutA
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	GALV_P21414_3mutA
EAAAKGGSPAP	4189	FFV_O93209-Pro
EAAAKEAAAK	4126	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGS	4104	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	SFV3L_P27401_2mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	BAEVM_P10272_3mut
GGGGS	4027	MLVMS_P03355_PLV919
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	SFV1_P23074
GGGGSGGGGS	4108	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGGSGGGGS	4108	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSS	4139	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSPAPGGG	4202	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGGSPAP	4183	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGS	4144	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSPAPEAAAK	4188	FOAMV_P14350_2mutA
GGGPAPGGS	4172	SFV3L_P27401_2mut
PAPGSSGGG	4204	MLVCB_P08361_3mut
GSSGGGEAAAK	4195	AVIRE_P03360_3mut
GSSGGG	4146	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSGSS	4120	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGGG	4146	MLVAV_P03356_3mutA
PAPGGGGGS	4174	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSEAAAK	4151	MLVMS_P03355_3mut
PAPGGG	4150	FLV_P10273_3mutA
GGGGSGGGGS	4108	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGGS	4140	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGS	4108	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKGGSGSS	4179	FLV_P10273_3mutA
GSSEAAAKGGS	4178	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPGSSEAAAK	4215	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGSGGGGS	4108	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
PAPGSSEAAAK	4215	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGSSEAAAK	4215	PERV_Q4VFZ2
GGSPAPGGG	4170	AVIRE_P03360_3mut

【０６６９】

【表Ｄ－４６】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGGGS	4138	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGSSGGS	4160	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPAPAPAP	4134	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGGS	4102	WMSV_P03359_3mutA
GGGPAPGGS	4172	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGGG	4137	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAK	4126	SFV3L_P27401_2mut
PAPGSS	4154	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSEAAAK	4151	MLVFF_P26809_3mut
GGSPAPGGG	4170	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGG	4148	WMSV_P03359_3mutA
GSSEAAAKGGS	4178	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGSPAP	4183	FFV_O93209
GGGGGS	4138	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GSSGGG	4146	MLVCB_P08361_3mut
GSSGSS	4120	MLVCB_P08361_3mutA
GGSEAAAKPAP	4187	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGGGGSS	4197	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKPAPGGS	4190	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGSS	4139	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GSS		SFV3L_P27401-Pro_2mutA
PAPAP	4132	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKPAP	4155	BAEVM_P10272
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGGGGG	4117	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGS	4027	MLVMS_P03355_3mut
GSSGGG	4146	FLV_P10273_3mutA
PAPAPAPAPAP	4135	FLV_P10273_3mut
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	WMSV_P03359_3mutA
GSSGGS	4140	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKPAPGGG	4208	MLVMS_P03355_3mut
GSSPAPGGS	4184	WMSV_P03359_3mut
PAPGSSGGG	4204	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGG	4146	AVIRE_P03360_3mutA
PAPGGSGSS	4185	MLVFF_P26809_3mut
PAPGSS	4154	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGSGSS	4159	WMSV_P03359_3mutA

【０６７０】

【表Ｄ－４７】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKGGGGSS	4197	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGGGG	4117	BAEVM_P10272_3mut
PAPEAAAKGSS	4216	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGGEAAAK	4163	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGGGGS	4168	MLVCB_P08361_3mut
PAPGGS	4144	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGG	4114	FLV_P10273_3mutA
EAAAKGGSGSS	4179	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGSSGGS	4160	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGGGG	4118	WMSV_P03359_3mut
GGSGSSGGG	4158	MLVMS_P03355_PLV919
GSSEAAAKGGS	4178	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKPAPGSS	4214	MLVCB_P08361_3mut
GGSPAPGSS	4182	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPGSSGGG	4204	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKPAPGSS	4214	WMSV_P03359_3mut
GGSPAPEAAAK	4188	XMRV6_A1Z651_3mutA
GSSPAP	4153	FLV_P10273_3mutA
GSS		BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKPAPGGS	4190	FLV_P10273_3mutA
GGSGSSPAP	4181	FLV_P10273_3mutA
PAPGSSGGS	4186	MLVMS_P03355_3mut
GSAGSAAGSGEF	4221	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGSEAAAK	4177	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSGGS	4140	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	SFV3L_P27401_2mut
GSSGGS	4140	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSPAPEAAAK	4188	FLV_P10273_3mut
GGSEAAAKGSS	4176	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSPAPEAAAK	4212	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGSSGGG	4158	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGG	4114	AVIRE_P03360_3mutA
GGSEAAAKPAP	4187	WMSV_P03359_3mut
GSSGGSPAP	4183	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGGSEAAAK	4177	MLVMS_P03355_3mut
PAPEAAAKGGS	4192	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGSPAP	4143	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSEAAAK	4141	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	MLVMS_P03355_PLV919

【０６７１】

【表Ｄ－４８】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GSSEAAAK	4151	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGG		AVIRE_P03360
GGSEAAAKGSS	4176	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSEAAAKGSS	4176	MLVMS_P03355_3mut
GGSPAPEAAAK	4188	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGGEAAAK	4163	MLVCB_P08361_3mut
GGSEAAAKPAP	4187	MLVMS_P03355_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	4179	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGEAAAKGGS	4166	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	FLV_P10273_3mutA
GGSPAP	4143	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSSGGS	4160	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAP		MLVCB_P08361_3mut
GGS		SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGGSGGGGS	4108	MLVMS_P03355_3mut
GGGEAAAKGGS	4166	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSS	4154	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGSGGS	4103	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGSGGG	4173	FLV_P10273_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	FLV_P10273_3mut
GGSGSSGGG	4158	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGGSGGS	4103	GALV_P21414_3mutA
GGGEAAAKGGS	4166	WMSV_P03359_3mut
SGSETPGTSESATPES	4220	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGGGGGS	4168	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAKGSSPAP	4213	BAEVM_P10272_3mut
GGGG	4114	MLVCB_P08361_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSSGGSGGG	4161	MLVMS_P03355_PLV919
GGSGSS	4139	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGGS	4142	AVIRE_P03360_3mutA
GSSEAAAKGGS	4178	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKPAPGGG	4208	WMSV_P03359_3mut
PAPGSSGGG	4204	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGSSEAAAK	4193	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSEAAAKPAP	4211	BAEVM_P10272_3mutA
PAPGGGEAAAK	4209	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGGEAAAK	4163	MLVCB_P08361_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	FFV_O93209

【０６７２】

【表Ｄ－４９】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKGGGGGS	4168	GALV_P21414_3mutA
GGSPAPGGG	4170	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSSGSS	4121	FLV_P10273_3mutA
EAAAK	4028	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGGSSGGS	4160	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSSPAP	4181	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	BAEVM_P10272_3mut
GGGPAPGSS	4200	MLVMS_P03355_3mut
GSSPAPGGS	4184	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPAP	4132	FLV_P10273_3mutA
PAPAPAPAP	4134	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGSEAAAK	4165	GALV_P21414_3mutA
GGGGGSGSS	4159	BAEVM_P10272_3mutA
GGGEAAAKGSS	4194	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGGGSPAP	4171	AVIRE_P03360_3mut
GGGGGSEAAAK	4165	SFV3L_P27401_2mutA
GGS		KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGGGGG	4117	PERV_Q4VFZ2_3mut
SGSETPGTSESATPES	4220	SFV3L_P27401_2mutA
EAAAKGGSGGG	4167	MLVMS_P03355_3mut
GGGGS	4027	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGSSGGG	4198	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKPAPGGS	4190	MLVF5_P26810_3mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	SFV3L_P27401_2mutA
GGSPAPGGG	4170	WMSV_P03359_3mutA
GSAGSAAGSGEF	4221	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSSGGS	4160	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGGG	4117	MLVCB_P08361_3mut
GSSEAAAK	4151	WMSV_P03359_3mut
PAPGSS	4154	FLV_P10273_3mutA
GSSGGG	4146	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGG	4150	MLVFF_P26809_3mut
GGGGGSPAP	4171	MLVMS_P03355_3mut
GGSEAAAK	4141	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSGGG	4146	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGSGGSGGS	4104	MLVMS_P03355_3mut
PAPAP	4132	AVIRE_P03360_3mut
GGSEAAAK	4141	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGS	4027	MLVMS_P03355_PLV919
GGGG	4114	BAEVM_P10272_3mutA

【０６７３】

【表Ｄ－５０】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKGGGGSS	4197	MLVCB_P08361_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	GALV_P21414_3mutA
PAPGGGEAAAK	4209	KORV_Q9TTC1
EAAAKGGSPAP	4189	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSSEAAAK	4175	MLVMS_P03355_3mut
GGSPAPEAAAK	4188	FLV_P10273_3mutA
GGGGGGG	4117	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	SFV1_P23074_2mutA
EAAAKGSSGGS	4180	MLVMS_P03355_3mut
GSSEAAAKPAP	4211	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSS	4145	FLV_P10273_3mutA
EAAAKGGSGGG	4167	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGGS	4102	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGSPAP	4171	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	XMRV6_A1Z651_3mut
PAPEAAAKGGS	4192	FLV_P10273_3mutA
GSSGGSEAAAK	4177	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGGSGGG	4167	MLVMS_P03355
GGSGGGPAP	4169	MLVMS_P03355_3mut
GGS		XMRV6_A1Z651_3mut
GGSEAAAKPAP	4187	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGGG	4148	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSSGSS	4122	WMSV_P03359_3mut
GGSGSSPAP	4181	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAK	4147	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSPAPGGS	4184	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSEAAAKGGG	4196	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKPAPGGS	4190	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGGEAAAK	4163	PERV_Q4VFZ2
GGSGSS	4139	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGGEAAAK	4163	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	FLV_P10273_3mut
PAPEAAAKGSS	4216	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGSSGGS	4180	WMSV_P03359_3mutA
GGSGSSEAAAK	4175	MLVCB_P08361_3mut
GGSGSSEAAAK	4175	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSGGSGGG	4161	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGSGGG	4167	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSGGS	4102	AVIRE_P03360_3mutA
GSAGSAAGSGEF	4221	MLVMS_P03355_PLV919

【０６７４】

【表Ｄ－５１】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGSGSS	4139	GALV_P21414_3mutA
GGGG	4114	MLVFF_P26809_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	WMSV_P03359_3mut
SGSETPGTSESATPES	4220	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	FOAMV_P14350_2mutA
GGGEAAAKGGS	4166	FLV_P10273_3mutA
GSSGGSEAAAK	4177	MLVFF_P26809_3mut
EAAAKGGGGSS	4197	MLVAV_P03356_3mut
PAPGGSEAAAK	4191	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAK	4028	XMRV6_A1Z651_3mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGG	4114	MLVCB_P08361_3mutA
GSSGSS	4120	WMSV_P03359_3mutA
GSSGGSPAP	4183	AVIRE_P03360_3mut
GGSGGSGGS	4103	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGGGPAP	4207	FLV_P10273_3mutA
GGGGSGGGGS	4108	MLVCB_P08361_3mut
GGSEAAAKGSS	4176	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	SFV3L_P27401_2mutA
GGSGSSEAAAK	4175	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSEAAAKGGS	4178	FLV_P10273_3mutA
GGSGSS	4139	PERV_Q4VFZ2
GGSGSSEAAAK	4175	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSGSSGSS	4121	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKPAP	4155	FLV_P10273_3mutA
GGSGSSEAAAK	4175	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGGGGG	4117	FLV_P10273_3mut
EAAAKGSS	4152	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGGPAP	4207	MLVCB_P08361_3mut
GSSGSS	4120	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGGGGS	4168	MLVFF_P26809_3mut
GGSGGGEAAAK	4163	FLV_P10273_3mutA
PAPGSS	4154	MLVFF_P26809_3mutA
PAPGSS	4154	BAEVM_P10272_3mutA
GGSPAPGSS	4182	AVIRE_P03360_3mut
GGGGSSEAAAK	4193	MLVMS_P03355_3mut

【０６７５】

【表Ｄ－５２】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GSSGGGGGS	4162	FFV_O93209-Pro
EAAAKGSSPAP	4213	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSPAPGGS	4184	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGG	4116	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGGGGSS	4197	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGSEAAAK	4191	KORV_Q9TTC1_3mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSS	4122	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGSSGGG	4198	MLVMS_P03355_PLV919
GGSEAAAKPAP	4187	AVIRE_P03360_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	WMSV_P03359_3mutA
GGGEAAAKPAP	4205	FLV_P10273_3mutA
PAPGSSGGG	4204	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSGSS	4120	MLVMS_P03355_3mutA_WS
PAPEAAAK	4156	BAEVM_P10272_3mut
GGGPAPGSS	4200	PERV_Q4VFZ2
GSSGGSPAP	4183	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSS	4145	SFV3L_P27401_2mut
PAPEAAAKGSS	4216	SFV3L_P27401_2mut
GGSGGGPAP	4169	XMRV6_A1Z651_3mutA
PAPGGS	4144	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKGGGGGS	4168	AVIRE_P03360_3mut
GSSGGSPAP	4183	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGGGGS	4162	WMSV_P03359_3mut
GGGEAAAKGGS	4166	AVIRE_P03360_3mut
GGGEAAAKGSS	4194	BAEVM_P10272_3mut
PAPEAAAKGSS	4216	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	MLVCB_P08361_3mut
GGSPAPGSS	4182	FLV_P10273_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	PERV_Q4VFZ2
GGGGSSEAAAK	4193	FLV_P10273_3mutA
GGGGSSPAP	4199	FFV_O93209
GSSGGSPAP	4183	MLVMS_P03355_3mut
GGGPAPGSS	4200	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGSSGGS	4186	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGGSPAP	4171	MLVFF_P26809_3mut
SGSETPGTSESATPES	4220	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSPAPGGG	4202	WMSV_P03359_3mut

【０６７６】

【表Ｄ－５３】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPAPAPAPAP	4136	SFV3L_P27401_2mutA
GGGPAPGGS	4172	MLVMS_P03355_3mut
PAPGGSEAAAK	4191	WMSV_P03359_3mut
GGGGSSEAAAK	4193	FFV_O93209-Pro
GGSPAPGGG	4170	FLV_P10273_3mutA
GSSPAPEAAAK	4212	AVIRE_P03360_3mut
GGGEAAAK	4147	FLV_P10273_3mutA
PAPEAAAKGGG	4210	MLVCB_P08361_3mut
GGSPAPGGG	4170	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGGGSS	4157	BAEVM_P10272_3mutA
GSSPAPEAAAK	4212	MLVCB_P08361_3mut
GGSPAPGGG	4170	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGGSGSS	4185	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSPAP	4153	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
SGSETPGTSESATPES	4220	MLVMS_P03355
GSSGSSGSS	4121	MLVAV_P03356_3mutA
PAPGSSGGS	4186	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGS	4144	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPEAAAKGGG	4210	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSGGSGGS	4103	BAEVM_P10272_3mut
PAPGGS	4144	MLVFF_P26809_3mut
GSSGGSPAP	4183	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGGGGS	4162	FLV_P10273_3mutA
GGGGGSPAP	4171	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAKPAPGSS	4214	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKGGSPAP	4189	KORV_Q9TTC1-Pro
GGGPAPEAAAK	4206	MLVMS_P03355_PLV919
GGSEAAAKGSS	4176	MLVMS_P03355
PAPEAAAKGSS	4216	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPEAAAKGGS	4192	WMSV_P03359_3mutA
GSSGGG	4146	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGGGSS	4197	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKGGSPAP	4189	AVIRE_P03360_3mutA
GGGGSSGGS	4160	MLVMS_P03355_PLV919
PAPEAAAKGSS	4216	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGGGGS	4168	BAEVM_P10272_3mut
GSSGGGGGS	4162	MLVMS_P03355_3mut
PAPAPAPAP	4134	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGGSGGSGGS	4104	MLVAV_P03356_3mut
PAPAPAPAP	4134	SFV3L_P27401_2mut

