

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7636338号
(P7636338)

(45)発行日 令和7年2月26日(2025.2.26)

(24)登録日 令和7年2月17日(2025.2.17)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	31/57 (2006.01)	A 6 1 K	31/57
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
A 6 1 P	25/02 (2006.01)	A 6 1 P	25/02
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
請求項の数 37 (全1090頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-557650(P2021-557650)	(73)特許権者	518196169
(86)(22)出願日	令和2年3月27日(2020.3.27)		インテリア セラピューティクス, イン
(65)公表番号	特表2022-525429(P2022-525429 A)		コーポレイテッド
(43)公表日	令和4年5月13日(2022.5.13)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
(86)国際出願番号	PCT/US2020/025533		2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー スト
(87)国際公開番号	WO2020/198706	(74)代理人	100092783
(87)国際公開日	令和2年10月1日(2020.10.1)		弁理士 小林 浩
審査請求日	令和5年3月27日(2023.3.27)	(74)代理人	100093676
(31)優先権主張番号	62/825,637		弁理士 小林 純子
(32)優先日	平成31年3月28日(2019.3.28)	(74)代理人	100120134
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 大森 規雄
(31)優先権主張番号	62/825,676	(74)代理人	100153693
(32)優先日	平成31年3月28日(2019.3.28)		弁理士 岩田 耕一
最終頁に続く		(72)発明者	チャン, ヨン
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 コルチコステロイドを含む、T T R遺伝子編集およびA T T Rアミロイドーシスを治療するための組成物および方法、またはその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) C a s 9をコードするオープンリーディングフレーム (O R F) を含む核酸と、

(i i) シングルガイドRNA (s g RNA) であって、

a . 配列番号 2 3 の配列を含むガイド配列、

b . 配列番号 2 3 の配列の少なくとも 1 7 、 1 8 、 1 9 、もしくは 2 0 個の連続ヌクレオチドであるガイド配列、または

c . 配列番号 2 3 の配列と少なくとも 9 0 % 同一であるガイド配列を含む、

前記 s g RNA と、

を含む組成物であって、

T T Rに関連するアミロイドーシス (A T T R) を治療するためにコルチコステロイドと組み合わせて使用するための、前記組成物。

【請求項2】

(i) C a s 9をコードするオープンリーディングフレーム (O R F) を含む核酸と、

(i i) シングルガイドRNA (s g RNA) であって、

a . 配列番号 2 3 の配列を含むガイド配列、

b . 配列番号 2 3 の配列の少なくとも 1 7 、 1 8 、 1 9 、もしくは 2 0 個の連続ヌクレオチドであるガイド配列、または

c . 配列番号 2 3 の配列と少なくとも 9 0 % 同一であるガイド配列を含む、

前記 s g RNA と、

を含む組成物であって、

T T R 血清濃度を低減するためにコルチコステロイドと組み合わせて使用するための、前記組成物。

【請求項 3】

(i) C a s 9 をコードする オープンリーディングフレーム (O R F) を含む核酸と、

(i i) シングルガイド RNA (s g RNA) であって、

a . 配列番号 2 3 の配列を含むガイド配列、

b . 配列番号 2 3 の配列の少なくとも 1 7 、 1 8 、 1 9 、もしくは 2 0 個の連続ヌクレオチドであるガイド配列、または

c . 配列番号 2 3 の配列と少なくとも 9 0 % 同一であるガイド配列を含む、

前記 s g RNA と、

を含む組成物であって、

アミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減するためにコルチコステロイドと組み合わせて使用するための、前記組成物。

【請求項 4】

(i) シングルガイド RNA (s g RNA) であって、下記 a ~ c :

a . 配列番号 2 3 の配列を含むガイド配列、

b . 配列番号 2 3 の配列の少なくとも 1 7 、 1 8 、 1 9 、もしくは 2 0 個の連続ヌクレオチドであるガイド配列、または

c . 配列番号 2 3 の配列と少なくとも 9 0 % 同一であるガイド配列

のうちの一つを、5 ' から 3 ' への順で含む、

前記 s g RNA と、

(i i) C a s 9 をコードする オープンリーディングフレーム (O R F) を含む核酸であって、

a . 前記 オープンリーディングフレーム が、配列番号 3 1 1 の配列を含む、または

b . 前記 オープンリーディングフレーム が、配列番号 3 1 1 と少なくとも 9 9 % の同一性を有する配列を含む、

前記核酸と、

を含む組成物であって、

対象において T T R 遺伝子内の二本鎖切断 (D S B) を誘導し、細胞もしくは対象において前記 T T R 遺伝子を修飾し、対象において T T R に関連するアミロイドーシス (A T T R) を治療し、対象において T T R 血清濃度を低減し、かつ／または対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する方法においてコルチコステロイドと組み合わせて使用するための、前記組成物。

【請求項 5】

前記組成物が、3 0 分間より長い間、注入によって投与されるように製剤化される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記 s g RNA が、配列番号 2 3 のガイド配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記コルチコステロイドが、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、トリアムシノロン、またはエタメタゾネブである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記コルチコステロイドが、デキサメタゾンである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記コルチコステロイドが、前記組成物の前に投与される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

前記コルチコステロイドが、前記組成物の後に投与される、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記コルチコステロイドが、前記組成物と同時に投与される、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

少なくとも 2 回用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物の投与の前または後に投与される、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

少なくとも 2 回用量の前記コルチコステロイドおよび少なくとも 2 回用量の前記組成物が投与される、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記コルチコステロイドが、前記対象に、 $0.75\text{ mg} \sim 20\text{ mg}$ の用量で、または、 $0.01 \sim 0.4\text{ mg/kg}$ 、 $0.1 \sim 0.35\text{ mg/kg}$ もしくは $0.25 \sim 0.35\text{ mg/kg}$ の用量で、投与される、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記コルチコステロイドが、静脈内注射を介して前記対象に投与される、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記コルチコステロイドが、前記対象に経口投与される、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

前記コルチコステロイドが、前記組成物が静脈内注射によって前記対象に投与される前に、前記対象に経口投与される、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記コルチコステロイドが、デキサメタゾンであり、前記デキサメタゾンが、前記組成物が前記対象に投与される前に、 20 mg の量で 6 ～ 12 時間、前記対象に経口投与されるか、または前記デキサメタゾンが、前記組成物が前記対象に投与される前に、 20 mg の量で 30 分間 6 ～ 12 時間、前記対象に静脈内投与される、請求項 16 または 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記組成物が、さらに注入予防と組み合わせて使用されるものであり、前記注入予防が、アセトアミノフェン、H1 遮断薬、または H2 遮断薬のうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 20】

前記アセトアミノフェン、H1 遮断薬、または H2 遮断薬のうちの 1 つ以上が、前記コルチコステロイドと同時に、かつ／または前記組成物の前に投与される、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記アセトアミノフェン、H1 遮断薬、または H2 遮断薬の各々が投与される、請求項 19 または 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

H1 遮断薬が、ジフェンヒドラミンである、または、前記 H2 遮断薬が、ラニチジンである、請求項 19 ～ 21 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 23】

(a) 第 1 の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与される 8 ～ 24 時間前に投与され、第 2 の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与される 1 ～ 2 時間前に投与される；

(b) 第 1 の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与される 8 ～ 24 時間前

10

20

30

40

50

に経口投与され、第2の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与される1～2時間前に静脈内投与される；

(c) 第1の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与される8～24時間前に経口投与され、第2の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与される1～2時間前に、アセトアミノフェン、H1遮断薬およびH2遮断薬の投与と同時に静脈内投与される；

(d) 前記コルチコステロイドが、デキサメタゾンであり、前記組成物が前記対象に投与される8～24時間前に、第1の用量の前記デキサメタゾンが、6～10mgの量で、前記対象に経口投与され、第2の用量の前記デキサメタゾンが、8～12mgの量で、前記組成物が前記対象に投与される1～2時間前に、アセトアミノフェンの経口投与ならびにH1遮断薬およびH2遮断薬の静脈内投与と同時に、前記対象に静脈内投与される；

10

(e) 前記コルチコステロイドが、デキサメタゾンであり、前記組成物が前記対象に投与される8～24時間前に、第1の用量の前記デキサメタゾンが、8mgの量で、前記対象に経口投与され、第2の用量の前記デキサメタゾンが、10mgの量で、前記組成物が前記対象に投与される1～2時間前に、アセトアミノフェンの経口投与ならびにH1遮断薬およびH2遮断薬の静脈内投与と同時に、前記対象に静脈内投与される；または

(f) 前記組成物が、3mg/kgの量で1.5～6時間、注入によって投与され、第1の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が注入される8～24時間前に経口投与され、第2の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が注入される1～2時間前に静脈内投与される、

20

請求項1～22のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項24】

前記コルチコステロイドの使用が、

(a) 前記sgRNAを含む前記組成物の許容性を改善する；

(b) 前記sgRNAを含む前記組成物に応答して、炎症、吐き気、嘔吐、血中ALT濃度の上昇、高熱症、および／または痛覚過敏のうちの1つ以上の発生率または重症度を低減する；

(c) 前記sgRNAを含む前記組成物に応答して、1つ以上のインターフェロンおよび／または炎症性サイトカインの産生または活性を低減または阻害する；あるいは

(d) 前記(a)～(c)の2つ以上の組み合わせである、

30

請求項1～23のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項25】

前記組成物が、血清TTRレベルを低減する、または、前記TTR遺伝子の編集を引き起こす、請求項1～24のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項26】

前記sgRNAが、5'から3'へ、(1)ガイド配列と、(2)配列番号125のヌクレオチド配列を含む、請求項1～25のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項27】

前記sgRNAが、5'から3'へ、(1)ガイド配列と、(2)配列番号3の修飾ヌクレオチド配列を含む、請求項1～26のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項28】

前記sgRNAが、配列番号87の配列と少なくとも97%同一であるガイド配列を含む、請求項1～27のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項29】

前記sgRNAが、配列番号87の配列を含む、請求項1～28のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項30】

前記sgRNAが、少なくとも1つの修飾を含み、前記少なくとも1つの修飾が、

(a) 2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート(PS)結合、または2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチド；

50

(b) 5'末端部における最初の5個のヌクレオチドのうちの1つ以上、および3'末端部における最後の5個のヌクレオチドのうちの1つ以上における修飾；

(c) 最初の4個のヌクレオチド間のPS結合；

(d) 最後の4個のヌクレオチド間のPS結合；

(e) 5'末端における最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチド；

(f) 3'末端における最後の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチド；または

(g) 前記(a)～(f)の2つ以上の組み合わせ

を含む、請求項1～26のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項31】

前記sgRNAが、配列番号3の修飾ヌクレオチドを含む、請求項30に記載の組成物。

【請求項32】

前記組成物が、脂質ナノ粒子(LNP)製剤である、請求項1～31のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項33】

前記LNPが、イオン化可能な脂質、ヘルパー脂質、ステルス脂質、および中性脂質を含む、請求項32に記載の組成物。

【請求項34】

前記イオン化可能な脂質が、(9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノアートである、請求項33に記載の組成物。

20

【請求項35】

前記LNPが、

(i) (9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノアート、

(ii) ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、

(iii) コレステロール、および

(iv) ポリエチレングリコール-ジミリスチルグリセロール(PEG-DMG)

を含む、請求項32に記載の組成物。

30

【請求項36】

前記LNP製剤が、

(i) 50mol%の(9Z, 12Z)-3-((4, 4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノアート、

(ii) 9mol%のジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、

(iii) 38mol%のコレステロール、および

(iv) 3mol%のポリエチレングリコール-ジミリスチルグリセロール(PEG-DMG)

を含む、請求項32に記載の組成物。

40

【請求項37】

ATTRを有するヒト対象を治療するための医薬の調製のための、請求項1～36のいずれかに記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本特許出願は、2019年3月28日に出願された米国仮出願第62/825, 676号および2019年3月28日に出願された米国仮出願第62/825, 637号に対す

50

る優先権を主張し、その内容はそれぞれ、あらゆる目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2020年3月20日に作成された当該ASCIIコピーの名称は、2020-03-20_01155-0029-00PCT_ST25.txtであり、サイズは967KBである。

【背景技術】

【0003】

トランスサイレチン(TTR)は、TTR遺伝子によって生成されるタンパク質であり、通常、レチノールおよびサイロキシンを全身に輸送するように機能する。TTRは、主に肝臓で合成され、脈絡叢および網膜でほんのわずかに産生される。TTRは通常、血中の可溶性四量体タンパク質として循環する。

【0004】

四量体の安定性を乱し得るTTRの病原性バリエーションは、TTR遺伝子の変異体対立遺伝子によってコードすることができる。変異体TTRは、アミロイド(すなわち、ミスフォールディングTTRタンパク質の凝集体)を生成し得るミスフォールディングTTRを生じる場合がある。いくつかの場合では、TTRの病原性バリエーションは、アミロイドーシス、すなわち、アミロイドの蓄積から生じる疾患を引き起こし得る。例えば、ミスフォールディングTTR単量体は、末梢神経、心臓、および消化管などの組織内のアミロイド原線維内で重合し得る。アミロイドプラークはまた、ミスフォールディングTTR上に沈着した野生型TTRも含み得る。

【0005】

また、60歳以上の男性では、野生型TTRのミスフォールディングおよび沈着が認められ、これが心拍の問題、心不全、手根管と関連している。

【0006】

TTRの沈着によって特徴付けられるアミロイドーシスは、「ATTR」、「TTR関連アミロイドーシス」、「TTRアミロイドーシス」、または「ATTRアミロイドーシス」、「ATTR家族性アミロイドーシス」(家族内の遺伝子変異と関連する場合)、または「ATTRwt」または「野生型ATTR」(野生型TTRのミスフォールディングおよび沈着から生じる場合)と称され得る。

【0007】

ATTRは、広範囲にわたる症状を呈する場合があり、異なる種類のATTRを有する患者は、異なる特徴および予後を有し得る。ATTRのいくつかの種類としては、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)、家族性アミロイド心筋症(FAC)、および野生型TTRアミロイドーシス(wt-TTRアミロイドーシス)が挙げられる。FAPは、一般に、感覚運動ニューロパチーを呈し、一方、FACおよびwt-TTRアミロイドーシスは、一般に、うっ血性心不全を呈する。FAPおよびFACは、通常、TTR遺伝子における遺伝子変異と関連付けられ、TTR遺伝子における100を超える異なる変異は、ATTRと関連付けられている。対照的に、wt-TTRアミロイドーシスは、加齢と関連付けられ、TTRにおける遺伝子変異とは関連付けられない。世界でおよそ50,000人の患者がFAPおよびFACを患う可能性があることが推定されている。

【0008】

TTRにおける100を超える変異が、ATTRに関連するが、特定の変異が、ニューロパチーおよび/または心筋症とより密接に関連する。例えば、TTRのT60における変異は、心筋症およびニューロパチーの両方と関連し、V30における変異は、ニューロパチーの方により関連しており、V122における変異は、心筋症の方により関連している。