【０６７７】

【表Ｄ－５４】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GSSEAAAKPAP	4211	MLVMS_P03355_3mut
GGSGGGEAAAK	4163	SFV3L_P27401_2mutA
GSSGGSGGG	4161	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGGGSPAP	4171	MLVCB_P08361_3mutA
GGGEAAAKGSS	4194	XMRV6_A1Z651_3mutA
GGGGSSPAP	4199	BAEVM_P10272_3mut
GGSGGG	4137	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSS	4145	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKGSSGGS	4180	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGGGGS	4162	PERV_Q4VFZ2
EAAAKGSSGGS	4180	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAK	4126	MLVAV_P03356_3mut
GSSGGGEAAAK	4195	MLVAV_P03356_3mut
GSSPAPGGG	4202	XMRV6_A1Z651_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGGSGSS	4179	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPEAAAK	4156	BLVJ_P03361
GSSGGG	4146	FFV_O93209-Pro
GGSGGGEAAAK	4163	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAK	4028	FLV_P10273_3mutA
GGGGSSPAP	4199	MLVMS_P03355_3mut
GSS		SFV3L_P27401-Pro_2mut
PAPEAAAKGSS	4216	BAEVM_P10272_3mut
GGGGGSPAP	4171	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGSSGSS	4121	BAEVM_P10272_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	SFV1_P23074_2mut
GGGGSSEAAAK	4193	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	FOAMV_P14350-Pro_2mut
PAPGSSEAAAK	4215	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGGGGSGSS	4159	MLVFF_P26809_3mutA
GGSEAAAKGGG	4164	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPGSSGGG	4204	PERV_Q4VFZ2
GGS		PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	4179	FLV_P10273_3mut
GGGEAAAK	4147	WMSV_P03359_3mutA
GGSEAAAKPAP	4187	MLVBM_Q7SVK7_3mut
SGSETPGTSESATPES	4220	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
EAAAKPAPGGS	4190	AVIRE_P03360_3mut
EAAAKGGGGGS	4168	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA

【０６７８】

【表Ｄ－５５】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGGS	4027	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAKGSS	4176	MLVFF_P26809_3mutA
GGSEAAAKGGG	4164	AVIRE_P03360
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	SFV3L_P27401_2mut
GGSEAAAKGSS	4176	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGEAAAKPAP	4205	MLVCB_P08361_3mut
GGSEAAAK	4141	MLVMS_P03355_PLV919
GGSPAPGSS	4182	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSPAPEAAAK	4212	WMSV_P03359_3mutA
GGSGSS	4139	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGGGGGS	4174	AVIRE_P03360_3mut
PAPEAAAKGSS	4216	FFV_O93209-Pro
GGSGGGEAAAK	4163	WMSV_P03359_3mut
PAPGGG	4150	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGG	4148	FLV_P10273_3mutA
GSSGSSGSSGSS	4122	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGGSGGG	4167	FFV_O93209
GSSPAPGGS	4184	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSPAPGGS	4184	MLVCB_P08361_3mut
GGGPAP	4149	WMSV_P03359_3mutA
GGGPAP	4149	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSPAPGSS	4182	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPAP	4132	MLVMS_P03355_3mut
GGGGGGG	4117	MLVMS_P03355_3mut
GGGGG	4115	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GSAGSAAGSGEF	4221	FOAMV_P14350_2mutA
PAPAP	4132	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSEAAAKGGG	4164	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
PAPAP	4132	WMSV_P03359_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	SFV3L_P27401_2mut
PAPGGS	4144	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGEAAAKPAP	4205	FLV_P10273_3mut
GGGGGS	4138	MLVAV_P03356_3mutA
GSSEAAAKGGG	4196	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGGGSS	4197	GALV_P21414_3mutA
GSSGGS	4140	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGGG	4146	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPAPAP	4133	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGG	4114	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKPAPGGS	4190	MLVFF_P26809_3mut

【０６７９】

【表Ｄ－５６】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGGSGGGGS	4108	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKGGG	4148	MLVCB_P08361_3mut
GGGGSSPAP	4199	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSEAAAKGGG	4196	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGGG	4115	BLVJ_P03361_2mutB
GGGEAAAKGSS	4194	FFV_O93209-Pro
GSSGSSGSS	4121	BAEVM_P10272_3mut
GSSGGSPAP	4183	PERV_Q4VFZ2_3mut
EAAAKGGS	4142	KORV_Q9TTC1_3mut
GGSPAPEAAAK	4188	AVIRE_P03360_3mut
GGSEAAAK	4141	WMSV_P03359_3mut
GSSGGS	4140	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGPAPEAAAK	4206	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPGSS	4154	WMSV_P03359_3mutA
GGSEAAAKGSS	4176	FLV_P10273_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	SFV3L_P27401
GSSEAAAKGGG	4196	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGSGGSGGS	4103	WMSV_P03359_3mut
GGGGGSGSS	4159	KORV_Q9TTC1-Pro
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKGGG	4148	PERV_Q4VFZ2
GGSEAAAKGGG	4164	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GSSGGSGGG	4161	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGGS	4138	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSAGSAAGSGEF	4221	PERV_Q4VFZ2
PAPEAAAKGSS	4216	BAEVM_P10272_3mutA
GSSPAPGGG	4202	MLVCB_P08361_3mut
GGGGSSPAP	4199	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGGSGGG	4173	MLVFF_P26809_3mut
GSSPAP	4153	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPGSS	4154	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGSGGGGSS	4157	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGGS	4140	WMSV_P03359_3mutA
EAAAKGGGGS	4168	PERV_Q4VFZ2
GGGGG	4115	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGSS	4152	MLVMS_P03355_PLV919
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	FLV_P10273_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GSAGSAAGSGEF	4221	SFV3L_P27401_2mutA

【０６８０】

【表Ｄ－５７】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGPAPGGS	4172	FLV_P10273_3mutA
GGSEAAAKGGG	4164	MLVCB_P08361_3mut
PAPGGGEAAAK	4209	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKPAPGSS	4214	FOAMV_P14350_2mut
GGSEAAAK	4141	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGSS	4139	AVIRE_P03360
GGSPAPEAAAK	4188	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGS	4027	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSPAPGGG	4170	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKPAPGGS	4190	PERV_Q4VFZ2
GSSPAP	4153	BAEVM_P10272_3mut
GGSGSSGGG	4158	FLV_P10273_3mutA
PAPGGG	4150	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGSEAAAK	4177	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSEAAAK	4141	MLVMS_P03355_3mut
GGGPAPGGS	4172	MLVFF_P26809_3mut
GSAGSAAGSGEF	4221	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKPAPGGS	4190	SFVCP_Q87040
PAPGGG	4150	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSPAPEAAAK	4212	MLVBM_Q7SVK7
PAPEAAAK	4156	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPGGGGGS	4174	AVIRE_P03360_3mutA
GGSEAAAKPAP	4187	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKGSS	4152	WMSV_P03359_3mutA
GGGEAAAK	4147	MLVFF_P26809_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	MLVMS_P03355_3mut
PAPEAAAKGGG	4210	BAEVM_P10272_3mut
PAPAPAP	4133	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKPAPGGS	4190	BAEVM_P10272_3mut
GGGGSGGGGS	4108	FLV_P10273_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	KORV_Q9TTC1_3mut
EAAAK	4028	FLV_P10273_3mut
PAPAPAP	4133	WMSV_P03359_3mut
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	FFV_O93209-Pro
GGSPAPEAAAK	4188	MLVMS_P03355_3mut
GGSGSSGGG	4158	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSPAPGSS	4182	PERV_Q4VFZ2_3mut
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKGGGPAP	4207	BAEVM_P10272_3mutA
GSSGGSEAAAK	4177	MLVMS_P03355_3mutA_WS

【０６８１】

【表Ｄ－５８】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
SGSETPGTSESATPES	4220	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGSSGSS	4121	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSSPAPGGG	4202	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSGGGEAAAK	4195	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGGGGSS	4157	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGGEAAAK	4195	MLVCB_P08361_3mut
GSSEAAAKGGG	4196	MLVCB_P08361_3mut
GGSGGGGSS	4157	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGSSPAP	4181	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSPAP	4153	MLVMS_P03355_3mut
GGGGSSEAAAK	4193	AVIRE_P03360
GGS		WMSV_P03359_3mut
EAAAKEAAAK	4126	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPAPAPAP	4134	MLVAV_P03356_3mut
GGSEAAAKGGG	4164	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPGGG	4150	MLVAV_P03356_3mut
EAAAKGSS	4152	BAEVM_P10272_3mut
GGGGSGGGGS	4108	WMSV_P03359_3mutA
GGSGGSGGS	4103	SFV3L_P27401_2mut
EAAAK	4028	MLVCB_P08361_3mut
GGGGSSGGS	4160	WMSV_P03359_3mutA
GGGPAPEAAAK	4206	MLVAV_P03356_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	FFV_O93209
GSSEAAAKGGG	4196	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGPAPGGS	4172	FLV_P10273_3mut
GGSEAAAKGGG	4164	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGGGGS	4168	XMRV6_A1Z651_3mutA
EAAAKGGSGGG	4167	FLV_P10273_3mutA
GGSEAAAKGGG	4164	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGS	4027	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGS	4140	MLVMS_P03355_3mut
GSSGSS	4120	MLVAV_P03356_3mutA
GGSPAPGGG	4170	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGGGGGS	4162	MLVF5_P26810_3mut
PAPAPAPAP	4134	MLVCB_P08361_3mut
PAPAP	4132	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGSSGGS	4186	KORV_Q9TTC1_3mut
PAPGSSGGG	4204	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGEAAAK	4147	MLVMS_P03355_PLV919

【０６８２】

【表Ｄ－５９】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSGGG	4137	FLV_P10273_3mut
PAPEAAAKGGG	4210	MLVFF_P26809_3mut
PAP		PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGSGSS	4185	FFV_O93209_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	FFV_O93209-Pro_2mut
GSSGSSGSSGSS	4122	FFV_O93209-Pro
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	FLV_P10273_3mutA
GGGEAAAKPAP	4205	PERV_Q4VFZ2
PAPGSSGGG	4204	SFV3L_P27401_2mut
PAPGGSGSS	4185	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPAPAPAPAP	4135	GALV_P21414_3mutA
GGSGGGEAAAK	4163	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSPAP	4153	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKPAP	4155	MLVF5_P26810_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSGGG	4137	WMSV_P03359_3mut
GGSGGSGGS	4103	KORV_Q9TTC1_3mut
GGGGGGGG	4118	MLVFF_P26809_3mut
GGGGSS	4145	MLVAV_P03356_3mut
GSSGGGGGS	4162	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	GALV_P21414_3mutA
GSSGSSGSS	4121	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSPAPGGS	4184	MLVFF_P26809_3mut
PAPAPAP	4133	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	WMSV_P03359_3mutA
PAPAPAPAP	4134	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGSS	4145	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	SFV3L_P27401_2mutA
PAPGGS	4144	WMSV_P03359_3mutA
GSSEAAAKGGG	4196	PERV_Q4VFZ2
GSSGGSPAP	4183	MLVMS_P03355_PLV919
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	SFV3L_P27401_2mutA
GGSGSSGGG	4158	MLVCB_P08361_3mut
GGGPAPGSS	4200	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSEAAAKGGS	4178	WMSV_P03359_3mut
GSSEAAAKGGG	4196	MLVAV_P03356_3mut
GGSGGGPAP	4169	FFV_O93209-Pro
GSSGSS	4120	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGGGGS	4174	GALV_P21414_3mutA

【０６８３】

【表Ｄ－６０】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKPAPGGS	4190	MLVAV_P03356_3mut
GSSGSS	4120	MLVMS_P03355_3mut
EAAAKPAPGGS	4190	FFV_O93209-Pro
GGGPAPEAAAK	4206	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GSSEAAAKGGG	4196	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGEAAAKGGS	4166	BAEVM_P10272_3mut
GSSGSS	4120	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	SFV1_P23074
PAPGSSGGS	4186	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPAPAPAPAP	4135	MLVMS_P03355
GSSEAAAK	4151	SFV3L_P27401_2mut
PAP		PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSEAAAKGGG	4164	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSGGGPAP	4169	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GSSGSS	4120	MLVMS_P03355_3mut
GGSEAAAK	4141	MLVMS_P03355
GSSEAAAKGGS	4178	MLVMS_P03355_PLV919
PAPGGGGGS	4174	MLVFF_P26809_3mut
GSSGGG	4146	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGGS	4140	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
PAPGGG	4150	BAEVM_P10272_3mut
PAPGSSGGG	4204	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSEAAAK	4141	SFV3L_P27401_2mut
GSSPAPEAAAK	4212	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GSSGGSPAP	4183	BAEVM_P10272_3mut
GGSPAPGSS	4182	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGSGGSGGS	4103	PERV_Q4VFZ2
GGSGGGPAP	4169	FLV_P10273_3mut
GGGPAPEAAAK	4206	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGS	4027	FLV_P10273_3mutA
GSSGGSGGG	4161	XMRV6_A1Z651_3mut
EAAAKGGGGSS	4197	PERV_Q4VFZ2
GGSGSSGGG	4158	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSGGSGGS	4103	MLVFF_P26809_3mut
GGGPAPEAAAK	4206	FLV_P10273_3mut
GSSGGGEAAAK	4195	MLVMS_P03355_3mut
GGG		SFV3L_P27401_2mut
GSAGSAAGSGEF	4221	WMSV_P03359_3mut
GSSGGGPAP	4201	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSS	4145	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut

【０６８４】

【表Ｄ－６１】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGGSSEAAAK	4193	KORV_Q9TTC1
PAPGGSGGG	4173	SFV3L_P27401_2mut
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	FFV_O93209
GSSGGSPAP	4183	MLVMS_P03355_3mut
GGSEAAAK	4141	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GGGGSGGGGS	4108	BAEVM_P10272_3mut
GSSEAAAKGGG	4196	AVIRE_P03360_3mut
EAAAKPAPGGG	4208	FLV_P10273_3mut
EAAAKGGSPAP	4189	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSEAAAKPAP	4211	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGPAPGGS	4172	MLVCB_P08361_3mut
GGG		SFV3L_P27401_2mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	SFV3L_P27401_2mutA
GGSGSSGGG	4158	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSAGSAAGSGEF	4221	BAEVM_P10272_3mut
GGGEAAAK	4147	FOAMV_P14350_2mutA
PAPEAAAKGGS	4192	WMSV_P03359_3mut
PAPAPAPAPAP	4136	MLVF5_P26810_3mutA
GGSGGGGSS	4157	FLV_P10273_3mutA
PAPGSSGGS	4186	BAEVM_P10272_3mut
PAPEAAAK	4156	WMSV_P03359_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	FFV_O93209-Pro_2mut
GGGGGSGSS	4159	FFV_O93209-Pro
GGGGGGGG	4118	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGGGG	4116	FLV_P10273_3mut
GSSGGSGGG	4161	MLVAV_P03356_3mutA
GGGGSS	4145	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSGGGPAP	4169	FOAMV_P14350_2mut
GSSGSS	4120	AVIRE_P03360_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKEAAAK	4126	BAEVM_P10272_3mut
GSSPAPEAAAK	4212	GALV_P21414_3mutA
GGSEAAAKPAP	4187	SFV3L_P27401_2mutA
GGSGGGEAAAK	4163	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKGSSPAP	4213	FOAMV_P14350_2mut
GGSGSSEAAAK	4175	SFV3L_P27401_2mut
GGG		PERV_Q4VFZ2
GGGGGSGSS	4159	FOAMV_P14350_2mut
GGSGGGEAAAK	4163	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GSSGGSGGG	4161	AVIRE_P03360_3mutA

【０６８５】

【表Ｄ－６２】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKPAPGGG	4208	SFV3L_P27401_2mutA
PAPGGSGGG	4173	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPAPAP	4133	WMSV_P03359_3mutA
GSSEAAAKPAP	4211	SFV1_P23074
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	SRV2_P51517
GSSGGSGGG	4161	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	FFV_O93209
GSSGGGPAP	4201	WMSV_P03359_3mut
PAPAPAPAPAPAP	4136	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGGGSPAP	4171	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGSS	4154	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
PAPEAAAKGGS	4192	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGGGSSPAP	4199	MLVMS_P03355_3mut
GGSEAAAK	4141	FFV_O93209-Pro
EAAAKPAPGGS	4190	AVIRE_P03360_3mutA
PAPGSS	4154	WMSV_P03359_3mut
PAPGSSGGG	4204	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	SFV3L_P27401_2mut
GGS		MLVRD_P11227_3mut
GGGGS	4027	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGSGGGGSS	4157	KORV_Q9TTC1
GGSGGG	4137	MLVMS_P03355_3mutA_WS
GGGEAAAKPAP	4205	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	FLV_P10273
PAPGGSGGG	4173	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	HTL1L_P0C211
GGGEAAAKPAP	4205	WMSV_P03359
GSSGGSPAP	4183	FFV_O93209-Pro
PAPAPAPAPAP	4135	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSGGSEAAAK	4177	SFV3L_P27401_2mutA
GGSPAPGSS	4182	SFV3L_P27401_2mut
GGSGGSGGS	4103	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
PAPEAAAKGSS	4216	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
EAAAKGGS	4142	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGGGSSPAP	4199	FFV_O93209-Pro
EAAAK	4028	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKGGGGSS	4197	BAEVM_P10272_3mut
GGGGGSEAAAK	4165	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGG	4114	PERV_Q4VFZ2

【０６８６】

【表Ｄ－６３】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGGGSEAAAK	4165	FLV_P10273_3mut
EAAAKGGGPAP	4207	KORV_Q9TTC1-Pro
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	FFV_O93209_2mutA
GSSGGSGGG	4161	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	GALV_P21414_3mutA
GGSGGGEAAAK	4163	AVIRE_P03360_3mutA
PAPEAAAKGGG	4210	SFV3L_P27401_2mut
GGGGSGGGGS	4108	AVIRE_P03360
GSSGGGEAAAK	4195	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGG	4115	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGSS	4139	KORV_Q9TTC1_3mut
PAPAPAPAPAP	4136	FOAMV_P14350_2mut
GGSEAAAKPAP	4187	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGGGG	4116	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSGGGEAAAK	4195	MLVBM_Q7SVK7
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	MLVAV_P03356
GGSPAPGSS	4182	BAEVM_P10272_3mut
GGGGSSPAP	4199	BAEVM_P10272
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	SFV3L_P27401_2mut
GGGGGGGG	4118	GALV_P21414_3mutA
PAPAP	4132	MLVAV_P03356_3mut
GGGEAAAK	4147	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSPAPGGG	4202	FFV_O93209_2mut
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	BAEVM_P10272
GGGGGS	4138	MLVF5_P26810_3mutA
PAPGGGGSS	4203	FLV_P10273_3mutA
GGGEAAAK	4147	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPEAAAKGGG	4210	WMSV_P03359_3mut
GSSEAAAK	4151	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKEAAAK	4126	AVIRE_P03360
EAAAKGGGGS	4168	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGEAAAKGGS	4166	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
PAPAPAPAPAP	4135	MLVF5_P26810_3mut
PAPGSSEAAAK	4215	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	BAEVM_P10272_3mutA
GGSPAPGSS	4182	MLVMS_P03355
PAPGSSGGS	4186	FLV_P10273_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	FOAMV_P14350-Pro_2mut
EAAAKGGG	4148	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGGSGGG	4167	MLVBM_Q7SVK7_3mut

【０６８７】

【表Ｄ－６４】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGGGS	4138	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGGSGGG	4173	WMSV_P03359_3mut
GGGPAPGGS	4172	KORV_Q9TTC1_3mutA
GSS		FFV_O93209
GGSGGSGGS	4103	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGGGS	4027	GALV_P21414_3mutA
GGGG	4114	MLVF5_P26810_3mut
GGSEAAAKPAP	4187	FFV_O93209-Pro_2mut
PAPAPAPAP	4134	FFV_O93209-Pro
PAP		MLVF5_P26810_3mut
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	FFV_O93209_2mut
EAAAKGSS	4152	MLVCB_P08361_3mut
EAAAKGGG	4148	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPEAAAKGGG	4210	FFV_O93209_2mut
GSSGGGEAAAK	4195	SFV1_P23074-Pro_2mut
PAPGGGEAAAK	4209	GALV_P21414_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
GSSGGG	4146	FOAMV_P14350_2mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	SFV3L_P27401_2mutA
GGSGSS	4139	AVIRE_P03360_3mut
GGSGSSEAAAK	4175	MMTVB_P03365_WS
PAPAPAP	4133	MLVAV_P03356_3mutA
GSSGGSPAP	4183	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGSPAP	4143	AVIRE_P03360
GGSGGGPAP	4169	FFV_O93209
GSSEAAAK	4151	PERV_Q4VFZ2
GSSGGGPAP	4201	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGSSEAAAK	4193	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSEAAAKPAP	4187	SFVCP_Q87040
GGSGGGPAP	4169	FOAMV_P14350_2mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	BLVJ_P03361_2mutB
GGGGSSPAP	4199	SFV3L_P27401_2mutA
EAAAKGGS	4142	MLVF5_P26810_3mut
GGSEAAAKGSS	4176	MLVCB_P08361_3mut
GGGGSSEAAAK	4193	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKGGSGGG	4167	FOAMV_P14350_2mut
GGSGGS	4102	FLV_P10273_3mut
EAAAKGGG	4148	FFV_O93209-Pro
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	SFV3L_P27401
GSSGGGPAP	4201	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS

【０６８８】

【表Ｄ－６５】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPGGSEAAAK	4191	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSPAP	4143	KORV_Q9TTC1
EAAAKPAPGSS	4214	KORV_Q9TTC1_3mutA
SGSETPGTSESATPES	4220	SFV1_P23074
GSSPAP	4153	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSPAPGGG	4202	SFV3L_P27401_2mut
GGGEAAAKGSS	4194	SFV1_P23074_2mut
GGGPAPGGS	4172	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGGG	4148	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
GSSGGG	4146	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGSPAPEAAAK	4188	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGSSPAP	4213	FFV_O93209
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	SFV1_P23074_2mut
EAAAKGGSPAP	4189	FOAMV_P14350_2mut
GGSGGS	4102	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
EAAAKGSSGGS	4180	GALV_P21414
GSSGGGPAP	4201	MLVAV_P03356
PAPEAAAKGGS	4192	FOAMV_P14350_2mut
EAAAKPAPGGG	4208	AVIRE_P03360_3mut
GGSPAP	4143	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGSGGGGS	4108	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGSS	4145	AVIRE_P03360_3mutA
GGSPAPGGG	4170	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKPAPGSS	4214	SFV3L_P27401
EAAAKPAP	4155	FOAMV_P14350-Pro_2mut
PAPEAAAKGSS	4216	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
EAAAKGGSGSS	4179	SFV3L_P27401_2mutA
GGGEAAAKGSS	4194	GALV_P21414_3mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPGGSGSS	4185	FFV_O93209-Pro_2mutA
GGSEAAAKPAP	4187	GALV_P21414_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	FFV_O93209-Pro
GSSGGSEAAAK	4177	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGS		GALV_P21414_3mutA
PAPGGSEAAAK	4191	MLVMS_P03355
PAPEAAAKGGS	4192	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGSSPAP	4181	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSPAP	4153	WMSV_P03359_3mut
GGGEAAAK	4147	MMTVB_P03365

【０６８９】

【表Ｄ－６６】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGGSS	4145	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSPAPGSS	4182	SFV3L_P27401-Pro_2mut
PAPGGS	4144	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKGSSPAP	4213	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGGSSGGS	4160	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPAPAPAPAP	4136	SFV1_P23074
GGSEAAAKGGG	4164	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGSGGS	4102	SFV1_P23074_2mut
GSSGGGGGS	4162	MLVF5_P26810_3mutA
EAAAKGGGPAP	4207	SFV3L_P27401
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
GGGPAPGSS	4200	SFV3L_P27401_2mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MMTVB_P03365_WS
PAPGSSGGS	4186	KORV_Q9TTC1-Pro_3mutA
PAPGSSEAAAK	4215	FOAMV_P14350-Pro_2mut
GSSPAPEAAAK	4212	BAEVM_P10272_3mut
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	FFV_O93209-Pro
GGSPAP	4143	PERV_Q4VFZ2
GGSGSSEAAAK	4175	XMRV6_A1Z651_3mut
GGSEAAAKGGG	4164	GALV_P21414_3mutA
PAPGGGGSS	4203	AVIRE_P03360_3mutA
GGSGGSGGSGGS	4104	PERV_Q4VFZ2
GGGGSSGGS	4160	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	BAEVM_P10272_3mutA
GGGPAP	4149	MLVAV_P03356_3mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	FFV_O93209_2mut
GSSEAAAK	4151	FFV_O93209
GGSPAPEAAAK	4188	FOAMV_P14350_2mut
GGGGGSEAAAK	4165	FOAMV_P14350_2mut
GSSPAPGGS	4184	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSS		SFVCP_Q87040_2mut
EAAAKPAP	4155	FOAMV_P14350-Pro
EAAAKGGG	4148	SFV3L_P27401_2mut
GGGEAAAK	4147	AVIRE_P03360_3mutA
PAPGSSGGG	4204	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGSPAP	4189	SFV3L_P27401
GSSGGSGGG	4161	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GSSGGGEAAAK	4195	GALV_P21414_3mutA
GGGPAPGSS	4200	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS

【０６９０】

【表Ｄ－６７】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPGGGEAAAK	4209	FFV_O93209-Pro_2mut
GSSGSSGSSGSS	4122	SFV1_P23074_2mut
GGSEAAAK	4141	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGEAAAKPAP	4205	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKGGGPAP	4207	SFV3L_P27401_2mut
GGGGSSPAP	4199	FLV_P10273_3mut
EAAAKPAPGSS	4214	FFV_O93209_2mut
GGGGSSPAP	4199	SFV3L_P27401_2mut
GSSGSS	4120	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	BLVJ_P03361_2mut
GGGGSSGGS	4160	GALV_P21414_3mutA
EAAAKGGSGSS	4179	FFV_O93209-Pro
EAAAKPAP	4155	PERV_Q4VFZ2
GSSGGGEAAAK	4195	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPGGSGGG	4173	BAEVM_P10272
EAAAKGGGPAP	4207	MLVF5_P26810
GSSGSSGSS	4121	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSSGGS	4140	AVIRE_P03360_3mutA
GGSEAAAKGGG	4164	FOAMV_P14350_2mut
EAAAKGGS	4142	MLVF5_P26810_3mutA
GGSGSSGGG	4158	WMSV_P03359_3mut
EAAAK	4028	SFV1_P23074_2mut
GSSGGSPAP	4183	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGGSSGGS	4160	KORV_Q9TTC1_3mut
PAPGGSGGG	4173	FFV_O93209-Pro_2mut
GGGPAPGGS	4172	SFV3L_P27401_2mutA
GSSPAPEAAAK	4212	FLV_P10273_3mut
GGSGSSPAP	4181	SFV3L_P27401_2mut
GSSEAAAKGGS	4178	SFV3L_P27401_2mut
PAPGGG	4150	SFV3L_P27401_2mutA
SGSETPGTSESATPES	4220	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGGS	4027	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GSSGGGEAAAK	4195	WMSV_P03359
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MLVF5_P26810_3mutA
GSSEAAAKPAP	4211	FFV_O93209
GGGGGG	4116	SFV1_P23074_2mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKPAPGSS	4214	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGSGSSEAAAK	4175	SFV3L_P27401_2mutA
GGSEAAAK	4141	MLVMS_P03355_3mut

【０６９１】

【表Ｄ－６８】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGSPAPEAAAK	4188	SFV3L_P27401_2mut
GGGPAPGSS	4200	SFV1_P23074
GGGGGSEAAAK	4165	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
EAAAKPAPGSS	4214	KORV_Q9TTC1-Pro
GSSGSSGSSGSS	4122	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKPAP	4155	SFV3L_P27401_2mut
GGGEAAAK	4147	PERV_Q4VFZ2_3mut
GGSGGS	4102	SFV3L_P27401_2mutA
EAAAKGSSGGS	4180	MMTVB_P03365
SGSETPGTSESATPES	4220	SFV3L_P27401
EAAAKGSSGGG	4198	PERV_Q4VFZ2
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	MMTVB_P03365
GGSGGGPAP	4169	KORV_Q9TTC1_3mutA
PAPAPAPAP	4134	SFV3L_P27401
GGGEAAAKGGS	4166	SFV1_P23074_2mut
GSSGGSGGG	4161	PERV_Q4VFZ2_3mut
PAPEAAAKGGS	4192	FOAMV_P14350_2mutA
GGGEAAAKGSS	4194	SFV3L_P27401_2mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	MLVBM_Q7SVK7
PAPGSSGGG	4204	FLV_P10273
GGSGSSGGG	4158	FFV_O93209
EAAAKPAPGSS	4214	MLVBM_Q7SVK7
GSSEAAAKGGG	4196	SFV3L_P27401_2mutA
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	MLVF5_P26810
GGSEAAAKPAP	4187	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
EAAAKGGSPAP	4189	SFV3L_P27401_2mutA
EAAAKGGGGGS	4168	SFV3L_P27401_2mut
GSSPAPEAAAK	4212	SFV3L_P27401_2mutA
PAPAP	4132	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPGGSEAAAK	4191	KORV_Q9TTC1-Pro
GGSGSS	4139	MLVF5_P26810_3mutA
GGSEAAAKPAP	4187	FFV_O93209_2mut
GSS		MLVMS_P03355
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	SFV3L_P27401-Pro
PAPGGGEAAAK	4209	SFV3L_P27401_2mut
PAPGGGGGS	4174	SFV3L_P27401-Pro_2mut
PAPGGSGSS	4185	BAEVM_P10272_3mut
GSSGGGEAAAK	4195	FFV_O93209
GGSEAAAKPAP	4187	SFV1_P23074_2mut
GGGGG	4115	FLV_P10273_3mut

【０６９２】

【表Ｄ－６９】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGEAAAKGSS	4194	SFV3L_P27401
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	SFV1_P23074-Pro
SGSETPGTSESATPES	4220	AVIRE_P03360
PAPGSSGGG	4204	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GGGGSSPAP	4199	HTL3P_Q4U0X6_2mut
GGGEAAAK	4147	SFV1_P23074
GGSGGG	4137	AVIRE_P03360
EAAAKGSSGGG	4198	SFV3L_P27401_2mutA
GSSPAPEAAAK	4212	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
GGGPAPGSS	4200	WMSV_P03359
EAAAKGSSGGG	4198	MLVMS_P03355
GGGGGSEAAAK	4165	MLVMS_P03355
EAAAKPAPGGS	4190	SFV3L_P27401
EAAAKGSSPAP	4213	SFV3L_P27401
GGGGGGG	4117	FOAMV_P14350_2mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	SFV3L_P27401
GSSPAPGGS	4184	FFV_O93209_2mutA
GGGGSSEAAAK	4193	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGSEAAAKGSS	4176	GALV_P21414_3mutA
GGSEAAAKGSS	4176	BAEVM_P10272_3mutA
EAAAKPAPGGG	4208	MLVCB_P08361
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	SFV1_P23074-Pro
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	FOAMV_P14350_2mut
GSSPAPGGS	4184	MLVMS_P03355_PLV919
GGGGSGGGGS	4108	FFV_O93209-Pro
GSSGGSPAP	4183	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGSGGS	4102	GALV_P21414_3mutA
PAPGSSEAAAK	4215	WMSV_P03359
PAPGGGGSS	4203	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSSGGS	4160	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GGGGSGGGGS	4108	FFV_O93209_2mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	XMRV6_A1Z651
GGSGSSEAAAK	4175	SFV1_P23074_2mut
GGSGGGGSS	4157	GALV_P21414_3mutA
GGSEAAAKPAP	4187	MLVBM_Q7SVK7
EAAAKGGSPAP	4189	SFV1_P23074_2mutA
PAPAPAPAP	4134	FFV_O93209
GSSGGSPAP	4183	MMTVB_P03365-Pro
GGGGGSPAP	4171	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGGGPAP	4207	PERV_Q4VFZ2

【０６９３】

【表Ｄ－７０】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GSSGGSPAP	4183	BAEVM_P10272
GGGGG	4115	FFV_O93209
GGGGGS	4138	FLV_P10273_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	FOAMV_P14350
PAPGGG	4150	MLVCB_P08361_3mut
GSSGGSEAAAK	4177	FOAMV_P14350_2mutA
GGSPAPGGG	4170	FLV_P10273_3mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GGSPAPEAAAK	4188	SFV3L_P27401
PAPGGGGSS	4203	HTL3P_Q4U0X6_2mutB
GGGGSSEAAAK	4193	MMTVB_P03365_2mut_WS
PAPGGS	4144	MLVRD_P11227_3mut
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	MMTVB_P03365
GSAGSAAGSGEF	4221	AVIRE_P03360
GSSGGS	4140	BAEVM_P10272_3mutA
GGSGGGGSS	4157	MMTVB_P03365
GGSGGGGSS	4157	WMSV_P03359
PAPEAAAKGSS	4216	SFV1_P23074
GSSGSSGSSGSS	4122	SFV1_P23074-Pro_2mutA
PAPAPAPAPAP	4136	SFV3L_P27401
PAPGSSGGG	4204	FLV_P10273_3mut
GGSGSSPAP	4181	MLVMS_P03355
GGSGGGPAP	4169	FOAMV_P14350
PAPGGGGGS	4174	KORV_Q9TTC1_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	GALV_P21414_3mutA
GGSGSSPAP	4181	MLVBM_Q7SVK7_3mut
EAAAKGSS	4152	SFV3L_P27401_2mut
GGGGGSEAAAK	4165	WMSV_P03359
GGGGGGGG	4118	SFV1_P23074-Pro
EAAAKEAAAK	4126	MLVBM_Q7SVK7
GGGEAAAKGGS	4166	MLVBM_Q7SVK7
EAAAKGGSPAP	4189	SFV3L_P27401_2mut
GSSEAAAK	4151	XMRV6_A1Z651
PAPGGGEAAAK	4209	MMTVB_P03365_WS
GGSPAP	4143	GALV_P21414_3mutA
GSSPAPGGG	4202	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
GGSGSSPAP	4181	SFV1_P23074_2mutA
GGS		HTL32_Q0R5R2_2mut
GGSGGGGSS	4157	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	SFVCP_Q87040_2mutA

【０６９４】

【表Ｄ－７１】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKGGGPAP	4207	FOAMV_P14350_2mut
GSSGGGEAAAK	4195	MMTVB_P03365
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	MLVBM_Q7SVK7_3mutA_WS
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	MMTVB_P03365_WS
EAAAKEAAAK	4126	FOAMV_P14350-Pro_2mut
GSSPAPEAAAK	4212	FOAMV_P14350_2mutA
EAAAKPAPGGS	4190	GALV_P21414_3mutA
GSSGGSPAP	4183	KORV_Q9TTC1-Pro_3mut
GGGPAPEAAAK	4206	MLVAV_P03356
GGGEAAAKPAP	4205	SFV1_P23074-Pro_2mut
GGGGGSEAAAK	4165	SFV3L_P27401_2mut
GGGPAPGSS	4200	SFV3L_P27401_2mut
GGSEAAAKPAP	4187	AVIRE_P03360
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	SFV1_P23074-Pro_2mut
EAAAKGSSGGS	4180	FOAMV_P14350_2mutA
GGGGGG	4116	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSSPAPGGS	4184	PERV_Q4VFZ2
GGSGSSPAP	4181	GALV_P21414_3mutA
GGGPAPEAAAK	4206	SFV3L_P27401
GGSGGGEAAAK	4163	WMSV_P03359
GSAGSAAGSGEF	4221	SFV1_P23074_2mut
GSSGGGEAAAK	4195	MLVMS_P03355
GGG		MMTVB_P03365-Pro
PAPGSSGGS	4186	FOAMV_P14350_2mut
GGGGSSPAP	4199	FFV_O93209_2mut
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	MMTVB_P03365_WS
GGGGGGG	4117	XMRV6_A1Z651
PAPAPAPAPAP	4135	FOAMV_P14350
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	MMTVB_P03365_2mut_WS
GGSGGGPAP	4169	SFV3L_P27401_2mut
GGGGGG	4116	SFV1_P23074-Pro
EAAAKPAPGSS	4214	SFV3L_P27401_2mut
GGGGSSGGS	4160	HTL3P_Q4U0X6_2mut
PAPGSSEAAAK	4215	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSSPAP	4199	FOAMV_P14350-Pro_2mut
PAPGSSGGS	4186	MMTVB_P03365
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	SRV2_P51517
PAPAPAP	4133	MMTVB_P03365_2mut_WS
PAPGGGGGS	4174	MMTVB_P03365_2mutB
GGGGSS	4145	SFV1_P23074-Pro_2mutA

【０６９５】

【表Ｄ－７２】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	SFV3L_P27401-Pro
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	MMTVB_P03365-Pro
GGGGGGG	4117	SFV3L_P27401_2mut
PAPGGGEAAAK	4209	SFV3L_P27401
PAPGSS	4154	FOAMV_P14350_2mutA
GGGGSGGGGS	4108	SFVCP_Q87040_2mutA
GSSGGSGGG	4161	XMRV6_A1Z651
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MLVBM_Q7SVK7
GSSEAAAKGGG	4196	FFV_O93209-Pro_2mut
GGSEAAAKPAP	4187	SFV3L_P27401-Pro
GSSGGSGGG	4161	SFV1_P23074_2mut
EAAAKGGGGSS	4197	FOAMV_P14350_2mutA
GGGGGG	4116	SFV3L_P27401_2mut
GGGGG	4115	MLVBM_Q7SVK7_3mut
PAPEAAAKGGG	4210	SFV3L_P27401
EAAAKGGSPAP	4189	KORV_Q9TTC1_3mutA
GGGEAAAKPAP	4205	SFV1_P23074_2mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	KORV_Q9TTC1-Pro
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	SFVCP_Q87040
PAPGSSEAAAK	4215	MLVBM_Q7SVK7
GSSGSSGSS	4121	FFV_O93209-Pro_2mut
GSSGGGPAP	4201	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGGPAPEAAAK	4206	WMSV_P03359_3mut
GGGEAAAK	4147	MMTVB_P03365-Pro
GSSGSSGSSGSS	4122	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
PAPAPAPAPAP	4135	FFV_O93209-Pro
GGSPAPEAAAK	4188	FFV_O93209-Pro_2mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	GALV_P21414
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	FOAMV_P14350
GGGPAPEAAAK	4206	MMTVB_P03365-Pro
PAPGGSGGG	4173	MLVF5_P26810_3mutA
PAPGGSGGG	4173	FLV_P10273_3mut
GGGEAAAKGGS	4166	SFV3L_P27401
GSAGSAAGSGEF	4221	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSSPAPGGG	4202	MPMV_P07572_2mutB
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	FOAMV_P14350
GGSGGGGSS	4157	BLVJ_P03361_2mut
PAPEAAAKGSS	4216	SFV1_P23074-Pro
GGG		FFV_O93209
EAAAKGGGGSS	4197	SFV1_P23074_2mut

【０６９６】

【表Ｄ－７３】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	SRV2_P51517
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MMTVB_P03365
GGGEAAAKGGS	4166	MMTVB_P03365_WS
GSSGSS	4120	SFV1_P23074
GSSGGGGGS	4162	SFV3L_P27401
GGGGSSEAAAK	4193	SFV1_P23074
EAAAKGSSGGS	4180	HTL1A_P03362_2mutB
GSSEAAAKGGS	4178	GALV_P21414_3mutA
EAAAKGSSPAP	4213	SFV1_P23074
EAAAKPAPGSS	4214	SFV3L_P27401_2mutA
PAPGSSGGG	4204	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	SFV3L_P27401-Pro
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	MMTVB_P03365_WS
GGGGSSEAAAK	4193	MLVF5_P26810_3mutA
EAAAKGGSPAP	4189	GALV_P21414
PAPEAAAKGSS	4216	MMTVB_P03365_WS
GSSGGGGGS	4162	SFVCP_Q87040_2mut
GGGGSSPAP	4199	SFV1_P23074
EAAAKGGGGSS	4197	XMRV6_A1Z651
PAPAPAPAP	4134	MMTVB_P03365
GGSEAAAKGSS	4176	SFV3L_P27401_2mutA
GSSPAPGGG	4202	MMTVB_P03365_WS
GGGGGG	4116	SFV3L_P27401-Pro
GGSGGSGGS	4103	FOAMV_P14350-Pro_2mut
PAPAPAPAPAP	4136	WMSV_P03359
GSSPAP	4153	MLVBM_Q7SVK7
GGGGGSGSS	4159	MMTVB_P03365_2mut_WS
EAAAKGSSGGS	4180	MMTVB_P03365_2mutB_WS
EAAAK	4028	FFV_O93209_2mutA
PAPEAAAK	4156	SFV1_P23074-Pro
EAAAKGGSGSS	4179	SFV3L_P27401
GGSGGSGGS	4103	FFV_O93209-Pro
GSSGGGEAAAK	4195	MMTVB_P03365
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	MLVFF_P26809_3mutA
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	HTL1L_P0C211_2mutB
GGGEAAAK	4147	SFV3L_P27401-Pro_2mutA
GGGGGSGSS	4159	MMTVB_P03365
GSSPAPGGS	4184	FOAMV_P14350_2mutA
EAAAKGSS	4152	MLVMS_P03355
GSSGGSGGG	4161	FFV_O93209-Pro

【０６９７】

【表Ｄ－７４】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGSGGGGSS	4157	MMTVB_P03365-Pro_2mut
GGSPAPGSS	4182	FOAMV_P14350_2mut
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	SFVCP_Q87040-Pro_2mut
GSSEAAAKGGG	4196	FOAMV_P14350_2mutA
GGSGGSGGS	4103	MMTVB_P03365-Pro
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	MMTVB_P03365_2mut_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	MMTVB_P03365-Pro
PAPEAAAK	4156	WDSV_O92815
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	FFV_O93209-Pro_2mut
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MMTVB_P03365-Pro
GGSPAPEAAAK	4188	FOAMV_P14350
GSSGSS	4120	PERV_Q4VFZ2
GGG		MMTVB_P03365-Pro
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	FFV_O93209_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	MMTVB_P03365-Pro
GGSGSSPAP	4181	WMSV_P03359
GGGGGGGG	4118	SFV3L_P27401_2mut
PAPGSSEAAAK	4215	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
GGGGSSPAP	4199	FOAMV_P14350_2mut
GSSGGSPAP	4183	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSSGGGGGS	4162	GALV_P21414_3mutA
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	MMTVB_P03365
GSSGGGGGS	4162	SFV1_P23074_2mut
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	SFV1_P23074
GGGEAAAKPAP	4205	FFV_O93209
PAPGGGEAAAK	4209	SFV1_P23074
GGSGGGEAAAK	4163	PERV_Q4VFZ2_3mutA_WS
GSSGGG	4146	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKGSSGGS	4180	FFV_O93209_2mut
GGGGG	4115	SFV1_P23074_2mut
GGGPAP	4149	SFV3L_P27401
GSSGGSEAAAK	4177	FFV_O93209
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	MMTVB_P03365-Pro
GSSGGGEAAAK	4195	SFV1_P23074_2mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	SFV3L_P27401_2mut
GGSEAAAKPAP	4187	FLV_P10273
GGGGSGGGGS	4108	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
GSSEAAAKPAP	4211	SFV3L_P27401
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	MMTVB_P03365-Pro
PAPGSSEAAAK	4215	MLVF5_P26810_3mut