【0009】

ATTRの治療のための様々な治療アプローチが研究されてきたが、疾患の進行を止め

10

20

30

40

50

、生活の質を向上させる承認薬物は存在しない。A T T Rの治療のために肝臓移植が研究されているが、顕著なリスクを伴い、移植後に疾患の進行が継続することがあるため、その使用は減少しつつある。ジフルニサルおよびタファミジスなどの小分子安定剤は、A T T Rの進行を遅らせるように思われるが、これらの薬剤は、疾患の進行を止めるものではない。

【0010】

破壊のためにアミロイド原線維を標的とする低分子干渉RNA (s i RNA) ノックダウン、アンチセンスノックダウン、またはモノクローナル抗体を使用するアプローチも、現在研究されているが、T T R発現の短期間抑制に関する結果は、予備データを奨励することを示しており、T T Rの長期間続く抑制を生じさせることができる治療の必要性が存在する。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

外来RNAの投与によって、遺伝子編集および療法の文脈において、望ましくない自然免疫応答が生じ得る。したがって、本開示は、炎症または免疫応答を低減し得る遺伝子編集のための組成物および方法を提供する。例えば、ガイドRNAを受ける対象へのコルチコステロイドの同時投与は、そのような炎症または免疫応答を低減し得る。

【0012】

したがって、以下の実施形態が提供される。いくつかの実施形態において、本発明は、ガイドRNA、および任意選択でC R I S P R / C a s系などのRNAガイドDNA結合剤と組み合わせてコルチコステロイドを用い、T T R遺伝子の発現を実質的に低減するか、またはノックアウトし、それによって、A T T Rに関連するT T Rタンパク質の産生を実質的に低減するか、または除去する組成物および方法を提供する。T T R遺伝子の改変によってA T T Rに関連するT T Rタンパク質の産生を実質的に低減するか、または除去することは、長期的な低減または除去となり得る。

20

【課題を解決するための手段】

【0013】

以下の実施形態が本明細書で提供される。

【0014】

実施形態1は、T T Rに関連するアミロイドーシス (A T T R) を治療する方法であって、それを必要とする対象にコルチコステロイドおよび組成物を投与することを含み、組成物が、(i) RNAガイドDNA結合剤またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、(i i) ガイドRNAであって、

- a. 配列番号5～82から選択されるガイド配列、
 - b. 配列番号5～82から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または
 - c. 配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列を含む、ガイドRNAと、を含み、
- それによって、A T T Rを治療する、方法である。

40

【0015】

実施形態2は、T T R血清濃度を低減する方法であって、それを必要とする対象にコルチコステロイドおよび組成物を投与することを含み、組成物が、(i) RNAガイドDNA結合剤またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、(i i) ガイドRNAであって、

- a. 配列番号5～82から選択されるガイド配列、
- b. 配列番号5～82から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または
- c. 配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、

50

96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列を含む、ガイドRNAと、を含み、

それによってTTR血清濃度を低減する、方法である。

【0016】

実施形態3は、対象においてTTRを含むアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する方法であって、それを必要とする対象にコルチコステロイドおよび組成物を投与することを含み、組成物が、(i) RNAガイドDNA結合剤またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、(ii) ガイドRNAであって、

a. 配列番号5～82から選択されるガイド配列、

b. 配列番号5～82から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

c. 配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列を含む、ガイドRNAと、を含み、

それによってアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減する、方法である。

【0017】

実施形態4は、ガイドRNAを含む組成物であって、ガイドRNAが、

a. 配列番号5～82から選択されるガイド配列、

b. 配列番号5～82から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

c. 配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列を含む、

対象においてTTR遺伝子内の二本鎖切断(DSB)を誘導し、細胞もしくは対象においてTTR遺伝子を修飾し、対象においてTTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を治療し、対象においてTTR血清濃度を低減し、かつ／または対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する方法においてコルチコステロイドと組み合わせて使用するための、組成物である。

【0018】

実施形態5は、ガイドRNAをコードするベクターを含む組成物であって、ガイドRNAが、

a. 配列番号5～82から選択されるガイド配列、

b. 配列番号5～82から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

c. 配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列を含む、

対象においてTTR遺伝子内の二本鎖切断(DSB)を誘導し、細胞もしくは対象においてTTR遺伝子を修飾し、対象においてTTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を治療し、対象においてTTR血清濃度を低減し、かつ／または対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する方法においてコルチコステロイドと組み合わせて使用するための、組成物である。

【0019】

実施形態6は、組成物であって、

(i) ガイドRNAであって、

a. 配列番号5～82から選択されるガイド配列、

b. 配列番号5～82から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

c. 配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配

10

20

30

40

50

列を含む、ガイドRNAと、

(i i) RNAガイドDNA結合剤をコードするmRNAであって、

オープンリーディングフレームが、配列番号311と少なくとも95%の同一性を有する配列を含み、

オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の30、50、70、100、150、200、250、もしくは300個のヌクレオチドにわたって配列番号311と少なくとも95%の同一性を有し、

オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも75%が表1に列挙されるコドンである、コドンのセットからなり、

オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の150%の範囲であり、かつ／あるいは

オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の150%の範囲であり、

対象においてTTR遺伝子内の二本鎖切断(DSB)を誘導し、細胞もしくは対象においてTTR遺伝子を修飾し、対象においてTTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を治療し、対象においてTTR血清濃度を低減し、かつ／または対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する方法においてコルチコステロイドと組み合わせて使用するための、組成物である。

【0020】

実施形態7は、組成物であって、

(i) ガイドRNAをコードするベクターであって、ガイドRNAが、

a. 配列番号5～82から選択されるガイド配列、

b. 配列番号5～82から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または

c. 配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列を含む、ベクターと、

(i i) RNAガイドDNA結合剤をコードするmRNAであって、

オープンリーディングフレームが、配列番号311と少なくとも95%の同一性を有する配列を含み、

オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の30、50、70、100、150、200、250、もしくは300個のヌクレオチドにわたって配列番号311と少なくとも95%の同一性を有し、

オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも75%が表1に列挙されるコドンである、コドンのセットからなり、

オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の150%の範囲であり、かつ／あるいは

オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の150%の範囲であり、

対象においてTTR遺伝子内の二本鎖切断(DSB)を誘導し、細胞もしくは対象においてTTR遺伝子を修飾し、対象においてTTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を治療し、対象においてTTR血清濃度を低減し、かつ／または対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する方法においてコルチコステロイドと組み合わせて使用するための、組成物である。

【0021】

実施形態8は、方法が、30分間より長い、例えば、60分間より長い、または120分間より長い注入によって組成物を投与することを含む、実施形態1～3または5～7のいずれか1つの使用のための組成物または方法である。

【0022】

実施形態9は、ガイドRNAが、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択されるガイド配列を含む、先行実施形態のいずれか1つの組成物または方法である。

【0023】

実施形態10は、ガイドRNAが、配列番号5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、17、22、23、27、29、30、35、36、37、38、55、61、63、65、66、68、または69から選択されるガイド配列を含む、先行実施形態のいずれか1つの組成物または方法である。

【0024】

実施形態11は、細胞または対象においてTTR遺伝子内の二本鎖切断(DSB)を誘導する際に使用するための、実施形態4～10のいずれか1つの組成物である。

10

【0025】

実施形態12は、細胞または対象においてTTR遺伝子を修飾する際に使用するための、実施形態4～11のいずれか1つの組成物である。

【0026】

実施形態13は、対象においてTTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を治療する際に使用するための、実施形態4～12のいずれか1つの組成物である。

【0027】

実施形態14は、対象においてTTR血清濃度を低減する際に使用するための、実施形態4～13のいずれか1つの組成物である。

20

【0028】

実施形態15は、対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する際に使用するための、実施形態4～14のいずれか1つの組成物である。

【0029】

実施形態16は、コルチコステロイドが、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、トリアムシノロン、またはエタメタゾネブである、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0030】

実施形態17は、コルチコステロイドが、デキサメタゾンである、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

30

【0031】

実施形態18は、コルチコステロイドが、組成物の前に投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0032】

実施形態19は、コルチコステロイドが、組成物の後に投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0033】

実施形態20は、コルチコステロイドが、組成物と同時に投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

40

【0034】

実施形態21は、コルチコステロイドが、組成物が投与される前の約5分間～約168時間以内に投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0035】

実施形態22は、コルチコステロイドが、組成物が投与された後の約5分間～約168時間以内に投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0036】

実施形態23は、コルチコステロイドが、組成物が投与される5分、10分、15分、

50

30分、1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、12時間、18時間、1日、1.5日、2日、3日、4日、5日、6日、または1週間前に投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0037】

実施形態24は、コルチコステロイドが、組成物が投与される5分、10分、15分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、12時間、18時間、1日、1.5日、2日、3日、4日、5日、6日、または1週間前に投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0038】

実施形態25は、少なくとも2回用量のコルチコステロイドが、組成物の投与の前または後に投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

10

【0039】

実施形態26は、少なくとも2回用量のコルチコステロイドおよび少なくとも2回用量の組成物が投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0040】

実施形態27は、コルチコステロイドが、対象に、0.75mg～20mgの用量で投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0041】

実施形態28は、コルチコステロイドが、対象に、約0.01～0.4mg/kg、例えば、0.1～0.35mg/kgまたは0.25～0.35mg/kgの用量で投与される、実施形態27の方法または使用のための組成物である。

20

【0042】

実施形態29は、コルチコステロイドが、対象に経口で、または注射によって投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0043】

実施形態30は、コルチコステロイドが、静脈内注射を介して対象に投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0044】

実施形態31は、コルチコステロイドが、筋肉内で、または注入によって対象に投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

30

【0045】

実施形態32は、コルチコステロイドが、対象に経口投与される、実施形態1～31のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0046】

実施形態33は、コルチコステロイドが、組成物が静脈内注射によって対象に投与される前に、対象に経口投与される、実施形態32のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0047】

実施形態34は、組成物が静脈内注射によって対象に投与された後に、コルチコステロイドが、対象に経口投与される、実施形態32のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

40

【0048】

実施形態35は、コルチコステロイドが、デキサメタゾンであり、デキサメタゾンが、組成物が対象に投与される前に、20mgの量で6～12時間、対象に経口投与される、実施形態32および33のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0049】

実施形態36は、コルチコステロイドが、デキサメタゾンであり、デキサメタゾンが、組成物が対象に投与される前に、20mgの量で30分間6～12時間、対象に静脈内投与される、実施形態32、33、または35のいずれか1つの方法または使用のための組

50

成物である。

【0050】

実施形態37は、組成物が、約45～75分間、75～105分間、105～135分間、135～165分間、165～195分間、195～225分間、225～255分間、255～285分間、285～315分間、315～345分間、または345～375分間の注入によって投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。いくつかの実施形態において、組成物は、約1.5～6時間、注入によって投与される。

【0051】

実施形態38は、組成物が、約60分間、約90分間、約120分間、約150分間、約180分間、または約240分間の注入によって投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0052】

実施形態39は、組成物が、約120分間の注入によって投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0053】

実施形態40は、コルチコステロイドが、デキサメタゾンである、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0054】

実施形態41は、方法が、注入予防を投与することをさらに含み、注入予防が、アセトアミノフェン、H1遮断薬、またはH2遮断薬のうちの1つ以上を含み、任意選択で、アセトアミノフェン、H1遮断薬、またはH2遮断薬のうちの1つ以上が、コルチコステロイドと同時に、かつ／または組成物の前に投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0055】

実施形態42は、アセトアミノフェン、H1遮断薬、またはH2遮断薬の各々が投与される、実施形態41の方法または使用のための組成物である。

【0056】

実施形態42aは、H1遮断薬および／またはH2遮断薬が、経口投与される、実施形態41または42の方法または使用のための組成物である。

【0057】

実施形態42bは、注入予防が、静脈内コルチコステロイド（例えば、デキサメタゾン8～12mg、または10mgもしくは等価物）およびアセトアミノフェン（例えば、経口アセトアミノフェン500mg）を含む、実施形態41～42aのいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0058】

実施形態42cは、注入予防が、ガイドRNA含有組成物、例えば、LNP組成物を投与する前に、必要な前投薬として投与される、実施形態41～42bのいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0059】

実施形態43は、H1遮断薬が、ジフェンヒドラミンである、実施形態41～42cのいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0060】

実施形態44は、H2遮断薬が、ラニチジンである、実施形態41～43のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0061】

実施形態45は、第1の用量のコルチコステロイドが、組成物が投与される約8～24時間前に投与され、第2の用量のコルチコステロイドが、組成物が投与される約1～2時間前に投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0062】

実施形態４６は、第１の用量のコルチコステロイドが、経口投与され、第２の用量のコルチコステロイドが、組成物が投与される前に、静脈内投与される、先行実施形態のいずれか１つの方法または使用のための組成物である。

【００６３】

実施形態４７は、方法が、アセトアミノフェン、Ｈ１遮断薬、またはＨ２遮断薬のうちの１つ以上を投与することをさらに含み、任意選択で、アセトアミノフェン、Ｈ１遮断薬、またはＨ２遮断薬のうちの１つ以上が、第２の用量のコルチコステロイドと同時に投与される、実施形態４５および４６のいずれか１つの方法または使用のための組成物である。

【００６４】

実施形態４８は、第１の用量のコルチコステロイドが、組成物が投与される約８～２４時間前に経口投与され、第２の用量のコルチコステロイドが、組成物が投与される約１～２時間前に静脈内投与される、先行実施形態のいずれか１つの方法または使用のための組成物である。

10

【００６５】

実施形態４９は、第１の用量のコルチコステロイドが、組成物が投与される約８～２４時間前に経口投与され、第２の用量のコルチコステロイドが、組成物が投与される約１～２時間前に、アセトアミノフェン、Ｈ１遮断薬およびＨ２遮断薬の投与と同時に静脈内投与される、先行実施形態のいずれか１つの方法または使用のための組成物である。

【００６６】

実施形態５０は、コルチコステロイドが、デキサメタゾンであり、組成物が対象に投与される約８～２４時間前に、第１の用量のデキサメタゾンが、約６～１０ｍｇの量で、対象に経口投与され、第２の用量のデキサメタゾンが、約８～１２ｍｇの量で、組成物が対象に投与される約１～２時間前に、アセトアミノフェンの経口投与ならびにＨ１遮断薬およびＨ２遮断薬の静脈内投与と同時に、対象に静脈内投与され、任意選択で、Ｈ１遮断薬がジフェンヒドラミンであり、Ｈ２遮断薬がラニチジンであり、かつ／または任意選択で、対象がヒトである、先行実施形態のいずれか１つの方法または使用のための組成物である。

20

【００６７】

実施形態５１は、コルチコステロイドが、デキサメタゾンであり、組成物が対象に投与される約８～２４時間前に、第１の用量のデキサメタゾンが、８ｍｇの量で、対象に経口投与され、第２の用量のデキサメタゾンが、１０ｍｇの量で、組成物が対象に投与される約１～２時間前に、アセトアミノフェンの経口投与ならびにＨ１遮断薬およびＨ２遮断薬の静脈内投与と同時に、対象に静脈内投与され、任意選択で、Ｈ１遮断薬がジフェンヒドラミンであり、Ｈ２遮断薬がラニチジンである、先行実施形態のいずれか１つの方法または使用のための組成物である。

30

【００６８】

実施形態５２は、組成物が、３ｍｇ／ｋｇの量で約１．５～６時間、注入によって投与され、第１の用量のコルチコステロイドが、組成物が注入される約８～２４時間前に経口投与され、第２の用量のコルチコステロイドが、組成物が注入される約１～２時間前に静脈内投与される、先行実施形態のいずれか１つの方法または使用のための組成物である。

40

【００６９】

実施形態５３は、コルチコステロイドを投与することで、ガイドＲＮＡを含む組成物の許容性を改善する、先行実施形態のいずれか１つの方法または使用のための組成物である。

【００７０】

実施形態５４は、コルチコステロイドを投与することで、ガイドＲＮＡを含む組成物に応答して、炎症、吐き気、嘔吐、血中ＡＬＴ濃度の上昇、高熱症、および／または痛覚過敏のうちの１つ以上の発生率または重症度を低減する、先行実施形態のいずれか１つの方法または使用のための組成物である。

【００７１】

実施形態５５は、コルチコステロイドを投与することで、ガイドＲＮＡを含む組成物に

50

応答して、1つ以上のインターフェロンおよび／または炎症性サイトカインの産生または活性を低減または阻害する、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0072】

実施形態56は、組成物が、血清TTRレベルを低減する、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0073】

実施形態57は、組成物の投与前の血清TTRレベルと比較して、血清TTRレベルが少なくとも50%低減される、実施形態56の方法または使用のための組成物である。

【0074】

実施形態58は、組成物の投与前の血清TTRレベルと比較して、50～60%、60～70%、70～80%、80～90%、90～95%、95～98%、98～99%、もしくは99～100%、血清TTRレベルを低減する、実施形態56の方法または使用のための組成物である。

【0075】

実施形態59は、組成物がTTR遺伝子の編集を引き起こす、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0076】

実施形態60は、編集が、編集される集合体のパーセンテージ（編集パーセント）として計算される、実施形態59の方法または使用のための組成物である。

【0077】

実施形態61は、編集パーセントが、集合体の30～99%である、実施形態60の方法または使用のための組成物である。

【0078】

実施形態62は、編集パーセントが、集合体の30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または95～99%である、実施形態61の方法または使用のための組成物である。

【0079】

実施形態63は、組成物が、少なくとも1つの組織におけるアミロイド沈着を低減する、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0080】

実施形態64は、少なくとも1つの組織が、胃、結腸、坐骨神経、または後根神経節のうちの1つ以上を含む、実施形態63の方法または使用のための組成物である。

【0081】

実施形態65は、アミロイド沈着が、組成物の投与の8週間後に測定される、実施形態63または64のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0082】

実施形態66は、アミロイド沈着が、陰性対照、または組成物の投与前に測定されるレベルと比較される、実施形態63～65のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0083】

実施形態67は、アミロイド沈着が、生検試料において、および／または免疫染色によって測定される、実施形態63～66のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0084】

実施形態68は、アミロイド沈着が、陰性対照においてみられるアミロイド沈着の30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または95～99%低減する、実施形態63～67のいずれか1つの

10

20

30

40

50

方法または使用のための組成物である。

【0085】

実施形態69は、アミロイド沈着が、組成物の投与前にみられるアミロイド沈着の30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または95～99%低減する、実施形態63～68のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0086】

実施形態70は、組成物が、少なくとも2回投与または送達される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0087】

実施形態71は、組成物が、少なくとも3回投与または送達される、実施形態70の方法または使用のための組成物である。

【0088】

実施形態72は、組成物が、少なくとも4回投与または送達される、実施形態70の方法または使用のための組成物である。

【0089】

実施形態73は、組成物が、最大5回、6回、7回、8回、9回、または10回投与または送達される、実施形態70の方法または使用のための組成物である。

【0090】

実施形態74は、投与または送達が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15日間の間隔で行われる、実施形態70～73のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0091】

実施形態75は、投与または送達が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15週間の間隔で行われる、実施形態70～73のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0092】

実施形態76は、投与または送達が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヶ月間の間隔で行われる、実施形態70～73のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0093】

実施形態77は、ガイド配列が、配列番号5～82から選択される、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0094】

実施形態78は、ガイドRNAが、ヒトTTR遺伝子に存在する標的配列に少なくとも部分的に相補的である、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0095】

実施形態79は、標的配列が、ヒトTTR遺伝子のエクソン1、2、3、または4の中にある、実施形態78の方法または組成物である。

【0096】

実施形態80は、標的配列が、ヒトTTR遺伝子のエクソン1の中にある、実施形態78の方法または組成物である。

【0097】

実施形態81は、標的配列が、ヒトTTR遺伝子のエクソン2の中にある、実施形態78の方法または組成物である。

【0098】

実施形態82は、標的配列が、ヒトTTR遺伝子のエクソン3の中にある、実施形態78の方法または組成物である。

【0099】

10

20

30

40

50

実施形態 83 は、標的配列が、ヒト TTR 遺伝子のエクソン 4 中にある、実施形態 78 の方法または組成物である。

【0100】

実施形態 84 は、ガイド配列が、TTR のプラス鎖内の標的配列に対して相補的である、先行実施形態のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0101】

実施形態 85 は、ガイド配列が、TTR のマイナス鎖内の標的配列に対して相補的である、実施形態 1 ～ 83 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0102】

実施形態 86 は、第 1 のガイド配列が、TTR 遺伝子のプラス鎖内の第 1 の標的配列に対して相補的であり、組成物が、TTR 遺伝子のマイナス鎖内の第 2 の標的配列に対して相補的である第 2 のガイド配列をさらに含む、実施形態 1 ～ 83 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

10

【0103】

実施形態 87 は、ガイド RNA が、デュアルガイド (dgRNA) である、先行実施形態のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0104】

実施形態 88 は、ガイド RNA が、シングルガイド (sgRNA) である、実施形態 1 ～ 86 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0105】

実施形態 89 は、sgRNA が、配列番号 5 ～ 82 のガイド配列および配列番号 3 のヌクレオチド 21 ～ 100 のうちのいずれか 1 つを含む、実施形態 88 の方法または組成物である。

20

【0106】

実施形態 90 は、sgRNA が、配列番号 87 ～ 124 から選択される配列と少なくとも 99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、94 %、93 %、92 %、91 %、もしくは 90 % 同一であるガイド配列を含む、実施形態 88 および 89 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0107】

実施形態 91 は、sgRNA が、配列番号 87 ～ 124 から選択される配列を含む、実施形態 88 の方法または組成物である。

30

【0108】

実施形態 92 は、ガイド RNA が、少なくとも 1 つの修飾を含む、先行実施形態のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0109】

実施形態 93 は、少なくとも 1 つの修飾が、2' - O - メチル (2' - O - Me) 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 92 の方法または組成物である。

【0110】

実施形態 94 は、少なくとも 1 つの修飾が、ヌクレオチド間ホスホロチオエート (PS) 結合を含む、実施形態 92 または 93 の方法または組成物である。

40

【0111】

実施形態 95 は、少なくとも 1 つの修飾が、2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 92 ～ 94 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0112】

実施形態 96 は、少なくとも 1 つの修飾が、5' 末端修飾、3' 末端修飾、または 5' および 3' 末端修飾を含む、実施形態 92 ～ 95 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0113】

実施形態 97 は、少なくとも 1 つの修飾が、5' 末端における最初の 5 個のヌクレオチドのうちの 1 つ以上における修飾を含む、実施形態 92 ～ 96 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

50

【0114】

実施形態98は、少なくとも1つの修飾が、3'末端における最後の5個のヌクレオチドのうちの1つ以上における修飾を含む、実施形態92～97のいずれか1つの方法または組成物である。

【0115】

実施形態99は、少なくとも1つの修飾が、最初の4個のヌクレオチド間のPS結合を含む、実施形態92～98のいずれか1つの方法または組成物である。

【0116】

実施形態100は、少なくとも1つの修飾が、最後の4個のヌクレオチド間のPS結合を含む、実施形態92～99のいずれか1つの方法または組成物である。

10

【0117】

実施形態101は、少なくとも1つの修飾が、5'末端における最初の3個のヌクレオチドに2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含む、実施形態92～100のいずれか1つの方法または組成物である。

【0118】

実施形態102は、少なくとも1つの修飾が、3'末端における最後の3個のヌクレオチドに2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含む、実施形態92～101のいずれか1つの方法または組成物である。

【0119】

実施形態103は、ガイドRNAが、配列番号3の修飾ヌクレオチドを含む、実施形態92～102のいずれか1つの方法または組成物である。

20

【0120】

実施形態104は、組成物が、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0121】

実施形態105は、ガイドRNAが、脂質ナノ粒子(LNP)と会合している、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0122】

実施形態106は、LNPが、イオン化可能な脂質を含む、実施形態105の方法または組成物である。

30

【0123】

実施形態107は、LNPが、生分解性イオン化脂質を含む、実施形態106の方法または組成物である。

【0124】

実施形態108は、LNPが、アミン脂質、例えば、CCD脂質を含む、実施形態105～017のいずれか1つの方法または組成物である。

【0125】

実施形態109は、LNPが、ヘルパー脂質を含む、実施形態105～108のいずれか1つの方法または組成物である。

【0126】

40

実施形態110は、LNPが、ステルス脂質を含み、任意選択で、
(i) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約50～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約8～10mol%の中性脂質と、約2.5～4mol%のステルス脂質(例えば、PEG脂質)とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約6であり、
(ii) LNPが、約50～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約27～39.5mol%のヘルパー脂質と、約8～10mol%の中性脂質と、約2.5～4mol%のステルス脂質(例えば、PEG脂質)とを含み、LNP組成物のN/P比が、約5～7(例えば、約6)であり、
(iii) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約50～60mol%の脂質Aなど

50

のアミン脂質と、約5～15mol%の中性脂質と、約2.5～4mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が約3～10であり、

(iv) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約40～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約5～15mol%の中性脂質と、約2.5～4mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約6であり、

(v) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約50～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約5～15mol%の中性脂質と、約1.5～10mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約6であり、

10

(vi) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約40～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約0～10mol%の中性脂質と、約1.5～10mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約3～10であり、

(vii) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約40～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約1mol%未満の中性脂質と、約1.5～10mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が約3～10であり、

(viii) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約40～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約1.5～10mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が約3～10であり、LNP組成物が、中性リン脂質を本質的に含まないか、または含まず、あるいは

20

(ix) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約50～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約8～10mol%の中性脂質と、約2.5～4mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が約3～7である、実施形態105～109のいずれか1つの方法または組成物である。

【0127】

実施形態111は、LNPが、中性脂質を含む、実施形態105～110のいずれか1つの方法または組成物である。

30

【0128】

実施形態112は、アミン脂質が、約50mol%で存在する、実施形態105～111のいずれか1つの方法または組成物である。

【0129】

実施形態113は、中性脂質が、約9mol%で存在する、実施形態105～112のいずれか1つの方法または組成物である。

【0130】

実施形態114は、ステルス脂質が、約3mol%で存在する、実施形態105～113のいずれか1つの方法または組成物である。

40

【0131】

実施形態115は、ヘルパー脂質が、約38mol%で存在する、実施形態105～114のいずれか1つの方法または組成物である。

【0132】

実施形態116は、LNP組成物のN/P比が、約6である、実施形態105～115のいずれか1つの方法または組成物である。

【0133】

実施形態117は、LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約50mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約9mol%のDSPCなどの中性脂質と、約3mol%のPEG脂質などのステルス脂質（例えば、PEG2k-DMG）とを含み、脂質成分の残りが、

50

コレステロールなどのヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約6である、実施形態105～116のいずれか1つの方法または組成物である。

【0134】

実施形態118は、アミン脂質が、脂質Aである、実施形態105～117のいずれか1つの方法または組成物である。

【0135】

実施形態119は、中性脂質が、DSPCである、実施形態105～118のいずれか1つの方法または組成物である。

【0136】

実施形態120は、ステルス脂質が、PEG2k-DMGである、実施形態105～119のいずれか1つの方法または組成物である。

【0137】

実施形態121は、ヘルパー脂質が、コレステロールである、実施形態105～120のいずれか1つの方法または組成物である。

【0138】

実施形態122は、LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約50mol%の脂質Aと、約9mol%のDSPCと、約3mol%のPEG2k-DMGとを含み、脂質成分の残りが、コレステロールであり、LNP組成物のN/P比が、約6である、実施形態105～121のいずれか1つの方法または組成物である。

【0139】

実施形態123は、組成物が、RNAガイドDNA結合剤をさらに含む、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0140】

実施形態124は、組成物が、RNAガイドDNA結合剤をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0141】

実施形態125は、ポリヌクレオチドが、mRNAである、実施形態124の方法または組成物である。

【0142】

実施形態126は、RNAガイドDNA結合剤が、Casクリパーゼである、実施形態123～125のいずれか1つの方法または組成物である。

【0143】

実施形態127は、RNAガイドDNA結合剤が、II型CRISPR/Cas系由来のCasである、実施形態123～126のいずれか1つの方法または組成物である。

【0144】

実施形態128は、RNAガイドDNA結合剤が、Cas9である、実施形態123～127のいずれか1つの方法または組成物である。

【0145】

実施形態129は、RNAガイドDNA結合剤が、S. pyogenes Cas9ヌクレアーゼである、実施形態128の方法または組成物である。

【0146】

実施形態130は、ポリヌクレオチドが、RNAガイドDNA結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含み、

a. オープンリーディングフレームが、配列番号311と少なくとも95%の同一性を有する配列を含み、

b. オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の30、50、70、100、150、200、250、もしくは300個のヌクレオチドにわたって配列番号311と少なくとも95%の同一性を有し、

c. オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも75%が表4に列挙されるコドンである、コドンのセットからなり、

10

20

30

40

50

d. オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の150%の範囲であり、かつ／あるいは

e. オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の150%の範囲である、実施形態124～129のいずれか1つの方法または組成物である。

【0147】

実施形態131は、オープンリーディングフレームが、その配列の少なくともその最初の10%、12%、15%、20%、25%、30%、または35%にわたって配列番号311と少なくとも95%の同一性を有する、実施形態130の組成物または方法である。

【0148】

実施形態132は、オープンリーディングフレームが、配列番号311と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%の同一性を有する配列を含む、実施形態130または131の組成物または方法である。

【0149】

実施形態133は、オープンリーディングフレームのコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%が、表4に列挙されるコドンである、実施形態130～132のいずれか1つの組成物または方法である。