【０６９８】

【表Ｄ－７５】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKGGSGGG	4167	SFV3L_P27401
GGGPAPGGS	4172	SFV3L_P27401
GSSEAAAKGGS	4178	FOAMV_P14350_2mutA
EAAAKGGSGGG	4167	HTL1L_P0C211
GSSGGSPAP	4183	SFV3L_P27401_2mutA
PAPAP	4132	FFV_O93209
PAPGGSGSS	4185	MMTVB_P03365_WS
EAAAKGGGGS	4168	FOAMV_P14350_2mut
PAPEAAAKGGS	4192	SFV3L_P27401_2mut
GSSEAAAKPAP	4211	MMTVB_P03365-Pro
GGSGGS	4102	PERV_Q4VFZ2_3mut
GSSEAAAKGGG	4196	FFV_O93209-Pro_2mutA
EAAAK	4028	HTL1L_P0C211
GSSPAP	4153	MLVMS_P03355
EAAAKPAPGGG	4208	FFV_O93209-Pro_2mut
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	SFV1_P23074-Pro_2mut
EAAAKGSSGGS	4180	SFV3L_P27401
GSAGSAAGSGEF	4221	FFV_O93209_2mutA
PAPEAAAKGGS	4192	MMTVB_P03365_2mutB_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4130	MMTVB_P03365
GGS		MMTVB_P03365
GGSEAAAKPAP	4187	SFV1_P23074
EAAAKGSSGGG	4198	HTLV2_P03363_2mut
GGSEAAAKGGG	4164	MMTVB_P03365_WS
GGSGGS	4102	FFV_O93209-Pro
GSSEAAAKGGS	4178	MMTVB_P03365-Pro
PAPAPAPAPAP	4135	SFV1_P23074_2mutA
GGSEAAAKGGG	4164	MMTVB_P03365_2mutB_WS
PAPAPAPAP	4134	MMTVB_P03365_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	HTL3P_Q4U0X6_2mut
PAPGGSEAAAK	4191	SFV1_P23074-Pro_2mut
GGSGGGPAP	4169	MMTVB_P03365
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	MMTVB_P03365-Pro
GGSEAAAKPAP	4187	SFV1_P23074-Pro
GGGEAAAKGSS	4194	SFV3L_P27401_2mutA
GGGPAPGGS	4172	AVIRE_P03360
PAPGGG	4150	MLVRD_P11227
GGSEAAAKGSS	4176	SFV3L_P27401_2mut
GGGEAAAKGSS	4194	FOAMV_P14350_2mut
GGGEAAAKGSS	4194	SFV1_P23074-Pro

【０６９９】

【表Ｄ－７６】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVAV_P03356
EAAAKGGGPAP	4207	JSRV_P31623_2mutB
EAAAKGGGGSS	4197	FOAMV_P14350_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	SRV2_P51517
GSSGGGGGS	4162	FFV_O93209
PAPAPAP	4133	FOAMV_P14350_2mutA
GGSGGSGGSGGS	4104	FOAMV_P14350
GGGEAAAK	4147	MMTVB_P03365_WS
GGGGGS	4138	SFV1_P23074_2mutA
GGSGGS	4102	WMSV_P03359_3mut
EAAAKGGS	4142	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSS	4145	BLVJ_P03361_2mut
PAPAP	4132	MMTVB_P03365-Pro_2mut
PAPGGG	4150	SMRVH_P03364
EAAAKGGGGSS	4197	SFV3L_P27401
PAPAPAPAPAP	4135	MMTVB_P03365
GGGPAP	4149	MMTVB_P03365-Pro
GSSGGSGGG	4161	MMTVB_P03365
EAAAKGGGPAP	4207	FOAMV_P14350_2mutA
GSSGSSGSSGSS	4122	SFV1_P23074
GGGGSGGGGS	4108	SFV3L_P27401
GSSGGSGGG	4161	MLVF5_P26810
GGGEAAAKPAP	4205	MMTVB_P03365-Pro
PAPEAAAK	4156	HTLV2_P03363_2mut
GSSGSSGSSGSS	4122	FOAMV_P14350_2mut
GSSEAAAKPAP	4211	MMTVB_P03365-Pro
PAPEAAAKGGG	4210	HTL3P_Q4U0X6_2mut
GGSEAAAKGSS	4176	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKPAPGGS	4190	MMTVB_P03365_2mut_WS
GSSGGSEAAAK	4177	MLVF5_P26810_3mutA
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MLVF5_P26810_3mut
EAAAKGGGGSS	4197	MMTVB_P03365-Pro
GGGGGSGSS	4159	HTL1A_P03362_2mutB
PAPAP	4132	FFV_O93209-Pro_2mut
GGGGGSPAP	4171	HTL1C_P14078_2mut
GGGPAP	4149	HTLV2_P03363_2mut
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	SFVCP_Q87040
GGSEAAAKGGG	4164	FFV_O93209-Pro_2mutA
GSSPAPGGS	4184	FOAMV_P14350-Pro_2mut
GGGGGGG	4117	MMTVB_P03365-Pro

【０７００】

【表Ｄ－７７】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKGSS	4152	SFV3L_P27401_2mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	SFV1_P23074-Pro_2mutA
EAAAKGGGGSS	4197	MMTVB_P03365
GGGEAAAKGGS	4166	SFV1_P23074
PAPEAAAKGGG	4210	MLVF5_P26810
GGGGSSGGS	4160	MMTVB_P03365
GGSGSS	4139	MMTVB_P03365
PAPAPAPAPAP	4136	KORV_Q9TTC1
EAAAKGGG	4148	SFV1_P23074-Pro_2mut
PAPAPAPAPAP	4136	SRV2_P51517
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	FFV_O93209-Pro_2mutA
GGGGSS	4145	FOAMV_P14350_2mut
PAPGGGEAAAK	4209	MMTVB_P03365_WS
GGSGGGEAAAK	4163	FFV_O93209-Pro_2mut
PAPAPAPAPAP	4135	MMTVB_P03365_WS
GGGEAAAKGGS	4166	MMTVB_P03365-Pro
GGGEAAAKGSS	4194	MMTVB_P03365_2mutB
GSSPAPEAAAK	4212	MMTVB_P03365_WS
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4129	SFV1_P23074-Pro_2mutA
PAPGGG	4150	SFV3L_P27401
GSSEAAAKGGG	4196	MMTVB_P03365_WS
GGGGSSEAAAK	4193	FOAMV_P14350_2mut
PAPGSSGGS	4186	SFV1_P23074-Pro_2mut
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	SFV3L_P27401
EAAAKGSSGGG	4198	MMTVB_P03365
PAPGGGGSS	4203	WDSV_O92815_2mutA
GGSPAP	4143	MMTVB_P03365-Pro
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	SFVCP_Q87040-Pro_2mut
PAPAPAPAP	4134	MMTVB_P03365-Pro
GGGGG	4115	HTL1A_P03362
GGSGGSGGSGGS	4104	SFV1_P23074_2mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	FOAMV_P14350-Pro_2mut
PAPGGSEAAAK	4191	MMTVB_P03365_2mutB_WS
PAPAPAPAP	4134	SFV1_P23074_2mut
PAPGGGGSS	4203	MMTVB_P03365
GGSGSS	4139	SFV3L_P27401_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MMTVB_P03365_2mut
EAAAKGGSGGG	4167	HTL3P_Q4U0X6_2mut
PAPGGGGSS	4203	SFVCP_Q87040-Pro_2mutA

【０７０１】

【表Ｄ－７８】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
EAAAKGGGGGS	4168	MLVAV_P03356
GGGGGS	4138	FOAMV_P14350_2mut
GGGEAAAKGGS	4166	FFV_O93209-Pro_2mutA
EAAAKPAPGGG	4208	MMTVB_P03365_2mutB
GGSGGGPAP	4169	FFV_O93209_2mut
GSSEAAAKPAP	4211	MMTVB_P03365
PAPAPAPAPAPAP	4136	SFV1_P23074_2mut
GGSPAPGGG	4170	MMTVB_P03365-Pro
GGSGGGEAAAK	4163	MMTVB_P03365
PAPAP	4132	SFVCP_Q87040
GSSEAAAK	4151	SFVCP_Q87040
GGGGSGGGGSGGGGS	4109	MMTVB_P03365-Pro
GSSGSSGSS	4121	SFV3L_P27401
EAAAKGGSGGG	4167	MMTVB_P03365-Pro
GSSPAP	4153	SFV1_P23074_2mut
GGGEAAAK	4147	SFV1_P23074-Pro
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	MMTVB_P03365-Pro
PAPGGS	4144	HTL1C_P14078_2mut
PAPGSSGGS	4186	SFV1_P23074_2mut
PAPEAAAK	4156	MMTVB_P03365_WS
PAPAP	4132	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKGGS	4142	HTL1A_P03362_2mut
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	HTL1C_P14078
EAAAKGSSGGS	4180	FOAMV_P14350-Pro
PAPGGSGSS	4185	MMTVB_P03365-Pro
PAPGGSEAAAK	4191	SFV1_P23074_2mut
PAPGSSEAAAK	4215	FFV_O93209-Pro_2mut
PAPGSSGGG	4204	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
GSSGGGEAAAK	4195	AVIRE_P03360
GGGGGG	4116	SMRVH_P03364_2mut
PAPEAAAKGGG	4210	MMTVB_P03365-Pro
GGGEAAAKGGS	4166	SFVCP_Q87040_2mutA
PAPAPAPAPAP	4135	SRV2_P51517
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	MMTVB_P03365
EAAAKGGGPAP	4207	MLVAV_P03356
PAPAPAPAPAP	4135	FOAMV_P14350-Pro_2mutA
PAPGGSEAAAK	4191	FOAMV_P14350
GSSGGGPAP	4201	HTL32_Q0R5R2_2mutB
GGGGGSPAP	4171	HTL3P_Q4U0X6_2mutB
GSSGGSGGG	4161	MMTVB_P03365-Pro

【０７０２】

【表Ｄ－７９】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPAP	4132	SFVCP_Q87040-Pro
GSSGGGPAP	4201	MMTVB_P03365-Pro
GGSGSS	4139	MMTVB_P03365-Pro_2mut
GGSPAPEAAAK	4188	SFV1_P23074-Pro_2mut
EAAAKGGSGGG	4167	SFV3L_P27401_2mut
GGGGSSEAAAK	4193	MMTVB_P03365_WS
GGGGGSGSS	4159	MMTVB_P03365_2mut
GGGGSSGGS	4160	SFV1_P23074-Pro_2mutA
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MMTVB_P03365_WS
PAPGGGEAAAK	4209	SFV1_P23074-Pro
PAPEAAAKGGG	4210	MMTVB_P03365
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	MMTVB_P03365
GSSGGSEAAAK	4177	FOAMV_P14350-Pro_2mut
GGSPAP	4143	MLVBM_Q7SVK7_3mut
GSSEAAAK	4151	FOAMV_P14350
GSSEAAAK	4151	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKGSSGGS	4180	HTL1A_P03362_2mut
GGGEAAAKPAP	4205	FOAMV_P14350-Pro_2mut
EAAAKGGSPAP	4189	FOAMV_P14350
GSSEAAAKPAP	4211	MMTVB_P03365_WS
GSSGSSGSS	4121	FOAMV_P14350_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MMTVB_P03365_WS
EAAAK	4028	MMTVB_P03365
PAPGSS	4154	BAEVM_P10272
PAPGGS	4144	FFV_O93209-Pro_2mut
GGSGGS	4102	SFV1_P23074-Pro_2mutA
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	HTLV2_P03363_2mut
GGSGGGEAAAK	4163	MMTVB_P03365_WS
PAPGSSGGG	4204	HTL1A_P03362
GGSGGS	4102	SFV3L_P27401-Pro
GSSGSS	4120	SFV1_P23074-Pro
PAPGGSEAAAK	4191	MMTVB_P03365
GSAGSAAGSGEF	4221	MMTVB_P03365-Pro
PAPGGG	4150	FOAMV_P14350_2mut
EAAAKGGSGSS	4179	MMTVB_P03365_WS
GSSGGGEAAAK	4195	SFV3L_P27401-Pro
GGSGGGPAP	4169	FOAMV_P14350-Pro_2mut
PAPAPAPAPAP	4136	WDSV_O92815
SGSETPGTSESATPES	4220	SFVCP_Q87040-Pro_2mutA
GGSGGSGGS	4103	SFV1_P23074

【０７０３】

【表Ｄ－８０】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGGSS	4145	SFVCP_Q87040_2mut
GGGGGSEAAAK	4165	MMTVB_P03365
SGSETPGTSESATPES	4220	MMTVB_P03365_WS
PAPAPAP	4133	SFV3L_P27401
PAPEAAAKGSS	4216	MMTVB_P03365_2mutB_WS
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	SRV2_P51517
GGGPAPGSS	4200	HTL32_Q0R5R2_2mutB
GGSGGGGSS	4157	MMTVB_P03365-Pro
SGSETPGTSESATPES	4220	SRV2_P51517
EAAAKGSSGGS	4180	MMTVB_P03365-Pro
GSSPAPEAAAK	4212	MMTVB_P03365-Pro
GSSPAPEAAAK	4212	SRV2_P51517
GGGGSSPAP	4199	MMTVB_P03365-Pro
PAPGGGEAAAK	4209	SFV1_P23074-Pro_2mutA
PAPEAAAKGGS	4192	MMTVB_P03365
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	FOAMV_P14350-Pro
GGSPAPGSS	4182	SFV3L_P27401
GGGPAPGGS	4172	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GGGPAPGSS	4200	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKPAP	4155	MLVBM_Q7SVK7
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	HTL1C_P14078
GSSGGSEAAAK	4177	SRV2_P51517
PAPGGGGGS	4174	SRV2_P51517
GGGEAAAK	4147	FFV_O93209-Pro_2mut
EAAAKGGGPAP	4207	HTL32_Q0R5R2
GGSGSSGGG	4158	MMTVB_P03365
PAPEAAAKGSS	4216	MMTVB_P03365-Pro
PAPGGGGGS	4174	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKGGGGGS	4168	MMTVB_P03365_WS
GGGGGS	4138	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4111	HTL1C_P14078
EAAAKGGSPAP	4189	MMTVB_P03365
GGGGSSPAP	4199	FFV_O93209-Pro_2mut
GGGGSSGGS	4160	MMTVB_P03365-Pro
PAPGSSGGS	4186	MMTVB_P03365-Pro
GGGGGS	4138	SRV2_P51517
GGSGSSGGG	4158	MMTVB_P03365
GSSGGSEAAAK	4177	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	GALV_P21414
GGSEAAAKGGG	4164	MMTVB_P03365-Pro