【0150】

実施形態134は、オープンリーディングフレームが、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の101%、102%、103%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、または150%の範囲である、実施形態130～133のいずれか1つの組成物または方法である。

【0151】

実施形態135は、オープンリーディングフレームが、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の101%、102%、103%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、または150%の範囲である、実施形態130～134のいずれか1つの組成物または方法である。

【0152】

実施形態136は、ポリヌクレオチドが、配列番号232、234、236、238、241、または275～277のいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する5' UTRを含む、実施形態124～135のいずれか1つの組成物または方法である。

【0153】

実施形態137は、ポリヌクレオチドが、配列番号233、235、237、239、または240のいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する3' UTRを含む、実施形態124～136のいずれか1つの組成物または方法である。

【0154】

実施形態138は、ポリヌクレオチドが、同じ供給源からの5' UTRおよび3' UTRを含む、実施形態124～137のいずれか1つの組成物または方法である。

【0155】

実施形態139は、ポリヌクレオチドが、Cap0、Cap1、およびCap2から選択される5' キャップを含む、実施形態124～138のいずれか1つの組成物または方法である。

【0156】

実施形態140は、オープンリーディングフレームが、配列番号311と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%の同一性を有する配列を含む、実施形態124～139のいずれか1つの組成物または方法である。

【0157】

実施形態141は、mRNA中のウリジンの少なくとも10%が、修飾ウリジンで置換

10

20

30

40

50

されている、実施形態 1 2 5 ~ 1 4 0 のいずれかの組成物または方法である。

【0 1 5 8】

実施形態 1 4 2 は、修飾ウリジンが、N 1 -メチル-シュードウリジン、シュードウリジン、5 -メトキシウリジン、または 5 -ヨードウリジンのうちの 1 つ以上である、実施形態 1 4 1 の組成物または方法である。

【0 1 5 9】

実施形態 1 4 3 は、修飾ウリジンが、N 1 -メチル-シュードウリジンまたは 5 -メトキシウリジンのうちの片方または両方である、実施形態 1 4 1 の組成物または方法である。

【0 1 6 0】

実施形態 1 4 4 は、修飾ウリジンが、N 1 -メチル-シュードウリジンである、実施形態 1 4 1 の組成物または方法である。

10

【0 1 6 1】

実施形態 1 4 5 は、修飾ウリジンが、5 -メトキシウリジンである、実施形態 1 4 1 の組成物または方法である。

【0 1 6 2】

実施形態 1 4 6 は、ウリジンの 1 5 % ~ 4 5 % が、修飾ウリジンで置換されている、実施形態 1 4 1 ~ 1 4 5 のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【0 1 6 3】

実施形態 1 4 7 は、ウリジンの少なくとも 2 0 % または少なくとも 3 0 % が、修飾ウリジンで置換されている、実施形態 1 4 1 ~ 1 4 6 のいずれか 1 つの組成物または方法である。

20

【0 1 6 4】

実施形態 1 4 8 は、ウリジンの少なくとも 8 0 % または少なくとも 9 0 % が、修飾ウリジンで置換されている、実施形態 1 4 7 の組成物または方法である。

【0 1 6 5】

実施形態 1 4 9 は、ウリジンの 1 0 0 % が、修飾ウリジンで置換されている、実施形態 1 4 7 の組成物または方法である。

【0 1 6 6】

実施形態 1 5 0 は、RNA ガイド DNA 結合剤が修飾されている、実施形態 1 2 3 ~ 1 4 9 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

30

【0 1 6 7】

実施形態 1 5 1 は、修飾 RNA ガイド DNA 結合剤が、核局在化シグナル (NLS) を含む、実施形態 1 5 0 の方法または組成物である。

【0 1 6 8】

実施形態 1 5 2 は、組成物が、薬学的製剤であり、薬学的に許容される担体をさらに含む、先行実施形態のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0 1 6 9】

実施形態 1 5 3 は、組成物が、TTR を含むアミロイドまたはアミロイド原線維を低減または予防する、先行実施形態のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0 1 7 0】

実施形態 1 5 4 は、アミロイドまたはアミロイド原線維が、神経、心臓、または消化管内のものである、実施形態 1 5 3 の方法または使用のための組成物である。

40

【0 1 7 1】

実施形態 1 5 5 は、非相同性末端結合 (NHEJ) が、TTR 遺伝子における DSB の修復中に変異を引き起こす、先行実施形態のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0 1 7 2】

実施形態 1 5 6 は、NHEJ が、TTR 遺伝子における DSB の修復中にヌクレオチドの欠失または挿入を引き起こす、実施形態 1 5 5 の方法または使用のための組成物である。

【0 1 7 3】

50

実施形態 157 は、ヌクレオチドの欠失または挿入が、TTR 遺伝子においてフレームシフトまたはナンセンス変異を誘導する、実施形態 156 の方法または使用のための組成物である。

【0174】

実施形態 158 は、フレームシフトまたはナンセンス変異が、肝臓細胞の少なくとも 50% の TTR 遺伝子において誘導される、実施形態 155 または 156 の方法または使用のための組成物である。

【0175】

実施形態 159 は、フレームシフトまたはナンセンス変異が、肝臓細胞の 50% ~ 60%、60% ~ 70%、70% または 80%、80% ~ 90%、90 ~ 95%、95% ~ 99%、または 99% ~ 100% の TTR 遺伝子において誘導される、実施形態 158 の方法または使用のための組成物である。

10

【0176】

実施形態 160 は、ヌクレオチドの欠失または挿入が、TTR 遺伝子において、オフターゲット部位におけるよりも少なくとも 50 倍以上生じる、実施形態 156 ~ 159 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0177】

実施形態 161 は、ヌクレオチドの欠失または挿入が、TTR 遺伝子において、オフターゲット部位におけるよりも 50 倍 ~ 150 倍、150 倍 ~ 500 倍、500 倍 ~ 1500 倍、1500 倍 ~ 5000 倍、5000 倍 ~ 15000 倍、15000 倍 ~ 30000 倍、または 30000 倍 ~ 60000 倍多く生じる、実施形態 160 の方法または使用のための組成物である。

20

【0178】

実施形態 162 は、ヌクレオチドの欠失または挿入が、初代ヒト肝細胞において 3 個以下、2 個以下、1 個以下、または 0 個のオフターゲット部位で生じ、任意選択で、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域では生じない、実施形態 156 ~ 161 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0179】

実施形態 163 は、ヌクレオチドの欠失または挿入が、Cas9 を過剰発現する細胞においてヌクレオチドの欠失または挿入が生じるオフターゲット部位の数より少ない数の初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位で生じ、任意選択で、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域内で発生しない、実施形態 162 の方法または使用のための組成物である。

30

【0180】

実施形態 164 は、Cas9 を過剰発現する細胞が、Cas9 を安定して発現する HEK293 細胞である、実施形態 163 の方法または使用のための組成物である。

【0181】

実施形態 165 は、初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位の数が、Cas9 mRNA およびガイド RNA でインビトロでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞由来のゲノム DNA を分析することによって決定され、任意選択で、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域内で発生しない、実施形態 162 ~ 164 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

40

【0182】

実施形態 166 は、初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位の数が、Cas9 mRNA、ガイド RNA およびドナーオリゴヌクレオチドでインビトロでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞由来のゲノム DNA を分析することを含むオリゴヌクレオチド挿入アッセイによって決定され、任意選択で、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域内で発生しない、実施形態 162 ~ 164 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0183】

50

実施形態 167 は、ガイド RNA の配列が、

- a) 配列番号 92 もしくは 104、
- b) 配列番号 87、89、96、もしくは 113、
- c) 配列番号 100、102、106、111、もしくは 112、または
- d) 配列番号 88、90、91、93、94、95、97、101、103、108、もしくは 109 であり、

【0184】

任意選択で、ガイド RNA が、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域内で発生するオフターゲット部位でインデルを生成しない、先行実施形態のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0185】

実施形態 168 は、組成物を投与することで、対象における TTR のレベルを低減する、先行実施形態のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0186】

実施形態 169 は、TTR のレベルが、少なくとも 50% 低減する、実施形態 168 の方法または使用のための組成物である。

【0187】

実施形態 170 は、TTR のレベルが、50%~60%、60%~70%、70%または 80%、80%~90%、90~95%、95%~99%、または 99%~100% 低減する、実施形態 169 の方法または使用のための組成物である。

【0188】

実施形態 171 は、TTR のレベルが、血清、血漿、血液、脳脊髄液、または喀痰において測定される、実施形態 168 または 169 の方法または使用のための組成物である。

【0189】

実施形態 172 は、TTR のレベルが、肝臓、脈絡叢、および／または網膜において測定される、実施形態 168 または 169 の方法または使用のための組成物である。

【0190】

実施形態 173 は、TTR のレベルが、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) を介して測定される、実施形態 168~172 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0191】

実施形態 174 は、対象が ATTR を有する、先行実施形態のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0192】

実施形態 175 は、対象が、ヒトである、先行実施形態のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0193】

実施形態 176 は、対象が、ATTRwt を有する、実施形態 174 または 175 の方法または使用のための組成物である。

【0194】

実施形態 177 は、対象が、遺伝性 ATTR を有する、実施形態 174 または 175 の方法または使用のための組成物である。

【0195】

実施形態 178 は、対象が、ATTR の家族歴を有する、先行実施形態のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0196】

実施形態 179 は、対象が、家族性アミロイドポリニューロパチーを有する、先行実施形態のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0197】

実施形態 180 は、対象が、ATTR の神経症状のみ、または主に ATTR の神経症状

10

20

30

40

50

を有する、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0198】

実施形態181は、対象が、家族性アミロイド心筋症を有する、実施形態1～179のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0199】

実施形態182は、対象が、ATTRの心臓症状のみ、または主にATTRの心臓症状を有する、実施形態1～179または181のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0200】

実施形態183は、対象が、V30変異を有するTTRを発現する、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

10

【0201】

実施形態184は、V30変異が、V30A、V30G、V30L、またはV30Mである、実施形態183の方法または使用のための組成物である。

【0202】

実施形態185は、対象が、T60変異を有するTTRを発現する、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0203】

実施形態186は、T60変異が、T60Aである、実施形態185の方法または使用のための組成物である。

20

【0204】

実施形態187は、対象が、V122変異を有するTTRを発現する、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0205】

実施形態188は、V122変異が、V122A、V122I、またはV122(－)である、実施形態187の方法または使用のための組成物である。

【0206】

実施形態189は、対象が、野生型TTRを発現する、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0207】

実施形態190は、対象が、V30、T60、またはV122変異を有するTTRを発現しない、実施形態1～182、または189の実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

30

【0208】

実施形態191は、対象が、病的な変異を有するTTRを発現しない、実施形態1～182、または189～190のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0209】

実施形態192は、対象が、野生型TTRについてホモ接合である、実施形態190～192のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0210】

実施形態193は、対象が、投与後に、感覚運動ニューロパチーの症状が改善し、安定化し、または変化が遅くなる、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

40

【0211】

実施形態194は、感覚運動ニューロパチーが改善し、安定化し、または変化が遅くなることが、筋電図、神経伝導検査、または患者が報告する転帰を使用して測定される、実施形態193の方法または使用のための組成物である。

【0212】

実施形態195は、対象が、うっ血性心不全の症状が改善し、安定化し、または変化が遅くなる、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

50

【0213】

実施形態196は、うっ血性心不全が改善し、安定化し、または変化が遅くなることが、心臓バイオマーカー検査、肺機能検査、胸部x線、または心電図法を使用して測定される、実施形態195の方法または使用のための組成物である。

【0214】

実施形態197は、組成物または薬学的製剤が、ウイルスペクターを介して投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0215】

実施形態198は、組成物または薬学的製剤が、脂質ナノ粒子を介して投与される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

10

【0216】

実施形態199は、対象が、組成物または製剤を投与する前に、TTR遺伝子内の特定の変異について試験される、先行実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0217】

実施形態200は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号5である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0218】

実施形態201は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号6である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

20

【0219】

実施形態202は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号7である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0220】

実施形態203は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号8である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0221】

実施形態204は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号9である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0222】

実施形態205は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号10である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

30

【0223】

実施形態206は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号11である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0224】

実施形態207は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号12である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0225】

実施形態208は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号13である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

40

【0226】

実施形態209は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号14である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0227】

実施形態210は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号15である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0228】

実施形態211は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号16である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

50

【0229】

実施形態212は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号17である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0230】

実施形態213は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号18である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0231】

実施形態214は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号19である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0232】

実施形態215は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号20である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0233】

実施形態216は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号21である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0234】

実施形態217は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号22である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0235】

実施形態218は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号23である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0236】

実施形態219は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号24である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0237】

実施形態220は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号25である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0238】

実施形態221は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号26である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0239】

実施形態222は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号27である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0240】

実施形態223は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号28である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0241】

実施形態224は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号29である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0242】

実施形態225は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号30である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0243】

実施形態226は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号31である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0244】

実施形態227は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号32である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0245】

実施形態228は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号33である、実

10

20

30

40

50

施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0246】

実施形態 229 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 34 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0247】

実施形態 230 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 35 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0248】

実施形態 231 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 36 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0249】

実施形態 232 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 37 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0250】

実施形態 233 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 38 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0251】

実施形態 234 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 39 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0252】

実施形態 235 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 40 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0253】

実施形態 236 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 41 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0254】

実施形態 237 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 42 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0255】

実施形態 238 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 43 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0256】

実施形態 239 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 44 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0257】

実施形態 240 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 45 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0258】

実施形態 241 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 46 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0259】

実施形態 242 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 47 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0260】

実施形態 243 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 48 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0261】

実施形態 244 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 49 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0262】

10

20

30

40

50

実施形態 245 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 50 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0263】

実施形態 246 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 51 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0264】

実施形態 247 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 52 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0265】

実施形態 248 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 53 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

10

【0266】

実施形態 249 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 54 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0267】

実施形態 250 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 55 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0268】

実施形態 251 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 56 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

20

【0269】

実施形態 252 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 57 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0270】

実施形態 253 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 58 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0271】

実施形態 254 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 59 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0272】

実施形態 255 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 60 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

30

【0273】

実施形態 256 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 61 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0274】

実施形態 257 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 62 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0275】

実施形態 258 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 63 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

40

【0276】

実施形態 259 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 64 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0277】

実施形態 260 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 65 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0278】

実施形態 261 は、配列番号 5 ～ 82 から選択される配列が、配列番号 66 である、実施形態 1 ～ 199 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

50

【0279】

実施形態262は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号67である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0280】

実施形態263は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号68である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0281】

実施形態264は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号69である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0282】

実施形態265は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号70である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0283】

実施形態266は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号71である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0284】

実施形態267は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号72である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0285】

実施形態268は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号73である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0286】

実施形態269は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号74である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0287】

実施形態270は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号75である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0288】

実施形態271は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号76である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0289】

実施形態272は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号77である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0290】

実施形態273は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号78である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0291】

実施形態274は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号79である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0292】

実施形態275は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号80である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0293】

実施形態276は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号81である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0294】

実施形態277は、配列番号5～82から選択される配列が、配列番号82である、実施形態1～199のいずれか1つの方法または組成物である。

【0295】

実施形態278は、ATTRを有するヒト対象を治療するための医薬の調製のための、

10

20

30

40

50

先行実施形態のいずれかの組成物または製剤の使用である。

【図面の簡単な説明】

【0296】

【図1】表1に提供されるガイド配列によって標的化されるTTR遺伝子の領域を有する染色体18の概略図を示す。

【図2】TTRを標的とする特定のデュアルガイドRNAのHEK293_Cas9細胞におけるオフターゲット分析を示す。オンターゲット部位は、試験した各デュアルガイドRNAについて塗りつぶした正方形によって指定されるが、黒色の丸は、潜在的なオフターゲット部位を表す。

【図3】TTRを標的とする特定のシングルガイドRNAのHEK_Cas9細胞におけるオフターゲット分析を示す。オンターゲット部位は、試験した各シングルガイドRNAについて塗りつぶした正方形によって指定されるが、白色の丸は、潜在的なオフターゲット部位を表す。

10

【図4】初代ヒト肝細胞における脂質ナノ粒子製剤化ヒトTTR特異的sgRNAの用量応答曲線を示す。

【図5】初代カニクイザル肝細胞における脂質ナノ粒子製剤化ヒトTTR特異的sgRNAの用量応答曲線を示す。

【図6】初代カニクイザル肝細胞における脂質ナノ粒子製剤化カニクイザルTTR特異的sgRNAの用量応答曲線を示す。

【図7】x軸上に提供されるHUH7細胞配列における、ガイド投与後のTTRの編集パーセント(%編集)および分泌TTRの低減を示す。値は、アルファ-1-抗トリプシン(AAT)タンパク質の量に対して正規化される。

20

【図8】HUH7細胞における標的化されたガイド(表1に列举される)の投与後の細胞内TTRのウェスタンブロット分析を示す。

【図9】ヒト化(G481~G499)またはマウス(G282)TTRを有するマウスへのLNP製剤の投与後に観察されたTTRの肝臓編集のパーセンテージを示す。注:各ガイドIDの最初の3つの「0」は、図から省略されており、例えば、「G481」は、表2および3において「G000481」である。

【図10A】水平軸に示される投薬レジメンの後に観察される血清TTRレベルを、 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として(図10A)、またはTSS対照のパーセンテージとして(図10B)示す。MPK=全体で mg/kg 。

30

【図10B】(上記の通り。)

【図11A】水平軸に示される投薬レジメンの後に観察される血清TTRレベルを、 $1\text{mg}/\text{kg}$ について(図11A)、または $0.5\text{mg}/\text{kg}$ の投薬量について(図11B)示す。単回の $2\text{mg}/\text{kg}$ 用量に関するデータは、両者のパネルの右側の列として含まれる。

【図11B】(上記の通り。)

【図12A】水平軸に示される投薬レジメンの後に観察される肝臓編集パーセンテージを、 $1\text{mg}/\text{kg}$ について(図12A)、または $0.5\text{mg}/\text{kg}$ の投薬量について(図12B)示す。図12Cは、0.5、1、または $2\text{mg}/\text{kg}$ の単回用量の後に観察される肝臓編集パーセンテージを示す。

40

【図12B】(上記の通り。)

【図12C】(上記の通り。)

【図13】TTR遺伝子に関してヒト化したマウスにLNP製剤を投与した後に観察された肝臓編集パーセントを示す。注:各ガイドIDの最初の3つの「0」は、図から省略されており、例えば、「G481」は、表2および3において「G000481」である。

【図14A-14B】TTR遺伝子に関してヒト化したマウスにLNP製剤を投与した後の肝臓編集(図14A)と血清ヒトTTRレベル(図14B)との間に相関関係があることを示す。注:各ガイドIDの最初の3つの「0」は、図から省略されており、例えば、「G481」は、表2および3において「G000481」である。

50

【図15A】マウスとカニクイザルとの間で交差相同であるガイドG502を含むLNP製剤の投与後の野生型マウスにおいて、編集パーセント（図15A）および血清TTRレベル（図15B）に関する用量応答が存在することを示す。

【図15B】（上記の通り。）

【図16】初代カニクイザル肝細胞における脂質ナノ粒子製剤化ヒトTTR特異的sgRNAの用量応答曲線を示す。

【図17】初代ヒト肝細胞における脂質ナノ粒子製剤化カニクイザルTTR特異的sgRNAの用量応答曲線を示す。

【図18】初代カニクイザル肝細胞における脂質ナノ粒子製剤化カニクイザルTTR特異的sgRNAの用量応答曲線を示す。

10

【図19A-19B】血清TTR（TSS%、図19Aおよび図19C）、ならびに示した比率および量でのLNP製剤の投与後の編集結果を示す（図19Bおよび図19D）。

【図19C-19D】（上記の通り。）

【図20】TTRを標的とする初代ヒト肝細胞（PHH）における特定のシングルガイドRNAのオフターゲット分析を示す。グラフにおいて、黒色の四角は、オンターゲット切断部位の特定を表し、一方、白色の丸は、潜在的なオフターゲット部位の特定を表す。

【図21A】脂質ナノ粒子製剤化G000480の投与後の初代ヒト幹細胞におけるオンターゲット（ONT、図21A）および2つのオフターゲット部位（OT2およびOT4）での編集パーセントを示す。

【図21B】図21AにおけるOT2、OT4、および陰性対照（Neg Cont）データの縮尺を変えた態様である。

20

【図21B】（上記の通り。）

【図22A】脂質ナノ粒子製剤化G000486の投与後の初代ヒト幹細胞におけるオンターゲット（ONT、図22A）およびオフターゲット部位（OT4）での編集パーセントを示す。

【図22B】図22AにおけるOT4および陰性対照（Neg Cont）データの縮尺を変えた態様である。

【図22B】（上記の通り。）

【図23A】TTR遺伝子座での編集パーセント（図23A）、ならびに挿入および欠失事象の数（図23B）を示す。図23Aは、対照および治療（脂質ナノ粒子製剤化TTR特異的sgRNAを投与された）群におけるTTR遺伝子座での編集パーセントを示す。図23Bは、編集が図23Aの治療群で観察されたときのTTR遺伝子座での挿入および欠失事象の数を示す。

30

【図23B】（上記の通り。）

【図24A】対照および治療（脂質ナノ粒子製剤化TTR特異的sgRNAを投与された）群について、それぞれ、 $\mu\text{g/mL}$ 単位で、循環血清中のTTRレベル（図24A）および脳脊髄液（CSF）中のTTRレベル（図24B）を示す。治療により、血清中のTTRレベルの99%を超えるノックダウンが生じた。

【図24B】（上記の通り。）

【図25A-25B】対照および治療（脂質ナノ粒子製剤化TTR特異的sgRNAを投与された）マウスからの胃（図25A）、結腸（図25B）、坐骨神経（図25C）、および後根神経節（DRG）（図25D）において、TTRを染色した免疫組織化学画像を示す。右に、棒グラフは、各組織型についての占有面積パーセントによって測定されるような、治療マウスにおいて治療から8週間後のTTR染色の低減を示す。

40

【図25C-25D】（上記の通り。）

【図26A】ガイドに対して1:1の重量比で、様々な用量範囲のガイドG000480、G000488、G000489およびG000502にわたって、Cas9 mRNA（配列番号1）を含有するLNP製剤を投与されたヒト化TTRマウスから、それぞれ、肝臓TTR編集（図26A）および血清TTR結果（ $\mu\text{g/mL}$ 単位で）（図26B）を、ならびにTSS治療対照のパーセンテージとして（図26C）示す。

50

【図26B】（上記の通り。）

【図26C】（上記の通り。）

【図27A】ガイドに対して1：1の重量比で、様々な用量範囲のガイドG000481、G000482、G000486およびG000499にわたって、Cas9 mRNA（配列番号1）を含有するLNP製剤を投与されたヒト化TTRマウスから、それぞれ、肝臓TTR編集（図27A）および血清TTR結果（ $\mu\text{g/mL}$ 単位で）（図27B）を、ならびにTSS治療対照のパーセンテージとして（図27C）示す。

【図27B】（上記の通り。）

【図27C】（上記の通り。）

【図28A】ガイドに対して1：2の重量比で、様々な用量範囲のガイドG000480、G000481、G000486、G000499およびG000502にわたって、Cas9 mRNA（配列番号1）を含有するLNP製剤を投与されたヒト化TTRマウスから、それぞれ、肝臓TTR編集（図28A）および血清TTR結果（ $\mu\text{g/mL}$ 単位で）（図28B）を、ならびにTSS治療対照のパーセンテージとして（図28C）示す。

【図28B】（上記の通り。）

【図28C】（上記の通り。）

【図29】陰性（未治療）対照と比較して、示されるCas9 mRNAおよびgRNAを含むLNPで治療した後の初代ヒト肝細胞（PHH）におけるTTR mRNAの相対的な発現を示す。

【図30】陰性（未治療）対照と比較して、示されるCas9 mRNAおよびgRNAを含むLNPで治療した後の初代ヒト肝細胞（PHH）におけるTTR mRNAの相対的な発現を示す。

【図31A】LNPの30分間投与を、長い投薬プロトコルと比較した、非ヒト霊長類におけるインビボ研究での血清TTRレベル（図31A）、肝臓TTR編集（図31B）、および循環ALTレベル（図31C）を示す。

【図31B】（上記の通り。）

【図31C】（上記の通り。）

【発明を実施するための形態】

【0297】

ここで、本発明の特定の実施形態を詳細に参照し、本発明の実施形態の例は添付の図面に例示される。本発明は例示される実施形態と併せて説明されるが、それらは、本発明をそれらの実施形態に限定することを意図するものではないことが理解されるであろう。これとは逆に、本発明は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明内に含まれ得る、すべての代替物、修飾物、および均等物を網羅することが意図される。

【0298】

本教示を詳細に説明する前に、本開示は、特定の組成物またはプロセスステップに限定されるものではなく、したがって変化し得ると理解されるべきである。本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の参照物を含めることに留意されたい。したがって、例えば、「コンジュゲート(conjugate)」への言及は、複数のコンジュゲートを含み、「細胞(cell)」への言及は、複数の細胞を含むなどである。

【0299】

数値範囲には、その範囲を定義する数値が含まれる。測定値および測定可能な値は、有意な桁および測定に関連する誤差を考慮して、およそその値であると理解される。また、「含む(comprise)」、「含む(comprises)」、「含む(comprising)」、「含有する(contain)」、「含有する(contains)」、「含有する(containing)」、「含む(include)」、「含む(includes)」、および「含む(including)」の使用は、限定することを意図するものではない。上述の概略的な説明と、以下の詳細な説明はいずれも例示であり、

単に説明するためのものであり、その教示を限定するものではないことが理解されるべきである。

【0300】

上の明細書に特に記載されていない限り、様々な構成要素を「含む (comprising)」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素「からなる」か、またはそれら「から本質的になる」ものであると想定される。様々な構成要素「からなる」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素を「含む (comprising)」か、またはそれら「から本質的になる」ものであると想定される。様々な構成要素「から本質的になる」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素「からなる」か、またはそれらを「含む (comprising)」ものであると想定される (この互換性は、特許請求の範囲におけるこれらの用語の使用には適用されない)。「または」という用語は、文脈が別途明確に示さない限り、包括的な意味で、すなわち、「および／または」に等しい意味で使用される。

10

【0301】

本明細書で使用される章の見出しは、構成的な目的のみのためであり、所望の主題を決して限定するものとして解釈されるべきではない。参照により組み込まれる任意の材料が、本明細書で定義される任意の用語または本明細書の任意の他の明示的な内容と矛盾する場合、本明細書が優先する。本教示を様々な実施形態と併せて記載するが、本教示をそのような実施形態に限定することを意図するものではない。逆に、本教示は、当業者によって理解されるように、様々な代替物、修飾物、および均等物を包含する。

20

【0302】

I. 定義

特に明記しない限り、本明細書で使用される以下の用語および句は、以下の意味を有することを意図する。

【0303】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、骨格に沿って一緒に連結された窒素系複素環式塩基または塩基類似体を有するヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体 (従来の RNA、DNA、混合 RNA-DNA、およびそれらの類似体であるポリマーを含む) を含む多量体化合物を指すために本明細書で使用される。核酸「骨格」は、糖ホスホジエステル連結、ペプチド-核酸結合 (「ペプチド核酸」または PNA、PCT 第 WO 95/32305 号)、ホスホロチオエート連結、メチルホスホネート連結、またはそれらの組み合わせのうちの 1 つ以上を含む、様々な連結から構成され得る。核酸の糖部分は、リボース、デオキシリボース、または置換、例えば、2' メトキシまたは 2' ハロゲン化物置換を有する類似の化合物であり得る。窒素系塩基は、従来の塩基 (A、G、C、T、U)、その類似体 (例えば、5-メトキシウリジン、シュードウリジン、もしくは N1-メチルシュードウリジン等の修飾ウリジン)、イノシン、プリンもしくはピリミジンの誘導体 (例えば、N4-メチルデオキシグアノシン、デアザーもしくはアザプリン、デアザーもしくはアザピリミジン、5 位もしくは 6 位に置換基を有するピリミジン塩基 (例えば、5-メチルシトシン)、2、6、もしくは 8 位に置換基を有するプリン塩基、2-アミノ-6-メチルアミノプリン、O6-メチルグアニン、4-チオ-ピリミジン、4-アミノ-ピリミジン、4-ジメチルヒドラジン-ピリミジン、および O4-アルキル-ピリミジン、米国特許第 5,378,825 号および PCT 第 WO 93/13121 号) であってもよい。一般的な考察については、The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36、Adams et al., ed., 11th ed., 1992 を参照)。核酸は、骨格がポリマーの位置に窒素系塩基を含まない 1 つ以上の「脱塩基」残基を含み得る (米国特許第 5,585,481 号)。核酸は、従来の RNA もしくは DNA 糖、塩基および連結のみを含んでいてもよく、または従来の構成要素および置換の両方 (例えば、2' メトキシ連結を有する従来の塩基、または従来の塩基および 1 つ以上の塩基類似体の両方を含有するポリマー) を含むことができる。核酸は、RNA 模倣糖構造にロックされた二環式フラノース単位を有し、相補的な RNA および DNA 配列に対す

30

40

50

るハイブリダイゼーション親和性を高める、1つ以上のLNAヌクレオチドモノマーを含む類似体である「ロックド核酸」(LNA)を含む(Vester and Wengel, 2004, Biochemistry 43(42):13233-41)。RNAおよびDNAは異なる糖部分を有し、RNA内のウラシルもしくはその類似体およびDNA内のチミンもしくはその類似体の存在によって異なり得る。