【０７０４】

【表Ｄ－８１】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	4006	MMTVB_P03365-Pro
GSSEAAAKGGS	4178	MMTVB_P03365
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	HTL3P_Q4U0X6_2mutB
GGGEAAAK	4147	MMTVB_P03365-Pro
PAPAPAPAP	4134	MMTVB_P03365-Pro
PAPGSSGGG	4204	MMTVB_P03365
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	GALV_P21414
GGSPAP	4143	MMTVB_P03365_WS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MMTVB_P03365-Pro
PAPEAAAK	4156	MMTVB_P03365-Pro
PAPGSSGGG	4204	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GGGGGSEAAAK	4165	MMTVB_P03365_2mutB_WS
PAPAPAPAPAP	4135	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKGGSGSS	4179	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MLVRD_P11227_3mut
PAPAPAPAP	4134	FOAMV_P14350_2mutA
GGGPAPGSS	4200	SFVCP_Q87040_2mut
PAPEAAAKGSS	4216	SFVCP_Q87040_2mut
GGSPAPGGG	4170	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	MMTVB_P03365
EAAAKGGS	4142	HTL3P_Q4U0X6_2mut
PAPGSSGGS	4186	MMTVB_P03365_WS
GGGGSGGGGS	4108	MMTVB_P03365
GGSGGS	4102	FOAMV_P14350
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	SFVCP_Q87040-Pro_2mut
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	4128	MMTVB_P03365-Pro_2mutB
PAPGGGEAAAK	4209	SFVCP_Q87040-Pro
GSSGSS	4120	JSRV_P31623_2mutB
EAAAKGGGGGS	4168	MMTVB_P03365_2mut_WS
GSSPAPEAAAK	4212	MMTVB_P03365-Pro
GGGEAAAK	4147	HTL1C_P14078
PAPEAAAKGSS	4216	HTL32_Q0R5R2_2mutB
GGGGSSEAAAK	4193	MMTVB_P03365-Pro
PAPGSSGGS	4186	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKGGGGGS	4168	MMTVB_P03365
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4110	MMTVB_P03365
EAAAKGGGGSS	4197	HTL3P_Q4U0X6_2mut
GGGEAAAKGGS	4166	SFVCP_Q87040-Pro
GGGGGSPAP	4171	MMTVB_P03365-Pro_2mutB
GGSGGGEAAAK	4163	SFV3L_P27401-Pro

【０７０５】

【表Ｄ－８２】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
PAPGGGGGS	4174	SFV3L_P27401-Pro
EAAAKGGGGSEAAAK	4219	MMTVB_P03365
PAPEAAAKGSS	4216	MMTVB_P03365-Pro
GGSEAAAKGGG	4164	MMTVB_P03365-Pro
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	SMRVH_P03364_2mutB
GGSGGSGGSGGSGGS	4105	HTL1L_P0C211_2mut
GGGGGG	4116	WDSV_O92815
GGGGGSGSS	4159	MMTVB_P03365-Pro
GGSEAAAKPAP	4187	SFV3L_P27401-Pro_2mut
GGGPAPGSS	4200	MMTVB_P03365_2mut_WS
GGGGGS	4138	MMTVB_P03365_WS
GGSPAPEAAAK	4188	MMTVB_P03365
PAPEAAAKGGS	4192	HTL1A_P03362
EAAAKGGSGSS	4179	MMTVB_P03365_2mut_WS
GGGPAPEAAAK	4206	SFV3L_P27401-Pro_2mut
PAPGGGGSS	4203	HTL32_Q0R5R2_2mut
GSSPAPGGG	4202	HTL3P_Q4U0X6_2mut
GGGGSSGGS	4160	BLVAU_P25059_2mut
EAAAKGGGGGS	4168	HTL1L_P0C211
GGSEAAAKGSS	4176	JSRV_P31623_2mutB
GSSGGG	4146	JSRV_P31623
GGSGGSGGSGGS	4104	MMTVB_P03365-Pro
EAAAKPAP	4155	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GGGGSSGGS	4160	MMTVB_P03365_WS
GGSGGS	4102	MMTVB_P03365_WS
EAAAKGGGGGS	4168	MMTVB_P03365-Pro
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	4112	MMTVB_P03365
GGSGGSGGS	4103	MMTVB_P03365
GGGGGSEAAAK	4165	MLVBM_Q7SVK7
GGSGSSPAP	4181	MMTVB_P03365_WS
EAAAKEAAAKEAAAK	4127	JSRV_P31623
PAPEAAAKGGS	4192	MMTVB_P03365-Pro
GGSGSSEAAAK	4175	FOAMV_P14350
GGGGGSGSS	4159	MMTVB_P03365-Pro_2mut
GGGPAPGGS	4172	MMTVB_P03365
SGSETPGTSESATPES	4220	SFVCP_Q87040_2mut
GSSPAPGGS	4184	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	MMTVB_P03365
EAAAKGGGPAP	4207	MMTVB_P03365
GSSGGG	4146	MMTVB_P03365_2mut_WS

【０７０６】

【表Ｄ－８３】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GGGEAAAKPAP	4205	MMTVB_P03365
PAPGGSGGG	4173	MMTVB_P03365-Pro
GSSGGSGGG	4161	WDSV_O92815_2mut
GGSGGG	4137	HTL32_Q0R5R2_2mut
EAAAKGGSPAP	4189	HTLV2_P03363_2mut
GGSPAPEAAAK	4188	MMTVB_P03365-Pro
GSSGGSEAAAK	4177	MMTVB_P03365_2mut
GSAGSAAGSGEF	4221	MMTVB_P03365_WS
PAPGGSGSS	4185	FFV_O93209
GGSEAAAKGGG	4164	MMTVB_P03365
GGSPAPGSS	4182	MMTVB_P03365-Pro
GSSGGSGGG	4161	SFV3L_P27401
PAPEAAAKGGG	4210	HTL1A_P03362_2mutB
GGGEAAAKPAP	4205	MMTVB_P03365-Pro
GGSEAAAK	4141	HTL32_Q0R5R2_2mutB
GGGEAAAKGSS	4194	MPMV_P07572
GGGGGSEAAAK	4165	MMTVB_P03365-Pro
PAPAPAPAPAP	4135	SFVCP_Q87040-Pro_2mutA
PAPAPAPAPAP	4135	HTL1L_P0C211_2mut
GGGGSSGGS	4160	HTL3P_Q4U0X6
PAPGGSEAAAK	4191	MMTVB_P03365_2mut_WS
PAPAPAPAPAP	4135	HTL1A_P03362
EAAAKPAPGGG	4208	MMTVB_P03365_2mut_WS
GGSEAAAK	4141	MMTVB_P03365_2mut_WS
GGGEAAAKGSS	4194	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GGSPAPGSS	4182	MMTVB_P03365-Pro
GGSEAAAKPAP	4187	MLVBM_Q7SVK7
PAPEAAAKGGG	4210	MMTVB_P03365_2mut_WS
GSSEAAAKPAP	4211	MMTVB_P03365-Pro_2mutB
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	MMTVB_P03365-Pro_2mut
GSSEAAAKGGS	4178	MMTVB_P03365-Pro_2mutB
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	SRV2_P51517_2mutB
GGGGGSPAP	4171	HTL1L_P0C211_2mut
GGSEAAAK	4141	MMTVB_P03365
GSSPAPEAAAK	4212	SMRVH_P03364_2mutB
GGGPAPGGS	4172	HTL1C_P14078_2mut
GGSPAPEAAAK	4188	MMTVB_P03365_WS
GGSEAAAKPAP	4187	HTL1A_P03362_2mut
PAPAPAPAP	4134	HTLV2_P03363_2mut
GSSPAPGGG	4202	MMTVB_P03365

【０７０７】

【表Ｄ－８４】

リンカーアミノ酸配列	配列番号	RTドメイン名
GSSGSSGSSGSS	4122	MMTVB_P03365-Pro
GGSEAAAKGSS	4176	MMTVB_P03365_WS
GGSGSSGGG	4158	MMTVB_P03365_2mutB
GSSGSSGSSGSSGSSGSS	4124	JSRV_P31623_2mutB
GGSEAAAKPAP	4187	MMTVB_P03365-Pro
GSSGGSGGG	4161	HTLV2_P03363_2mut
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKALEAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	4217	WDSV_O92815_2mut
GGSPAPEAAAK	4188	MMTVB_P03365
GGGGSSEAAAK	4193	MMTVB_P03365
GGSGGGEAAAK	4163	SFV1_P23074-Pro_2mutA
GGGGSEAAAKGGGGS	4218	WDSV_O92815_2mut
GGSGSSEAAAK	4175	MMTVB_P03365_2mutB_WS
GGSEAAAKPAP	4187	MMTVB_P03365_WS
GSSGGGEAAAK	4195	SFVCP_Q87040-Pro
GSSGGS	4140	SFVCP_Q87040-Pro_2mut
GGSEAAAKPAP	4187	SFVCP_Q87040_2mut
GSSGGSEAAAK	4177	SFVCP_Q87040_2mut
GSSPAPEAAAK	4212	SRV2_P51517_2mutB
GGSGGSGGSGGSGGSGGS	4106	BLVAU_P25059
GSSGSSGSSGSSGSS	4123	HTL1C_P14078_2mut
EAAAKGGGGSS	4197	MMTVB_P03365_2mutB
GGGEAAAKGSS	4194	SFVCP_Q87040-Pro

【０７０８】

実施例４：様々なヒトＤＮＡポリメラーゼθドメインとのＣａｓ－Ｐｏｌ融合を含む遺伝子組換えシステムは、ヒト細胞での正確な編集を可能にする

この実施例では、Ｃａｓドメイン及びポリメラーゼドメイン（Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合）を含む例示的な遺伝子組換えポリペプチドを特性決定し、ヒト細胞内のゲノムＤＮＡに突然変異をプログラム可能にインストールするそれらの能力を決定した。遺伝子組換えポリペプチドは、例示的なヒトポリメラーゼ（ヒトＤＮＡポリメラーゼθ（Ｐｏｌθ）の異なる切断を含み（図２、表２３）：遺伝子組換えポリペプチドは、ポリメラーゼドメイン、エキソヌクレアーゼドメインを含み、２つのいずれかは、中央のドメインが切断されたか（Ｐｏｌθ＿Ｍ若しくはＰｏｌθ＿Ｌ）又は中央のドメインが欠如していた（Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ）。遺伝子組換えポリペプチドは、Ｎ８６３Ａ突然変異（ｎＣａｓ９）を含む例示的なＣａｓドメイン、ＳｐＣａｓ９を含んでいた。２つの異なるリンカー配列を使用して、Ｃａｓドメイン及びＰｏｌドメインを接続した：

例示的なリンカーＦＬ：

ＤＮＡ配列：ＴＣＴＧＧＡＧＧＡＴＣＴＡＧＣＧＧＡＧＧＡＴＣＣＴＣＴＧＧＣＡＧＣＧＡＧＡＣＡＣＣＡＧＧＡＡＣＡＡＧＣＧＡＧＴＣＡＧＣＡＡＣＡＣＣＡＧＡＧＡＧＣＡＧＴＧＧＣＧＧＣＡＧＣＡＧＣＧＧＧＣＧＧＣＡＧＣＡＧＣ（配列番号４４００）

アミノ酸配列：

ＳＧＧＳＳＧＧＳＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳＳＧＧＳＳＧＧＳＳ（配列番号４４０１）

【０７０９】

例示的なリンカーＵＬ：

ＤＮＡ配列：

【化３４】

GCCGAAGCCGCCGCCAAGGAGGCCGCCGCTAAGGAGGCTGCTGCCAAGGAAGCTGC
TGCTAAGGCTTTAGAAGCTGAAGCTGCTGCCAAAGAAGCTGCCGCCAAAGAGGCTG
CCGCAAAGGAGGCCGCTGCCAAGGCT (配列番号 : 4402)

アミノ酸配列：
ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＬＥＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡ（配列番号４４０３）
６つの遺伝子組換えポリペプチド（Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合）を試験した：（１）ｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、（２）ｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ、（３）ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｌ、（４）ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、（５）ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ並びに（６）ポリメラーゼドメインの代わりにｎＣａｓ９及び逆転写酵素ドメインを含むベンチマーク遺伝子組換えポリペプチド。
【０７１０】
【表２３－１】

表23: 例示的なCas-Pol融合遺伝子組換えポリペプチド

名称	アミノ酸配列	配列番号
Polθ_L	GASFDLSPGLQRILDKVSSPLENEKLKSMTINFSSLNRKNTELNEEQEVISNLETKQVQGISFSSNNEVKS KIEMLENNANHDETSSLLPRKESNIVDDNGLIPPTPIPTSASKLTFPGILETPVNPWKTNNVLQPGESYLFG SPSDIKNHDLSPGSRNGFKDNSPISDTSFSLQLSQDGLQLTPASSSSESLSIIDVASDQNLFQTFIKEWRC KKRFSISLACEKIRSLTSSKTATIGSRFKQASSPQEIPIRDDGFPIKGCDDTLVVGLAVCWGGRDAYYFSL QKEQKHSEISASLVPPSLDPSLTLKDRMWYLQSCLRKESDKECSVVIYDFIQSYKILLLSCGISLEQSYEDP KVACWLLDPDSQEPTLHSIVTSFLPHELPLLEGMETSQGIQSLGLNAGSEHSGRYRASVESILIFNSMNQL NSLLQKENLQDVFRKVEMPSQYCLALLELNGIGFSTAECESQKHIMQAKLDAIETQAYQLAGHSFSFTSS DDIAEVLFLELKLPPNREMKNQGSKKTLGSTRRGIDNGRKLRLGRQFSTSKDVLNKLKALHPLPGLILEW RRITNAITKVVFPLQREKCLNPFLGMERIYPVSQSHTATGRITFTEPNIQNVPRDFEIKMPTLVGESPPSQA VGKGLLPMGRGKYKKGFSVNPRCQAQMEERAADRGMPFSISMRHAFVPFPGGSILAADYSQLELRILAH LSHDRRLIQVLNTGADVFRSIAAEWKMIEPESVGDDLRQQAKQICYGIIYGMGAKSLGEQMGIKENDAAC YIDSFKSRYTGINQFMTETVKNCKRDGFVQTILGRRRYLPGIKDNNPYRKAHAERQAINTIVQGSAADIVKI ATVNIQKQLETFHSTFKSHGHREGMLQSDQTGLSRKRKLQGMFCPIRGGFFILQLHDELLYEVAEEDVVQ VAQIVKNEMESAVKLSVKLKVKVKIGASWGELKDFDV	4404
Polθ_M	GFKDNSPISDTSFSLQLSQDGLQLTPASSSSESLSIIDVASDQNLFQTFIKEWRCKKRFSISLACEKIRSLT SSKTATIGSRFKQASSPQEIPIRDDGFPIKGCDDTLVVGLAVCWGGRDAYYFSLQKEQKHSEISASLVPPS LDPSLTLKDRMWYLQSCLRKESDKECSVVIYDFIQSYKILLLSCGISLEQSYEDPKVACWLLDPDSQEPTL HSIVTSFLPHELPLLEGMETSQGIQSLGLNAGSEHSGRYRASVESILIFNSMNQLNSLLQKENLQDVFRKV EMPSQYCLALLELNGIGFSTAECESQKHIMQAKLDAIETQAYQLAGHSFSFTSSDDIAEVLFLELKLPPNR	4405

【０７１１】

【表２３－２】

	EMKNQGSKKTLGSTRRGIDNGRKLRLGRQFSTSKDVLNKLKALHPLPGLILEWRRITNAITKVVFPLQREK CLNPFLGMERIYPVSQSHTATGRITFTEPNIQNVPRDFEIKMPTLVGESPPSQAVGKGLLPMGRGKYKKG FSVNPRCQAQMEERAADRGMPFSISMRHAFVPFPGGSILAADYSQLELRILAHLSHDRRLIQVLNTGADV FRSIAAEWKMIEPESVGDDLRQQAKQICYGIIYGMGAKSLGEQMGIKENDAACYIDSFKSRYTGINQFMTE TVKNCKRDGFVQTILGRRRYLPGIKDNNPYRKAHAERQAINTIVQGSAADIVKIATVNIQKQLETFHSTFKS HGHREGMLQSDQTGLSRKRKLQGMFCPIRGGFFILQLHDELLYEVAEEDVVQVAQIVKNEMESAVKLSV KLKVKVKIGASWGELKDFDV	
Pol8_4x0q	SSSSESLSIIDVASDQNLFQTFIKEWRCKKRFSISLACEKIRSLTSSKTATIGSRFKQASSPQEIPIRDDGFPI KGCDDTLVVGLAVCWGGRDAYYFSLQKEQKHSEISASLVPPSLDPSLTLKDRMWYLQSCLRKESDKEC SVVIYDFIQSYKILLLSCGISLEQSYEDPKVACWLLDPDSQEPTLHSIVTSFLPHELPLLEGMETSQGIQSLG LNAGSEHSGRYRASVESILIFNSMNQLNSLLQKENLQDVFRKVEMPSQYCLALLELNGIGFSTAECESQK HIMQAKLDAIETQAYQLAGHSFSFTSSDDIAEVLFLELKLPPNREMKNQGSKKTLGSTRRGIDNGRKLRLG RQFSTSKDVLNKLKALHPLPGLILEWRRITNAITKVVFPLQREKCLNPFLGMERIYPVSQSHTATGRITFTE PNIQNVPRDFEIKMPTLVGESPPSQAVGKGLLPMGRGKYKKGFSVNPRCQAQMEERAADRGMPFSISM RHAFVPFPGGSILAADYSQLELRILAHLSHDRRLIQVLNTGADVFRSIAAEWKMIEPESVGDDLRQQAKQI CYGIIYGMGAKSLGEQMGIKENDAACYIDSFKSRYTGINQFMTETVKNCKRDGFVQTILGRRRYLPGIKDN NPYRKAHAERQAINTIVQGSAADIVKIATVNIQKQLETFHSTFKSHGHREGMLQSDQTGLSRKRKLQGMF CPIRGGFFILQLHDELLYEVAEEDVVQVAQIVKNEMESAVKLSVKLKVKVKIGASWGELKDFDV	4406
Pol8_4x0q_GS	SSSSESLSIIDVASDQNLFQTFIKEWRCKKRFSISLACEKIRGSGDDTLVVGLAVCWGGRDAYYFSLQGS GGLDPSLTLKDRMWYLQSCLRKESDKECSVVIYDFIQSYKILLLSCGISLEQSYEDPKVACWLLDPDSQE PTLHSIVTSFLPHELPLLEGMETSQGIQSLGLNAGSEHSGRYRASVESILIFNSMNQLNSLLQKENLQDVF RKVEMPSQYCLALLELNGIGFSTAECESQKHIMQAKLDAIETQAYQLAGHSFSFTSSDDIAEVLFLELKLP PGGSGGQFSTSKDVLNKLKALHPLPGLILEWRRITNAITKVVFPLQREKCLNPFLGMERIYPVSQSHTATG RITFTEPNIQNVPRDFEIKMGGSGGMPFSISMRHAFVPFPGGSILAADYSQLELRILAHLSHDRRLIQVLNT GADVFRSIAAEWKMIEPESVGDDLRQQAKQICYGIIYGMGAKSLGEQMGIKENDAACYIDSFKSRYTGIN QFMTETVKNCKRDGFVQTILGRRRYLPGIKDNNPYRKAHAERQAINTIVQGSAADIVKIATVNIQKQLETFH STFKSHGHREGMLQSDQGGSGGCPIRGGFFILQLHDELLYEVAEEDVVQVAQIVKNEMESAVKLSVKLKV KVKIGASWGELKDFDV	4407
nCas9	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRY TRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVD STDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLS KSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYAD LFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAG YIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFL KDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPN EKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECF DSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVM KQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGD SLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIK ELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRS DKARGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKH VAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVW DKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL VVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLAS AGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANL DKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRID LSQLGGD	

【０７１２】

例示的な遺伝子組換えポリペプチドによって編集として導入されるとき、外因性ＢＦＰマーカをＧＦＰ（本明細書に記載される）に変換する働きをする直接の単一の塩基対置換をコードする試験鋳型核酸を構築した。鋳型核酸は、（ｉ）遺伝子組換えポリペプチドを標的領域にガイドするためのｇＲＮＡスペーサー配列、例えば、ＢＦＰ遺伝子座の２０ヌクレオチド配列に相補的な配列；（ｉｉ）標的プライミング重合のためのニックＤＮＡの一本鎖と相補的な塩基対形成が可能なプライマー結合配列（ＰＢＳ）；（ｉｉｉ）意図された最終標的配列を更に含む重合のための鋳型を提供する異種目的配列；及び（ｉｖ）遺伝子組換えポリペプチドのＣａｓ９ドメインに関連するｇＲＮＡスカフォールド配列を含んでいた。例示的な鋳型核酸は、５’から３’に以下の順序で配列された：（ｉ）－（ｉｖ）－（ｉｉｉ）－（ｉｉ）。鋳型組成物が、表２４に記載され（ＲＮＡＣＳ－４２３９－ＤＤ、及びＲＮＡＣＳ－４２４１－ＤＲ）、ここで、（ｉｉ）及び（ｉｉｉ）はそれぞれ、ＲＮＡ又はＤＮＡヌクレオチドのいずれかとして含まれ得る。

【０７１３】

【表２４】

表24: 実施例1において使用される鋳型核酸

名称	記述	スペーサー (i)	スカフォールド (iv)	Pol鋳型 (iii)	PBS (ii)	完全な鋳型分子
鋳型DD	BFP_g4_11RT_13PBS_DD	mG*mC*mC*rGrArArGrCrArCrUrGrCrArCrGrCrCrGrU (配列番号 4409)	rGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArArUrUrArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrC (配列番号 4411)	CCTGACGTACG (配列番号 4413)	GCGTGCAGTG*mC*mU*mU (配列番号 4415)	mG*mC*mC*rGrArArGrCrArCrUrGrCrArCrGrCrCrGrUrGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArArUrUrArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCCCTGACGTACGGCGTGCAGTG*mC*mU*mU (配列番号 4417)
鋳型DR	BFP_g4_11RT_13PBS_DR	mG*mC*mC*rGrArArGrCrArCrUrGrCrArCrGrCrCrGrU (配列番号 4410)	rGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArArUrUrArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrC (配列番号 4412)	CCTGACGTACG (配列番号 4414)	rGrCrGrUrGrCrArGrUrG*mC*mU*mU (配列番号 4416)	mG*mC*mC*rGrArArGrCrArCrUrGrCrArCrGrCrCrGrUrGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArArUrUrArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCCCTGACGTACGGrGrCrGrUrGrCrArGrUrG*mC*mU*mU (配列番号 4418)
鋳型RR	BFP_g4_11RT_13PBS_RR	mG*mC*mC*rGrArArGrCrArCrUrGrCrArCrGrCrCrGrU (配列番号 4419)	rGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArArGrUrUrArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrC (配列番号 4420)	rCrCrUrGrArCrGrUrArCrG (配列番号 4421)	rGrCrGrUrGrCrArGrUrG*mC*mU*mU (配列番号 4422)	mG*mC*mC*rGrArArGrCrArCrUrGrCrArCrGrCrCrGrUrGrUrUrUrUrArGrArGrCrUrArGrArArArUrArGrCrArArArUrUrArArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCrCrCrUrGrArCrGrUrArCrGrGrCrGrUrGrCrArGrUrG*mC*mU*mU (配列番号 4423)

「r_」として表されるRNA、例えばrA、rU;「_」として表されるDNA、
例えばA、T; 2' O-メチルRNA塩基が、「m_」として表され;
ホスホロチオエート化2'-O-メチルRNA塩基が、「m_*」として入力される。

【０７１４】

実験を実施して、Ｃａｓ－Ｐｏｌ融合遺伝子組換えポリペプチドのゲノム編集能力を決定した。

【０７１５】

Ｕ２ＯＳ又はＨＥＫ２９３Ｔ細胞に、例示的な遺伝子組換えポリペプチドをコードし、抗生物質（ピューロマイシン）耐性カセットを含むレンチウイルスベクターを感染させた。遺伝子組換えポリペプチドを安定的に発現する細胞を、ピューロマイシン補充培地中で細胞を培養することによって選択した。２５０，０００個の細胞／ウェル（９６ウェルプレート）を、２．５ｕＭ及び５ｕＭの化学的に合成された例示的な鋳型核酸分子でヌクレオフェクトした。細胞を、ヌクレオフェクション後３日目に蛍光活性化細胞ソーティング（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｓｏｒｔｉｎｇ）（ＦＡＣＳ、フロー）に供した。意図した編集（ＢＦＰ陽性細胞からＧＦＰ陽性細胞への変換）の頻度を、ＢＦＰ陽性細胞のパーセンテージと比べたＧＦＰ陽性細胞のパーセンテージとして決定した（図３Ａ及び３Ｂ）。

【０７１６】

結果は、遺伝子組換えポリペプチドｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｌ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ、ｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、及びｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑが、編集活性、例えば、ＨＥＫ２９３細胞における最大で約７５％の編集効率を示したことを示す。遺伝子組換えポリペプチドは、「ＤＲ」として示される、ＤＮＡコードされた異種目的配列及びＲＮＡプライマー結合配列を含む鋳型核酸で、高い編集活性（対照逆転写酵素を含有するベンチマーク遺伝子組換えポリペプチドと同等であるか又はそれより高い）を示した（図３Ａ～Ｂ）。遺伝子組換えポリペプチドは、「ＤＤ」として示される、ＤＮＡ異種目的配列及びＤＮＡプライマー結合配列の両方を含む鋳型核酸でも編集活性を示したが、ＲＮＡプライマー結合配列を使用した場合より低かった（図３Ａ～Ｂ）。遺伝子組換えポリペプチドは、「ＲＲ」

として示される、ＲＮＡ異種目的配列及びＲＮＡプライマー結合配列を含む鋳型核酸で、編集活性を示さなかった（図３Ａ～Ｂ）。編集のレベルは、ベンチマーク遺伝子組換えポリペプチドと同等であるか又はそれより高く、これは、ポリメラーゼドメインを用いた遺伝子組換えポリペプチドが、逆転写酵素ドメインを用いた遺伝子組換えポリペプチドの有用な代替物であることを実証している。データが、試験される切断を含む遺伝子組換えポリペプチド（中央のドメインの完全な切断を含む）が編集活性を有していたことを示すため、結果は、Ｐｏｌθの様々な切断が、ポリメラーゼドメインとして使用され得ることを更に実証する。

【０７１７】

「約」、「少なくとも」、「未満」、及び「を超える」などの、本出願におけるいくつかのパラメータを表す全ての数値境界について、記載は、記載される値によって境界付けられるいずれの範囲も必然的に包含することが理解されるべきである。従って、例えば、「少なくとも１、２、３、４又は５」という記載は、とりわけ、１～２、１～３、１～４、１～５、２～３、２～４、２～５、３～４、３～５及び４～５などの範囲も表す。

【０７１８】

本明細書に引用される全ての特許、出願又は非特許文献及び参照配列情報などの他の参照文献について、それらが、あらゆる目的のため及び記載される提示のため、全体が参照により組み込まれることが理解されるべきである。参照により組み込まれる文献と及び本出願との間に矛盾が存在する場合、本出願が優先される。本出願に開示される参照遺伝子配列に関連する全ての情報、例えば、例えば、ゲノム遺伝子座、ゲノム配列、機能注釈、対立遺伝子多型及び参照ｍＲＮＡ（例えば、エクソン境界又は応答エレメントを含む）及びタンパク質配列（保存的ドメイン構造など）並びに化学参照（例えば、ＰｕｂＣｈｅｍ化合物、ＰｕｂＣｈｅｍ物質又はＰｕｂＣｈｅｍ　Ｂｉｏａｓｓａｙエントリ（構造及びアッセイなどのその中の注釈を含む））を含む、ＧｅｎｅＩＤｓ又は受入番号（典型的に、ＮＣＢＩ受入番号を参照する）は、全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０７１９】

本出願において使用される見出しは、便宜上のものであるに過ぎず、本出願の解釈に影響を及ぼすものではない。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目１)

遺伝子組換えポリペプチドであって、

Ｃａｓドメイン（例えば、Ｃａｓニッカーゼドメイン、例えばＣａｓ９ニッカーゼドメイン）；

表１若しくは表２３のポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列であって、前記Ｐｏｌドメインは、前記ＣａｓドメインのＣ末端である、ポリメラーゼ（Ｐｏｌ）ドメイン又は配列；及び

前記Ｐｏｌドメインと前記Ｃａｓドメインとの間に配置されるリンカー

を含む遺伝子組換えポリペプチド。

(項目２)

前記リンカーは、表６からの配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を有する、項目１に記載の遺伝子組換えポリペプチド。

(項目３)

前記Ｐｏｌドメインは、表１又は２３の前記Ｐｏｌドメインに対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を有する、項目１又は２に記載の遺伝子組換えポリペプチド。

(項目４)

前記Ｐｏｌドメインは、表１又は２３の前記Ｐｏｌドメインに対して少なくとも９５％の同一性を有する配列を有する、項目１～３のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。