【0304】

本明細書で使用される「ポリペプチド」は、三次元立体配座を採用することができるアミノ酸残基を含む多量体化合物を指す。ポリペプチドには、限定されないが、酵素、酵素前駆体タンパク質、調節タンパク質、構造タンパク質、受容体、核酸結合タンパク質、抗体などが含まれる。ポリペプチドは、翻訳後修飾、非天然アミノ酸、人工基などを含んでよいが、必ずしもそうではない。

【0305】

「ガイドRNA」、「gRNA」、および「ガイド」は、crRNA(CRISPR RNAとしても既知である)、またはcrRNAおよびtrRNAの組み合わせ(tracrRNAとしても既知である)のいずれかを指すために、本明細書で互換的に使用される。crRNAおよびtrRNAは、一本鎖RNA分子(シングルガイドRNA、sgRNA)として会合し得るか、または2つの別々のRNA分子(デュアルガイドRNA、dgRNA)において会合し得る。「ガイドRNA」または「gRNA」は、各種類を指す。trRNAは、天然に存在する配列、または天然に存在する配列と比較して修飾もしくは多様性を有するtrRNA配列であり得る。ガイドRNAは、本明細書に記載されるような修飾RNAを含み得る。

【0306】

本明細書で使用される場合、「ガイド配列」は、標的配列に対して相補的であり、RNAガイドDNA結合剤による結合または修飾(例えば、開裂)のための標的配列に対してガイドRNAを指向させるように機能する、ガイドRNA内の配列を指す。「ガイド配列」は、「標的化配列」または「スペーサー配列」とも称され得る。ガイド配列は、例えば、Streptococcus pyogenes(すなわち、Spy Cas9)および関連するCas9ホモログ/オルソログの場合、20塩基対の長さであり得る。例えば、15、16、17、18、19、21、22、23、24、または25ヌクレオチド長のような、より短い配列またはより長い配列もまたガイドとして使用できる。例えば、いくつかの実施形態では、ガイド配列は、配列番号5~82から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、標的配列は、例えば、遺伝子内または染色体上にあり、例えば、ガイド配列に対して相補的である。いくつかの実施形態において、ガイド配列とそれに対応する標的配列との間の相補性または同一性の程度は、約75%、80%、85%、88%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であり得る。例えば、いくつかの実施形態において、ガイド配列は、配列番号5~82から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチドに対して約75%、80%、85%、88%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、ガイド配列および標的配列は、100%相補的または同一であり得る。他の実施形態において、ガイド配列および標的配列は、少なくとも1個のミスマッチを含有していてもよい。例えば、ガイド配列および標的配列は、1、2、3、または4個のミスマッチを含有していてもよく、標的配列の全長は、少なくとも17、18、19、20個、またはそれ以上の塩基対である。いくつかの実施形態において、ガイド配列および標的配列は、1~4個のミスマッチを含有していてもよく、ガイド配列は、少なくとも17、18、19、20個、またはそれ以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ガイド配列および標的配列は、1、2、3、または4個のミスマッチを含有していてもよく、ガイド配列は、20個のヌクレオチドを含む。

【0307】

Casタンパク質の核酸基質は二本鎖核酸であるため、Casタンパク質の標的配列は、ゲノムDNAのプラス鎖およびマイナス鎖（すなわち、与えられる配列およびその配列の逆相補体）の両方を含む。したがって、ガイド配列が、「標的配列に対して相補的」であると言われる場合、標的配列の逆相補体に結合するようにガイドRNAを指向させ得ると理解されるべきである。したがって、いくつかの実施形態において、ガイド配列が、標的配列の逆相補体に結合する場合、ガイド配列は、ガイド配列におけるUのTへの置換を除いて、標的配列の特定のヌクレオチド（例えばPAMを含まない標的配列）と同一である。

【0308】

本明細書で使用される場合、「RNAガイドDNA結合剤」は、RNAおよびDNA結合活性を有するポリペプチドもしくはポリペプチドの複合体、またはそのような複合体のDNA結合サブユニットを意味し、DNA結合活性は、配列特異的であり、RNAの配列に依存する。例示的なRNAガイドDNA結合剤には、Casクリパーゼ（cleavase）／ニッカーゼおよびその不活性化形態（「dCas DNA結合剤」）が含まれる。本明細書で使用される「Casタンパク質」とも称される「Casヌクレアーゼ」には、Casクリパーゼ、Casニッカーゼ、およびdCas DNA結合剤が包含される。

Casクリパーゼ／ニッカーゼおよびdCas DNA結合剤には、III型CRISPR系のCsmまたはCmr複合体、Cas10、Csm1、またはそのCmr2サブユニット、I型CRISPR系のカスケード複合体、そのCas3サブユニットおよびクラス2Casヌクレアーゼが含まれる。本明細書で使用される場合、「クラス2Casヌクレアーゼ」は、Cas9ヌクレアーゼまたはCpf1ヌクレアーゼなどの、RNAガイドDNA結合活性を有する一本鎖ポリペプチドである。クラス2Casヌクレアーゼには、RNAガイドDNAクリパーゼまたはニッカーゼ活性をさらに有するクラス2Casクリパーゼおよびクラス2Casニッカーゼ（例えば、H840A、D10A、またはN863Aバリエーション）、ならびにクリパーゼ／ニッカーゼ活性が不活性化されているクラス2dCas DNA結合剤が含まれる。クラス2Casヌクレアーゼには、例えば、Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、HF Cas9（例えば、N497A、R661A、Q695A、Q926Aバリエーション）、HypaCas9（例えば、N692A、M694A、Q695A、H698Aバリエーション）、eSPCas9（1.0）（例えば、K810A、K1003A、R1060Aバリエーション）、およびeSPCas9（1.1）（例えば、K848A、K1003A、R1060Aバリエーション）タンパク質、ならびにそれらの修飾物が含まれる。Cpf1タンパク質（Zetsche et al., Cell, 163:1-13 (2015)）は、Cas9と相同性であり、RuvC様ヌクレアーゼドメインを含有する。ZetscheのCpf1配列は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。例えば、Zetscheの表S1およびS3を参照のこと。「Cas9」は、Spy Cas9、本明細書に列挙されるCas9のバリエーション、およびそれらの等価物を包含する。例えば、Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11):722-36 (2015)、Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015)を参照。

【0309】

「修飾ウリジン」は、本明細書では、ウリジンと同じ水素結合受容体を有し、ウリジンとは1つ以上の構造的差異を有する、チミジン以外のヌクレオシドを指すために使用される。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、置換ウリジン、すなわち、1つ以上の非プロトン置換基（例えば、アルコキシ、例えば、メトキシ）がプロトンの代わりに置かれるウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、シュードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、置換シュードウリジン、すなわち、1つ以上の非プロトン置換基（例えば、アルキル、例えば、メチル）がプロトンの代わりに置かれるシュードウリジン、例えば、N1-メチルシュードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、置換ウリジン、シュードウリジン、または置換シュードウリジンのうちのいずれかである。

【0310】

本明細書で使用される「ウリジン位置」は、ウリジンまたは修飾ウリジンによって占有されるポリヌクレオチド中の位置を指す。したがって、例えば、「ウリジン位置の100%が修飾ウリジンである」ポリヌクレオチドは、同じ配列の従来のRNA（すべての塩基が標準的なA、U、C、またはG塩基である）中のウリジンであり得るすべての位置に修飾ウリジンを含有する。別に指示されない限り、本開示中またはそれに付随する配列表（sequence table）または配列表（sequence listing）のポリヌクレオチド配列中のUは、ウリジンまたは修飾ウリジンであり得る。

【0311】

本明細書で使用される場合、第2の配列に対する第1の配列のアラインメントにより、第2の配列の位置の全体でのX%以上が第1の配列によって一致することが示される場合、第1の配列は、第2の配列と「少なくともX%の同一性を有する配列を含む」とみなされる。例えば、配列AAGAは、配列AAGと100%の同一性を有する配列を含むが、その理由は、アラインメントが、第2の配列の3つのすべての位置において一致があるという点で100%の同一性を与えるからである。RNAとDNAとの間の差（一般に、チミジンをウリジンに交換すること、またはその逆）、および修飾ウリジン等のヌクレオシド類似体の存在は、関連するヌクレオチド（チミジン、ウリジン、または修飾ウリジン等）が同じ相補体（例えば、チミジン、ウリジン、または修飾ウリジンのすべてについてのアデノシン；別の例は、シトシンおよび5-メチルシトシンであり、これらの両方が相補体としてグアノシンまたは修飾グアノシンを有する）を有する限り、ポリヌクレオチド間の同一性または相補性の差に寄与しない。したがって、例えば、Xがいずれかの修飾ウリジン、例えば、シュードウリジン、N1-メチルシュードウリジン、または5-メトキシウリジンである配列5'-AXGは、両方とも同じ配列（5'-CAU）に完全に相補的である点において、AUGと100%同一であるとみなされる。例示的なアラインメントアルゴリズムは、当該技術分野において周知である、Smith-WatermanおよびNeedleman-Wunschアルゴリズムである。当業者は、アラインメントされる配列の所与の対について、どのようなアルゴリズムおよびパラメータ設定の選択が適切であることを理解するであろう。一般的に類似する長さおよび予想される同一性がアミノ酸については50%超の配列、またはヌクレオチドについては75%超の配列に関して、www.ebi.ac.ukウェブサーバにでEBIによって提供されるNeedleman-Wunschアルゴリズムインターフェースのデフォルト設定を用いたNeedleman-Wunschアルゴリズムが一般的に適切である。

【0312】

「mRNA」は、RNAまたは修飾RNAであり、ポリペプチドに翻訳することができる（すなわち、リボソームおよびアミノアシル化tRNAによる翻訳のための基質として機能することができる）オープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドを指すために本明細書で使用される。mRNAは、リボース残基またはその類似体、例えば2'-メトキシリボース残基を含む、リン酸糖骨格を含むことができる。いくつかの実施形態において、核酸リン酸糖骨格の糖は、リボース残基、2'-メトキシリボース残基、またはそれらの組み合わせから本質的になる。一般に、mRNAは、実質的な量のチミジン残基（例えば、0個の残基または30、20、10、5、4、3、もしくは2個未満のチミジン残基、または10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.2%、もしくは0.1%未満のチミジン含有量）を含有しない。mRNAは、そのウリジン位置のいくつかまたはすべてに修飾ウリジンを含むことができる。

【0313】

本明細書で使用される場合、所与のORFの「最小ウリジン含有量」は、（a）すべての位置で最小ウリジンコドンを使用し、（b）所与のORFと同じアミノ酸配列をコードする、ORFのウリジン含有量である。所与のアミノ酸についての最小ウリジンコドンは、最も少ないウリジンを有するコドンである（フェニルアラニンについてのコドンを除いて、通常、0または1であり、最小ウリジンコドンは2個のウリジンを有する）。修飾ウ

リジン残基は、最小ウリジン含有量を評価する目的でウリジンと同等とみなされる。

【0314】

本明細書で使用される場合、所与のORFの「最小ウリジンジヌクレオチド含有量」は、(a) すべての位置で最小のウリジンコドン（上述のとおり）を使用し、(b) 所与のORFと同じアミノ酸配列をコードする、ORFの可能な最小ウリジンジヌクレオチド（UU）含有量である。ウリジンジヌクレオチド（UU）含有量は、ORF中のUUジヌクレオチドの数え上げとして、またはウリジンジヌクレオチドのウリジンによって占められる位置の割合として、割合に基づいて、絶対的な用語で表現することができる（例えば、AUUAUは、5個の位置のうちの2個が、ウリジンジヌクレオチドのウリジンによって占められているため、ウリジンジヌクレオチド含有量は40%である）。修飾ウリジン残基は、最小ウリジンジヌクレオチド含有量を評価する目的でウリジンと同等であるとみなされる。

10

【0315】

本明細書で使用される場合、所与のオープンリーディングフレーム（ORF）の「最小アデニン含有量」は、(a) すべての位置で最小アデニンコドンを使用し、(b) 所与のORFと同じアミノ酸配列をコードする、ORFのアデニン含有量である。所与のアミノ酸の最小アデニンコドンは、最も少ないアデニンを有するコドンである（リジンおよびアスパラギンについてのコドンを除いて、通常0または1であり、最小アデニンコドンは2個のアデニンを有する）。修飾アデニン残基は、最小アデニン含有量を評価する目的でアデニンと同等であるとみなされる。

20

【0316】

本明細書で使用される場合、所与のオープンリーディングフレーム（ORF）の「最小アデニンジヌクレオチド含有量」は、(a) すべての位置で最小アデニンコドン（上述のとおり）を使用し、(b) 所与のORFと同じアミノ酸配列をコードする、ORFの可能な最小アデニンジヌクレオチド（AA）含有量である。アデニンジヌクレオチド（AA）含有量は、ORF中のAAジヌクレオチドの数え上げとして、またはアデニンジヌクレオチドのアデニンによって占められる位置の割合として、割合に基づいて、絶対的な用語で表現することができる（例えば、UAAUAは、5個の位置のうちの2個が、アデニンジヌクレオチドのアデニンによって占められているため、アデニンジヌクレオチド含有量は40%である）。修飾アデニン残基は、最小アデニンジヌクレオチド含有量を評価する目的でアデニンと同等であるとみなされる。

30

【0317】

本明細書で使用される場合、「TTR」は、TTR遺伝子の遺伝子産物であるトランスサイレチンを指す。

【0318】

本明細書で使用される場合、「アミロイド」は、通常可溶性であるタンパク質またはペプチドの異常な凝集体を指す。アミロイドは不溶性であり、アミロイドは、臓器や組織にタンパク質性沈着物を生成し得る。アミロイド中のタンパク質またはペプチドは、タンパク質の多くのコピーが一緒に粘着して原線維を形成することを可能にする形態へとミスフォールディングされ得る。いくつかの形態のアミロイドは、人体において正常な機能を有し得るが、本明細書で使用される「アミロイド」は、タンパク質の異常な凝集体または病的な凝集体を指す。アミロイドは、TTRなどの単一のタンパク質もしくはペプチドを含み得るか、またはTTRおよび追加のタンパク質などの複数のタンパク質もしくはペプチドを含み得る。

40

【0319】

本明細書で使用される場合、「アミロイド原線維」は、分解に耐性であるアミロイドの不溶性繊維を指す。アミロイド原線維は、特定のタンパク質またはペプチド、ならびにそれが凝集した組織および細胞型に基づいて症状を生じ得る。

【0320】

本明細書で使用される場合、「アミロイドーシス」は、アミロイドまたはアミロイド原

50

線維の沈着によって引き起こされる症状を特徴とする疾患を指す。アミロイドーシスは、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、神経系、および消化管を含む多くの臓器に影響を与える可能性がある。

【0321】

本明細書で使用される場合、「ATTR」、「TTR関連アミロイドーシス」、「TTRアミロイドーシス」、「ATTRアミロイドーシス」、または「TTRに関連するアミロイドーシス」は、TTRの沈着に関連するアミロイドーシスを指す。

【0322】

本明細書で使用される場合、「家族性アミロイド心筋症」または「FAC」は、主に拘束型心筋症を特徴とする遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス（ATTR）を指す。FACでは、うっ血性心不全が一般的である。平均発症年齢は、およそ60～70歳であり、診断後の推定寿命は4～5年である。

【0323】

本明細書で使用される場合、「家族性アミロイドポリニューロパチー」または「FAP」は、主に感覚運動ニューロパチーを特徴とする遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス（ATTR）を指す。FAPでは、自律神経ニューロパチーが一般的である。ニューロパチーが主要な特徴であるが、FAPの症状には、悪液質、腎不全、および心臓病も含まれ得る。FAPの平均発症年齢は、およそ30～50歳であり、診断後の推定寿命は5～15年である。

【0324】

本明細書で使用される場合、「野生型ATTR」および「ATTRwt」は、T60A、V30M、V30A、V30G、V30L、V122I、V122A、またはV122（-）などの病的なTTR変異に関連しないATTRを指す。ATTRwtは、老人性全身性アミロイドーシスとも呼ばれてきた。発症は、典型的には60歳以上の男性で発生し、最も一般的な症状は、うっ血性心不全および心房細動などの異常な心拍である。さらなる症状には、息切れ、疲労、めまい、腫脹（特に脚）、吐き気、狭心症、睡眠障害、および体重減少などの心機能不良の結果が含まれる。手根管症候群の既往は、ATTRwtのリスクの増加を示し、いくつかの場合では、早期疾患を示す可能性がある。ATTRwtは、一般に、時間の経過とともに心機能の低下を引き起こすが、野生型TTR沈着物はよりゆっくりと蓄積するため、遺伝性ATTRよりも良好な予後を有する可能性がある。既存の治療は、他の形態のATTR（肝臓移植を除く）と類似しており、一般に、利尿薬および液体および塩分摂取の制限から抗凝固剤、および重症例では心臓移植に至るまで、心臓機能のサポートまたは改善を目的としている。それにもかかわらず、FACと同様に、ATTRwtは、診断から3～5年以内に心不全により死亡することがある。

【0325】

本明細書に記載のガイドRNA組成物および方法に有用なガイド配列を、表1および本出願全体に示す。

【0326】

本明細書で使用される場合、「遺伝性ATTR」は、TTR遺伝子の配列における変異と関連するATTRを指す。ATTRに関連するTTR遺伝子中の既知の変異には、T60A、V30M、V30A、V30G、V30L、V122I、V122A、またはV122（-）の置換を有するTTRを生じる変異が含まれる。

【0327】

本明細書で使用される場合、「インデル」は、標的核酸内の二本鎖切断（DSB）の部位において挿入されるか、または欠失するかのいずれかである多数のヌクレオチドからなる挿入／欠失変異を指す。

【0328】

本明細書で使用される場合、「ノックダウン」は、特定の遺伝子産物（例えば、タンパク質、mRNA、またはその両方）の発現の低下を指す。タンパク質のノックダウンは、（例えば、血清または細胞培地において）組織もしくは細胞集合体によって分泌されるタ

10

20

30

40

50

ンパク質を検出することによって、または目的の組織もしくは細胞集合体からタンパク質の全細胞量を検出することのいずれかによって、測定することができる。mRNAのノックダウンを測定する方法は既知であり、目的の組織または細胞集合体から単離されたmRNAのシーケンシングを含む。いくつかの実施形態において、「ノックダウン」は、特定の遺伝子産物の発現のある程度の喪失、例えば、転写されるmRNAの量の低減、または細胞集合体（組織にみられるものなどのインビボ集合体を含む）によって発現または分泌されるタンパク質の量の低減を指し得る。

【0329】

本明細書で使用される場合、「ノックアウト」は、細胞における特定のタンパク質の発現の喪失を指す。ノックアウトは、（例えば、血清または細胞培地において）組織もしくは細胞集合体からのタンパク質分泌の量を検出することによって、または組織もしくは細胞集合体のタンパク質の全細胞量を検出することのいずれかによって、測定することができる。いくつかの実施形態において、（例えば、組織内で見出されるものなどのインビボ集合体を含む細胞の集合体において）1つ以上の細胞のTTRを「ノックアウトする」方法が提供される。いくつかの実施形態において、ノックアウトは、例えば、インデルによって作製される変異体TTRタンパク質の形成ではなく、細胞内のTTRタンパク質の発現の完全な喪失である。

【0330】

本明細書で使用される場合、「変異体TTR」は、TTRの野生型アミノ酸配列と比較して、TTRのアミノ酸配列に変化を有するTTR（すなわち、TTRタンパク質）の遺伝子産物を指す。ヒト野生型TTR配列は、NCBI Gene ID: 7276; Ensembl: Ensembl: ENSG00000118271で利用可能である。例えばヒトにおけるATTTRに関連するTTRの変異体形態としては、T60A、V30M、V30A、V30G、V30L、V122I、V122A、またはV122（-）が挙げられる。

【0331】

本明細書で使用される場合、「変異体TTR」または「変異体TTR対立遺伝子」は、野生型配列（NCBI遺伝子ID: 7276; Ensembl: ENSG00000118271）と比較して、TTRのヌクレオチド配列に変化を有するTTR配列を指す。

【0332】

本明細書で使用される場合、「リボ核タンパク質」（RNP）または「RNP複合体」は、RNAガイドDNA結合剤、例えば、Casヌクレアーゼ、例えば、Casクリパーゼ、Casニッカーゼ、またはdCas DNA結合剤（例えば、Cas9）とともに含むガイドRNAを指す。いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、Cas9などのRNAガイドDNA結合剤を標的配列へとガイドし、ガイドRNAは、標的配列とハイブリダイズし、薬剤が標的配列に結合し、その場合、この薬剤はクリパーゼまたはニッカーゼであり、結合の後に切断またはニッキングを行うことができる。

【0333】

本明細書で使用される場合、「標的配列」は、gRNAのガイド配列に対して相補性を有する標的遺伝子内の核酸配列を指す。標的配列とガイド配列との相互作用により、RNAガイドDNA結合剤が、標的配列内で結合し、潜在的に（薬剤の活性に応じて）ニックを形成するか、または切断するように指向される。

【0334】

本明細書で使用される場合、「治療」は、対象における疾患または障害のための投与または治療の任意の適用を指し、その疾患を阻害すること、その進行を止めること、その疾患の1つ以上の症状を緩和すること、その疾患を治癒させること、またはその疾患の1つ以上の症状の再発を予防することを含む。例えば、ATTTRの治療は、ATTTRの症状を緩和することを含んでいてもよい。

【0335】

本明細書で使用される場合、「病的な変異」という用語は、TTRなどの遺伝子産物が

10

20

30

40

50

、A T T Rなどの疾患の発症を引き起こす、促進する、寄与する、または阻害することができない可能性が高い変異を指す。

【0336】

本明細書で使用される場合、「脂質ナノ粒子」(LNP)という用語は、分子間力によって互いに物理的に会合する複数の(すなわち、1つより多い)脂質分子を含む粒子を指す。LNPは、例えば、ミクロスフェア(単層および多層の小胞、例えば、いくつかの実施形態において、実質的に球形であり、より特定の実施形態において、水性コアを含み得る「リポソーム」ラメラ相脂質二重層を含み、例えば、RNA分子の実質的な部分を含む)、エマルション中の分散相、ミセル、または懸濁液中の内相であってよい。エマルション、ミセル、および懸濁液は、局所(local)送達および/または局所(topical)送達のための好適な組成物であり得る。例えば、その内容が参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO2017173054A1およびWO2019067992A1も参照されたい。対象にヌクレオチドを送達することが可能な当業者に公知の任意のLNPを、ガイドRNAと、本明細書に記載のRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸とともに利用し得る。

10

【0337】

本明細書で使用される場合、「ドナーオリゴヌクレオチド」または「ドナーテンプレート」という用語は、標的部位(例えば、ゲノムDNAの標的部位)に挿入される所望の核酸配列を含むオリゴヌクレオチドを指す。ドナーオリゴヌクレオチドは、一本鎖オリゴヌクレオチドまたは二本鎖オリゴヌクレオチドであってもよい。いくつかの実施形態において、ドナーオリゴヌクレオチドは、LNPまたはトランスフェクションの使用を介して、ガイドRNAおよびRNAガイドDNA結合剤(例えば、Cas9)をコードする核酸配列とともに送達されてもよい。

20

【0338】

本明細書で使用される場合、「核局在化シグナル」(NLS)または「核局在化配列」という用語は、そのような配列を含むか、またはそのような配列に連結された分子の、真核細胞の核への輸送を誘導するアミノ酸配列を指す。核局在化シグナルは、輸送される分子の一部を形成し得る。いくつかの実施形態において、NLSは、共有結合、水素結合、またはイオン相互作用によって分子の残りの部分に連結され得る。

【0339】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」という句は、一般的に無毒であり、生物学的に望ましくないものではなく、薬学的使用のために他の方法では許容されないものではない、薬学的組成物を調製するのに有用であることを意味する。

30

【0340】

「約」または「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値について許容される誤差を意味し、これは、値がどのように測定または決定されるかに部分的に依存する。

【0341】

本明細書で使用される場合、「注入」は、例えば、およそ30分間~12時間の注入時間での1つ以上の薬剤の能動的投与を指す。いくつかの実施形態において、1つ以上の薬剤は、例えば、本明細書に記載のRNAガイドDNA結合剤(例えばCas9)をコードするmRNAと、本明細書に記載のgRNAとを含むLNPを含む。

40

【0342】

本明細書で使用される場合、「注入予防」は、静脈内コルチコステロイド(例えば、デキサメタゾン10mgまたは等価物)、解熱剤(例えば、経口アセトアミノフェンまたはパラセタモール500mg)、静脈内H1遮断薬(例えば、ジフェンヒドラミン50mgまたは等価物)、および静脈内H2遮断薬(例えば、ラニチジン50mgまたは等価物)のうちの1つ以上またはすべてを含む、治療(例えば、LNPの投与を含む)前に対象に投与されるレジメンを指す。注入予防は、任意選択で、経口コルチコステロイド(例えば、デキサメタゾン8mgまたは等価物)の事前投与と組み合わせられる。いくつかの実施

50

形態において、経口コルチコステロイドは、治療の8～24時間前に投与される。いくつかの実施形態において、静脈内コルチコステロイド（例えば、デキサメタゾン10mgまたは等価物）、経口アセトアミノフェン500mg、静脈内H1遮断薬（例えば、ジフェンヒドラミン50mgまたは等価物）、静脈内H2遮断薬（例えば、ラニチジン50mgまたは等価物）のうちの1つ以上またはすべてが、治療の1～2時間前に投与される。いくつかの実施形態において、H1遮断薬および／またはH2遮断薬は、経口投与される。

【0343】

II. TTR遺伝子を標的とする方法および組成物

本明細書では、対象においてTTRに関連するアミロイドーシス（ATTR）を治療し、対象においてTTR血清濃度を低減し、かつ／または対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防するための方法、ならびにこのような方法で使用するための組成物を含む、関連する組成物が開示される。本明細書に記載されるもののいづれかなどの、コルチコステロイド、ガイドRNA、RNAガイドDNA結合剤、またはRNAガイドDNA結合剤をコードするポリヌクレオチドもまた、本明細書に開示される方法で使用するために提供される。例えば、いくつかの実施形態において、LNP組成物などの開示される組成物は、TTRを標的とするガイドRNAと、任意選択で、RNAガイドDNA結合剤、またはこのようなRNAガイドDNA結合剤（例えば、CRISPR/Cas系）をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸を含む。このような方法および組成物で治療される対象は、野生型もしくは非野生型のTTR遺伝子配列を有していてもよく、例えば、ATTR（ATTRwt、またはATTRの遺伝性もしくは家族性の形態であってもよい）を有する対象であってもよい。

【0344】

本明細書に記載のコルチコステロイド、注入予防、およびガイドRNA含有組成物の投与量、頻度および投与様式は、独立して制御することができる。

【0345】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載されるガイドRNA含有組成物の前に投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載されるガイドRNA含有組成物の後に投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載されるガイドRNA含有組成物と同時に投与される。いくつかの実施形態において、複数回用量のコルチコステロイドは、ガイドRNA含有組成物の投与の前または後に投与される。いくつかの実施形態において、複数回用量のガイドRNA含有組成物は、コルチコステロイドの投与の前または後に投与される。いくつかの実施形態において、複数回用量のコルチコステロイドおよび複数回用量のガイドRNA含有組成物が投与される。

【0346】

ガイドRNA含有組成物、例えば、ガイドRNAおよび任意選択でRNAガイドDNA結合剤をコードするポリヌクレオチドを含むLNP組成物は、注入によって投与されてもよい。いくつかの実施形態において、組成物は、30分間より長い注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、30分間の注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、60分間より長い注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、90分間より長い注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、120分間より長い、150分間より長い、180分間より長い、240分間より長い、300分間より長い、または360分間より長い注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、少なくとも1時間、少なくとも2時間、少なくとも4時間、少なくとも6時間、少なくとも7時間、少なくとも8時間、少なくとも9時間、少なくとも10時間、少なくとも11時間、または少なくとも12時間、注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、0.5～1.5時間、1.5～2.5時間、2.5～3.5時間、3.5～4.5時間、4.5～5.5時間、5.5～6.5時間、6.5～7.5時間、7.5～8.5時間、8.5～9.5時間、9.5～10.5時間、10.5～11.5時間、または11.5～12.5

時間、注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、約60分間、約90分間、約120分間、約150分間、約180分間、約240分間、約300分間、または約360分間、注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、約45～75分間、75～105分間、105～135分間、135～165分間、165～195分間、195～225分間、225～255分間、255～285分間、285～315分間、315～345分間、または345～375分間、注入により投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、約1.5～6時間、注入によって投与される。

【0347】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載されるガイドRNA含有組成物の投与の前の約5分間～約168時間以内に投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載されるガイドRNA含有組成物の投与の後の約5分間～約168時間以内に投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載されるガイドRNA含有組成物の投与の前の5分間、10分間、15分間、30分間、1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、12時間、18時間、24時間、36時間、48時間、72時間、96時間、120時間、144時間、168時間、または前述の値のうちのいずれか2つによって制限される範囲内の時間量で、投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載されるガイドRNA含有組成物の投与の後の1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、12時間、18時間、24時間、36時間、48時間、72時間、96時間、120時間、144時間、168時間、または前述の値のうちのいずれか2つによって制限される範囲内の時間量で、投与される。特定の実施形態において、コルチコステロイドは、ガイドRNA含有組成物の投与の約8～24時間前に投与され、注入予防は、ガイドRNA含有組成物の投与の1～2時間前に投与される。コルチコステロイドは、本明細書に記載されるガイドRNA含有組成物の投与とともに、またはそれとほぼ同時に投与され得る。