(項目５)
前記ＰｏｌドメインＰｏｌドメインは、表１又は２３の前記ＰｏｌドメインＰｏｌドメインに対して少なくとも９８％の同一性を有する配列を有する、項目１～４のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目６)
前記ＰｏｌドメインＰｏｌドメインは、表１又は２３の前記ＰｏｌドメインＰｏｌドメインに対して少なくとも９９％の同一性を有する配列を有する、項目１～５のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目７)
前記ＰｏｌドメインＰｏｌドメインは、表１又は２３の前記ＰｏｌドメインＰｏｌドメインに対して１００％の同一性を有する配列を有する、項目１～６のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目８)
前記リンカーは、表６からの前記リンカー配列に対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を有する、項目１～７のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目９)
前記リンカーは、表６からの前記リンカー配列に対して少なくとも９５％の同一性を有する配列を有する、項目１～８のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目１０)
前記リンカーは、表６からの前記リンカー配列に対して少なくとも９７％の同一性を有する配列を有する、項目１～９のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目１１)
前記リンカーは、表６からの前記リンカー配列に対して１００％の同一性を有する配列を有する、項目１～１０のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目１２)
前記ＣａｓドメインＣａｓドメインは、表４の配列又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％若しくは９９％の同一性を有する配列を含む、項目１～１１のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目１３)
前記ＣａｓドメインＣａｓドメインは、Ｃａｓニッカーゼドメインである、項目１～１２のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目１４)
前記ＣａｓドメインＣａｓドメインは、Ｃａｓ９ニッカーゼドメインである、項目１～１３のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目１５)
前記ＣａｓドメインＣａｓドメインは、Ｎ８６３Ａ突然変異を含む、項目１～１４のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目１６)
ＮＬＳを含み、例えば２つのＮＬＳを含む、項目１～１５のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目１７)
前記Ｃａｓ９ドメインのＮＬＳ　Ｎ末端を含む、項目１～１６のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目１８)
前記ＰｏｌドメインのＮＬＳ　Ｃ末端を含む、項目１～１７のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目１９)
前記Ｃａｓ９ドメインの末端である第１のＮＬＳ及び前記ＰｏｌドメインのＣ末端である第２のＮＬＳを含む、項目１～１８のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド。
(項目２０)

項目１～１９のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチドをコードする核酸（例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡ、例えばｍＲＮＡ）。
(項目２１)
項目１～１９のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド又は項目２０に記載の核酸を含む細胞。
(項目２２)
システムであって、
ｉ）項目１～１９のいずれか一項に記載の遺伝子組換えポリペプチド、並びに
ｉｉ）鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）であって、
ａ）標的核酸配列の一部に相補的なｇＲＮＡスペーサー；
ｂ）前記遺伝子組換えポリペプチドの前記Ｃａｓドメインに結合するｇＲＮＡスカフォールド；
ｃ）異種目的配列；及び
ｄ）プライマー結合部位配列（ＰＢＳ配列）
を含む鋳型核酸（例えば、鋳型ＲＮＡ）
を含むシステム。
(項目２３)
前記鋳型核酸は、ＲＮＡを含む、項目２２に記載のシステム。
(項目２４)
前記鋳型核酸は、ＤＮＡを含む、項目２２又は２３に記載のシステム。
(項目２５)
前記鋳型核酸は、ＤＮＡ及びＲＮＡを含む、項目２２に記載のシステム。
(項目２６)
前記鋳型核酸は、表２４に列挙される核酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、項目２２～２５のいずれか一項に記載のシステム。
(項目２７)
前記鋳型核酸の前記ｇＲＮＡスペーサーは、表２４に列挙されるスペーサー配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、項目２６に記載のシステム。
(項目２８)
前記鋳型核酸の前記ｇＲＮＡスカフォールドは、表２４に列挙されるスカフォールド配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、項目２６又は２７に記載のシステム。
(項目２９)
前記鋳型核酸の前記ＰＢＳ配列は、表２４に列挙されるＰＢＳ配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、項目２６～２８のいずれか一項に記載のシステム。
(項目３０)
前記鋳型核酸配列は、例えば、５’から３’の順に、
（ｉ）表２４に列挙されるスペーサー配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列；
（ｉｉ）表２４に列挙されるスカフォールド配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列；及び／又は
（ｉｉｉ）表２４に列挙されるＰＢＳ配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列

の１つ又は複数（例えば、１、２又は３つ全て）を含む、項目２６に記載のシステム。
(項目３１)
前記鋳型核酸は、表２４に列挙される完全な鋳型分子配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む、項目２６～３０のいずれか一項に記載のシステム。
(項目３２)
前記ｇＲＮＡスペーサー及び前記ｇＲＮＡスカフォールドは、ＲＮＡを含む、項目２２～３１のいずれか一項に記載のシステム。
(項目３３)
前記異種目的配列は、ＤＮＡを含み、及びＰＢＳ配列は、ＲＮＡを含む、項目２２～３２のいずれか一項に記載のシステム。
(項目３４)
前記異種目的配列及びＰＢＳ配列は、ＤＮＡを含む、項目２２～３２のいずれか一項に記載のシステム。
(項目３５)
前記遺伝子組換えポリペプチドは、表２３に列挙されるアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目２２～３４のいずれか一項に記載のシステム。
(項目３６)
前記遺伝子組換えポリペプチドは、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｌ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ、ｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ若しくはｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑのいずれか１つのアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目２２～３５のいずれか一項に記載のシステム。
(項目３７)
前記遺伝子組換えポリペプチドは、表２３に列挙される遺伝子組換えポリペプチドのＣａｓドメインアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目２２～３６のいずれか一項に記載のシステム。
(項目３８)
前記遺伝子組換えポリペプチドは、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｌ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ、ｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ若しくはｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑのいずれか１つのＣａｓドメインアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目２２～３７のいずれか一項に記載のシステム。
(項目３９)
前記遺伝子組換えポリペプチドは、表２３に列挙される遺伝子組換えポリペプチドのＰｏｌドメインアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目２２～３８のいずれか一項に記載のシステム。
(項目４０)
前記遺伝子組換えポリペプチドは、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｌ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ、ｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ若しくはｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑのいずれか１つのＰｏｌドメインアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目２２～３９のいずれか一項に記載のシステム。

(項目４１)
前記遺伝子組換えポリペプチドは、表２３に列挙される遺伝子組換えポリペプチドのＣａｓドメインアミノ酸配列及びＰｏｌドメインアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目２２～４０のいずれか一項に記載のシステム。
(項目４２)
前記遺伝子組換えポリペプチドは、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｌ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ、ｎＣａｓ９－ＵＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑ、ｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿Ｍ若しくはｎＣａｓ９－ＦＬ－Ｐｏｌθ＿４ｘ０ｑのいずれか１つのＣａｓドメインアミノ酸配列及びＰｏｌドメインアミノ酸配列又はそれと少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目２２～４１のいずれか一項に記載のシステム。
(項目４３)
細胞（例えば、ヒト細胞）内の標的核酸を修飾する方法であって、前記細胞を、項目２２～４２のいずれか一項に記載のシステム又はそれをコードする核酸と接触させ、それにより前記標的核酸を修飾することを含む方法。
(項目４４)
遺伝的欠陥と関連する疾患又は症状を有する対象を処置する方法であって、
前記対象に、項目１～４２のいずれか一項に記載のシステム、ポリペプチド、鋳型ＲＮＡ又はそれをコードするＤＮＡを投与し、それにより遺伝的欠陥と関連する疾患又は症状を有する前記対象を処置すること
を含む方法。
(項目４５)
遺伝的欠陥と関連する前記疾患又は症状は、表１２～１５のいずれかに列挙される適応症であり、及び／又は前記遺伝的欠陥は、表１２～１５のいずれかに列挙される遺伝子における欠陥である、項目４４に記載の方法。
(項目４６)
前記対象は、ヒト患者である、項目４４又は４５に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/076024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - INV. - C12N 9/22; C07K 14/195 (2022.01)
ADD.

CPC - INV. - C12N 9/22; C07K 14/195 (2022.08)

ADD. - C07K 2319/80; C07K 2319/85 (2022.08)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016/0324934 A1 (FACTOR BIOSCIENCE INC.) 10 November 2016 (10.11.2016) entire document	1-3
A	US 2021/0230577 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 29 July 2021 (29.07.2021) entire document	1-3
A	US 2015/0044772 A1 (SAGE LABS INC.) 12 February 2015 (12.02.2015) entire document	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 December 2022	JAN 24 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Talna Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/076024

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

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

   a. ☒ forming part of the international application as filed.

   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/076024

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 4-46
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet(s).

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/076024

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-3 are drawn to gene modifying polypeptides.

The first invention of Group I+ is restricted to a gene modifying polypeptide comprising a Cas domain; a polymerase domain selected to be the amino acid sequence of Row 1 of Table 1
(MATGQDRWALVDMDCFFVQVEQRQNPHLRNKPCAVVQYKSWKGGGIIAVSYEARAFGVTRSMWADDAKKLCPDLILAQVRESRGKAN
LTKYREASVEVMEIMSRFAVIERASIDEAWDLTSAVQERLQKLQGQPISADLLPSTYIEGLPQGPTTAEETVQKEGMRKQGLFQWLDSLQI
DNLTSPDLQLTVGAVIVEEMRAAIERETGFQCSAGISHNKVLAKLACGLNKPNRQTLVSHGSVPQLFSQMPIRKIRSLGGKLGASVIEILGIE
YMGELTQFTESQLQSHFGEKNGSWLYAMCRGIEHDPVKPRQLPKTIGCSKNFPGKTALATREQVQWWLLQLAQELEERLTKDRNQNDR
VATQLWSIRVQGDKRLSSLRRCCALTRYDAHKMSHDAFTVIKNCNTSGIQTEWSPPLTMLFLCATKFSASAPSSSTDITSFLSSDPSSLPK
VPVTSSEAKTQGSGPAVTATKKATTSLESFFQKAAERQKVKEASLSSLTAPTQAPMSNSPSKPSLPFQTSQSTGTEPFFKQKSLLLKQKQ
LNNSSVSSPQQNPWSNCKALPNSLPTEYPGCVPVCEGVSKLEESSKATPAEMDLAHNSQSMHASSASKSVLEVTQKATPNPSLLAAEDQ
VPCEKCGSLVPVWDMPEHMDYHFALELQKSFLQPHSSNPQWSAVSHQGKRNPKSPLACTNKRPRPEGMQTLESFFKPLTH), wherein the Pol domain is C-terminal of the Cas domain; and a linker disposed between the Pol domain and the Cas domain, wherein the linker is selected to be SEQ ID NO: 4101 (GGS). It is believed that claims 1-3 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on.

Applicant is invited to elect additional gene modifying polypeptides comprising a Cas domain; a Pol domain C-terminal to the Cas domain; and a linker disposed between the Pol domain and the Cas domain to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a gene modifying polypeptide comprising a Cas domain; a Pol domain selected to be Row 2 of Table 1
(MEKLGVEPEEEGGGDDDEEDAEAWAMELADVGAAASSQGVHDQVLPTPNASSRVIVHVDLDCFYAQVEMISNPELKDKPLGVQQKYL
WTCNYEARKLGVKKLMNVRDAKEKCPQLVLVNGEDLTRYREMSYKVTELLEEFSPVVERLGFDENFVDLTEMVEKRLQQLQSDELSAVT
VSGHVYNNQSINLLDVLHIRLLVGSQIAAEMREAMYNQLGLTGCAGVASNKLLAKLVSGVFKPNQQTVLLPESCQHLHSLNHIKEIPGIGYK
TAKCLEALGINSVRDLQTFSPKILEKELGISVAQRIQKLSFGEDNSPVILSGPPQSFSEEDSFKKCSSEVEAKNKIEELLASLLNRVCQDGRK
PHTVRLIIRRYSSEKHYGRESRQCPIPSHVIQKLGTGNYDVMTPMVDILMKLFRNMVNVKMPFHLTLLSVCFCNLKALNTAKKGLIDYYLMP
SLSTTSRSGKHSFKMKDTHMEDFPKDKETNRDFLPSGRIESTRTRESPLDTTNFSKEKDINEFPLCSLPEGVDQEVFKQLPVDIQEEILSGK
SREKFQGKGSVSCPLHASRGVLSFFSKKQMQDIPINPRDHLSSSKQVSSVSPCEPGTSGFNSSSSSYMSSQKDYSYYLDNRLKDERISQ
GPKEPQGFHFTNSNPAVSAFHSFPNLQSEQLFSRNHTTDSHKQTVATDSHEGLTENREPDSVDEKITFPSDIDPQVFYELPEAVQKELLA
EWKRAGSDFHIGHK), wherein the Pol domain is C-terminal to the Cas domain; and a linker disposed between the Pol domain and the Cas domain, wherein the linker is selected to be SEQ ID NO: 4101 (GGS). Additional gene modifying polypeptides will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

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

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for gene modification requiring the selection of alternative Pol domains where the Pol domain is "a polymerase (Pol) domain of Table 1 or Table 23, or a sequence having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, or 99% identity thereto" and alternative linkers where the "linker has a sequence from Table 8, or a sequence having at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, or 99% identity thereto."

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a gene modifying polypeptide comprising: a Cas domain; a polymerase (Pol) domain, wherein the Pol domain is C-terminal of the Cas domain; and a linker disposed between the Pol domain and the Cas domain, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2015/0044772 A1 to Sage Labs Inc. teaches a gene modifying polypeptide (a chimeric fusion including a DNA modifying domain fused to a catalytically inactive CRISPR associated ("inCas", or "dCas") domain, Para. [0011]) comprising: a Cas domain; a polymerase (Pol) domain, wherein the Pol domain is C-terminal of the Cas domain; and a linker disposed between the Pol domain and the Cas domain (the dCas domain can be located at the N-terminus of the fusion protein such that the chimeric fusion protein is oriented from N-terminus to C-terminus as: dCas domain-Linker-DNA modifying domain, Para. [0079]; Suitable DNA modifying domains can be, for example,... a DNA polymerase, Para. [0068]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*15/56 (2006.01)*	C12N	15/56		
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10		
C12N	*1/21 (2006.01)*	C12N	1/21		
C12N	*1/19 (2006.01)*	C12N	1/19		
C12N	*1/15 (2006.01)*	C12N	1/15		
C12N	*15/09 (2006.01)*	C12N	15/09	110	
C12N	*15/113 (2010.01)*	C12N	15/113	Z	
A61K	*38/17 (2006.01)*	A61K	38/17		
A61K	*48/00 (2006.01)*	A61K	48/00		
A61P	*43/00 (2006.01)*	A61P	43/00	105	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁護士　山本 健策

(72)発明者　アルトシュラー， ロバート チャールズ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， スイート ８００イー

(72)発明者　ボスマー， アン ヘレン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， スイート ８００イー

(72)発明者　シトリク， ロバート ジェイムズ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， スイート ８００イー

(72)発明者　コッター－ラムシノ， セシリア ジョバンナ シルビア
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， スイート ８００イー

(72)発明者　キム， キュシク
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， スイート ８００イー

(72)発明者　コトラー， ランディ ミシェル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， スイート ８００イー

(72)発明者　クマール， サンディープ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， スイート ８００イー

(72)発明者　レイ， アナーニャ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， スイート ８００イー

(72)発明者　ロケ， ナサニエル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， スイート ８００イー

(72)発明者　ルーベンス， ジェイコブ ローゼンブラム
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， スイート ８００イー

(72)発明者　サロモン， ウィリアム エドワード
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ

５５， スイート ８００イー
(72)発明者 スタインバーグ， バレット イーサン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ
５５， スイート ８００イー
(72)発明者 ワン， ジー ジュン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ
５５， スイート ８００イー
(72)発明者 アキンジ， エルシン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ
５５， スイート ８００イー

Ｆターム（参考） 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA44 CA46
4C084 AA01 AA07 AA13 BA01 BA35 NA14 ZB21
4H045 AA10 AA30 BA09 BA41 DA89 EA20 FA74