【0348】

適切な場合、ある用量のコルチコステロイドは、適切な間隔で別々に投与される少なくとも2つのサブ用量として投与され得る。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載されるガイドRNA含有組成物の投与の前に、少なくとも2回投与される。いくつかの実施形態において、ある用量のコルチコステロイドは、本明細書に記載のガイドRNA含有組成物の投与の後に、少なくとも2回投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、12時間、18時間、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15日間、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15週間の間隔で、または前述の値のうちのいずれか2つによって制限される範囲内の時間量で、（例えば、本明細書に記載のガイドRNA含有組成物の投与の前、投与とともに、および／または投与の後に）投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載のガイドRNA含有組成物の投与前に、1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、12時間、18時間、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15日間、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15週間の間隔で、または前述の値のうちのいずれか2つによって制限される範囲内の時間量で、投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載のガイドRNA含有組成物の投与後に、1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、12時間、18時間、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15日間、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15週間の間隔で、または前述の値のうちのいずれか2つによって制限される範囲内の時間量で、投与される。

【0349】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、少なくとも2回投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、少なくとも3回投与される投与され

10

20

30

40

50

る。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、少なくとも4回投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、最大5回、6回、7回、8回、9回、または10回投与される。第1の用量は経口であってもよく、第2の用量またはその後の用量は、非経口投与、例えば注入によるものであってもよい。あるいは、第1の用量は、非経口であってもよく、第2の用量またはその後の用量は、経口投与によるものであってもよい。

【0350】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載のガイドRNA含有組成物の静脈内投与の前に経口投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載のガイドRNA含有組成物の静脈内投与時または静脈内投与後に経口投与される。

10

【0351】

A. コルチコステロイド、注入予防

開示される方法および組成物において使用されるコルチコステロイドは、遺伝子編集および／または遺伝子編集組成物による療法を受ける対象を治療するのに有用である。いかなる特定の理論に拘束されることを望むものではないが、コルチコステロイドは、外来RNA（ガイドRNAまたはRNAガイドDNA結合剤をコードするmRNA）に対する炎症または免疫応答を低減するのに有用であり得る。開示される方法および組成物において使用されるコルチコステロイドは、当該技術分野で公知であり、かつ／またはいくつかの供給源から市販されているもののいずれであってもよい。

20

【0352】

いくつかの実施形態において、注入予防は、遺伝子編集組成物の前、例えば、遺伝子編集組成物の投与の1～2時間前の時点で対象に投与される。いくつかの実施形態において、注入予防は、静脈内コルチコステロイド（例えば、デキサメタゾン8～12mg、例えば10mgもしくは等価物、または本明細書の他の箇所に記載される他のコルチコステロイドのうちのいずれか）、解熱剤（例えば、経口アセトアミノフェン（パラセタモールとも呼ばれる）500mg）、H1遮断薬（例えば、ジフェンヒドラミン50mgまたは等価物）、H2遮断薬（例えば、ラニチジン50mgまたは等価物）のうちの1つ以上、またはすべてを含む。いくつかの実施形態において、注入予防は、静脈内コルチコステロイド（例えば、デキサメタゾン8～12mg、例えば、10mgまたは等価物）および解熱剤（例えば、経口アセトアミノフェンまたはパラセタモール500mg）を含む。いくつかの実施形態において、H1遮断薬（例えば、ジフェンヒドラミン50mgまたは等価物）および／またはH2遮断薬（例えば、ラニチジン50mgまたは等価物）は、経口投与される。いくつかの実施形態において、H1遮断薬（例えば、ジフェンヒドラミン50mgまたは等価物）および／またはH2遮断薬（例えば、ラニチジン50mgまたは等価物）は、静脈内投与される。いくつかの実施形態において、静脈内H1遮断薬および／または静脈内H2遮断薬は、等価物、例えば、経口投与される等価物に置き換えられる。これに加えて、またはこれに代えて、経口コルチコステロイド（例えば、デキサメタゾン6～10mg、例えば、8mgもしくは等価物、または本明細書の他の箇所に記載される他のコルチコステロイドのうちのいずれか）を、例えば、治療の8～24時間前に投与し得る。これらの投薬量は、例えば、対象がヒト、例えば、成人ヒトである場合に使用され得る。いくつかの実施形態において、注入予防は、炎症の重症度を低減し得る静脈内コルチコステロイド（例えば、デキサメタゾン10mgまたは等価物）、疼痛および発熱を低減し得るおよび／またはCOX酵素および／またはプロスタグランジンを阻害し得る経口アセトアミノフェン500mg、それぞれH1およびH2受容体でのヒスチミンの作用を遮断するように作用する静脈内H1遮断薬（例えば、ジフェンヒドラミン50mgまたは等価物）および静脈内H2遮断薬（例えば、ラニチジン50mgまたは等価物）からなり、任意選択で、例えば、遺伝子編集組成物の投与の8～24時間前に、経口デキサメタゾン（8mgの量または等価物）の投与が先に行われてもよい。注入予防は、ガイドRNA含有組成物（例えば、LNP組成物）を投与することに関連する有害反応を低減するように機

30

40

50

能し得る。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドおよび／または注入予防は、ガイドRNA含有組成物（例えば、LNP組成物）を投与する前に、必要な前投薬として投与される。

【0353】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、アセトアミノフェン、H1遮断薬、またはH2遮断薬のうちの1つ以上と同時に投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、アセトアミノフェンおよびH1遮断薬と同時に投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、アセトアミノフェンおよびH2遮断薬と同時に投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、H1遮断薬およびH2遮断薬と同時に投与される。いくつかの実施形態において、H1遮断薬および／またはH2遮断薬は、経口投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、アセトアミノフェン、H1遮断薬、およびH2遮断薬と同時に投与される。

10

【0354】

多くのH1遮断薬およびH2遮断薬は、当該技術分野で既知である。いくつかの実施形態において、H1遮断薬は、ジフェンヒドラミン、クレマスチン、セチリジン、テルフェナジン、ドキシラミン、ミルタザピン、プロモフェニラミン、トリプロリジン、シプロヘプタジン、ロラタジン、ヒドロキシジン、シンナリジン、アステミゾール、アザタジン、メクリジン、カルビノキサミン、エピナスチン、オロパタジン、トリプロリジン、ブロムフェニラミン、ケトチフェン、フェキソフェナジン、デスロラタジン、アゼラスチン、ジメンヒドリナート、プロメタジン、メキタジン、エメダスチン、レボカバスチン、クロルフェニラミン、シクリジン、アリメマジン、フェニダミン、フェニラミン、メタピリレン、フルナリジン、ミアンセリン、レボセチリジン、エスミルタザピン、メピラミン、アルカフタジン、アンタゾリン、クロロピラミン、ジメチンデン、ジメトチアジン、アクリバスチン、クロルフェニラミンマレイン酸塩、エバスチン、ミゾラスチン、gsk-1004723、オキサトミド、クロルフェニラミン、ベポタスチン、ブクリジン、リスペリドン、メトジラジン、マプロチリン、ジフェニルピラリン、プロモジフェンヒドラミン、ジブラシドン、オランザピン、クロザピン、プロマジン、トラゾドン、ドキシセピン、デシプラミン、オルフェナドリン、メトトリメプラジン、クロフェダノール、クロルプロチキセン、クエチアピン、アセナピン、ベンザトロピン、アリピプラゾール、アミトリプチリン、イミプラミン、ノルトリプチリン、トリミプラミン、イソチペンジル、クロルプロマジン、イロペリドン、ズクロペンチキソール、クロルシクリジン、アモキサピン、ブトリプチリン、カリプラジン、ピラスチン、ドスレピン、ルパタジン、ピゾチフェン、トンジルアミン、ベンズキナミン、プロピオマジン、アセプロメタジン、アリピプラゾールラウロキシル、またはデブトロピンである。

20

30

【0355】

いくつかの実施形態において、H2遮断薬は、ラニチジン、ニザチジン、シメチジン、またはファモチジンである。等価なコルチコステロイドおよび用量は、例えば、Liu et al., Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 2013, 9:30中に見出すことができる。等価な抗ヒスタミン薬（H1遮断薬および／またはH2遮断薬）ならびに用量は、当該技術分野で既知の種類の好適なメンバーのための慣用用量を含む。

40

【0356】

いくつかの実施形態において、少なくとも2回用量のコルチコステロイドは、組成物の投与の前に投与される。いくつかの実施形態において、第1の用量のコルチコステロイドが投与された後に、組成物が投与される前に第2の用量のコルチコステロイドが投与される。いくつかの実施形態において、第1の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前の8～24時間以内に投与される。いくつかの実施形態において、第1の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前の8～24時間以内に経口投与される。いくつかの実施形態において、第2の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前の1～2時間以内に投与される。いくつかの実施形態において、第2の用量のコルチコステ

50

ロイドは、組成物が投与される前の1～2時間以内に静脈内投与される。いくつかの実施形態において、第1の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前の8～24時間以内に投与され、第2の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前の1～2時間以内に投与される。

【0357】

いくつかの実施形態において、第1の用量のコルチコステロイドは、経口投与され、組成物が投与される前に第2の用量のコルチコステロイドが静脈内投与される。いくつかの実施形態において、第1の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前の8～24時間以内に経口投与され、第2の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前の1～2時間以内に静脈内投与される。

【0358】

いくつかの実施形態において、第1の用量のコルチコステロイドは、経口投与され、第2の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前に、アセトアミノフェン、H1遮断薬、またはH2遮断薬のうちの1つ以上と同時に投与される。いくつかの実施形態において、第1の用量のコルチコステロイドは、経口投与され、第2の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前に、アセトアミノフェン、H1遮断薬、およびH2遮断薬と同時に投与される。いくつかの実施形態において、第1の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前の8～24時間以内に経口投与され、第2の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前の1～2時間以内に、アセトアミノフェン、H1遮断薬、またはH2遮断薬のうちの1つ以上と同時に静脈内投与される。いくつかの実施形態において、第1の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前の8～24時間以内に経口投与され、第2の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前の1～2時間以内に、アセトアミノフェン、H1遮断薬、およびH2遮断薬と同時に静脈内投与される。いくつかの実施形態において、第1の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前の8～24時間以内に経口投与され、第2の用量のコルチコステロイドは、組成物が投与される前の1～2時間以内に、アセトアミノフェン、H1遮断薬、およびH2遮断薬と同時に静脈内投与され投与され、アセトアミノフェンは、経口投与され、H1遮断薬およびH2遮断薬は、静脈内投与される。

【0359】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドを投与することで、ガイドRNAを含む組成物の許容性を改善する。例えば、コルチコステロイドを含まないガイドRNAを含む組成物の投与と比較して、コルチコステロイドを投与することで、炎症、吐き気、嘔吐、血中ALT濃度の上昇、高熱症、および／または痛覚過敏などの1つ以上の有害作用の発生率または重症度を低減し得る。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドを投与することで、ガイドRNAを含む組成物に応答して、1つ以上のインターフェロンおよび／または炎症性サイトカインの産生または活性を低減または阻害する。

【0360】

例示的なコルチコステロイドとしては、限定されないが、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、トリアムシノロン、またはエタメタゾン、またはそれらの薬学的に許容される塩が挙げられる。例示的なコルチコステロイドとしては、限定されないが、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン（Rayos（登録商標）、Horizon Pharma）、プレドニゾロン（Pred Forte（登録商標）、Allergan、Omni pred（商標）、Novartis）、メチルプレドニゾロン（Medrol（登録商標）、Pharmacia&Upjohn、Solu-Medrolx（登録商標）、Pharmacia&Upjohn）、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、トリアムシノロン、エタメタゾン、ブデソニド（ENTOCORT（登録商標）、Perrigo Pharma Intl.、Rhinocort（登録商標）、Symbicort（登録商標）、Astrazeneca Pharms、Ulceris（登録商標）、Valeant Pharms）、パラメタゾン、およびデフラザコートが挙げられる。いくつかの

10

20

30

40

50

実施形態において、コルチコステロイドは、デキサメタゾンである。

【0361】

開示される方法で使用されるコルチコステロイドは、当該技術分野で既知のレジメン、例えば、米国FDAが承認したレジメンに従って投与され得る。好適な投与様式としては、限定されないが、経腸投与、局所投与、および非経口投与が挙げられる。本明細書で使用される「非経口投与」および「非経口投与される」という語句は、経腸（経口を含む）および局所投与以外の投与形態（通常は注射によるもの）を意味し、限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、および胸骨内への注射および注入が挙げられる。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、対象に、非経口で、または注射によって投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、対象に、静脈内注射によって投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、対象に、経口投与または経腸投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、対象に局所的に投与される。

10

【0362】

いくつかの実施形態において、例えば、ヒト対象へのまたはヒト対象において使用するための投与を含め、コルチコステロイドは、約0.75mg～約25mgの範囲の量で投与され得る。いくつかの実施形態において、例えば、ヒト対象へのまたはヒト対象において使用するための投与を含め、コルチコステロイドは、約0.01～0.5mg/kg、例えば、0.1～0.40mg/kgまたは0.25～0.40mg/kgの範囲の量で投与され得る。

20

【0363】

一例において、デキサメタゾンは、ガイドRNAの静脈内投与の6～12時間前に、20mgまたは25mgの量で経口投与される。別の例において、デキサメタゾンは、ガイドRNAの静脈内投与前の30分間6～12時間に、30分間、20mgまたは25mgの量で静脈内に投与される。別の例において、デキサメタゾンは、ガイドRNA組成物の注入の8～24時間前に、8～12mg、例えば、10mgの量で経口投与される。別の例において、デキサメタゾンは、ガイドRNA組成物の注入の1～2時間前に、8～12mg、例えば、10mgの量で静脈内投与される。別の例において、デキサメタゾンは、ガイドRNA組成物の注入の8～24時間前に、8～12mg、例えば、10mgの量で経口投与され、デキサメタゾンは、ガイドRNA組成物の注入の1～2時間前に、8～12mg、例えば、10mgの量で静脈内投与される。

30

【0364】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、デキサメタゾンであり、組成物が対象に投与される8から24時間前に、デキサメタゾンが、8mgの量で対象に経口投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、デキサメタゾンであり、組成物が対象に投与される8から24時間前に、デキサメタゾンが、8mgの量で対象に経口投与される。

【0365】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、デキサメタゾンであり、組成物が対象に投与される1～2時間前に、デキサメタゾンが、10mgの量で対象に静脈内投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、デキサメタゾンであり、組成物が対象に投与される1～2時間前に、デキサメタゾンが、10mgの量で対象に静脈内投与される。

40

【0366】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、デキサメタゾンであり、組成物が対象に投与される8～24時間前に、第1の用量のデキサメタゾンが、8mgの量で、対象に経口投与され、組成物が対象に投与される1～2時間前に、第2の用量のデキサメタゾンが、10mgの量で、対象に静脈内投与される。

【0367】

50

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、デキサメタゾンであり、組成物が対象に投与される8～24時間前に、第1の用量のデキサメタゾンが、8mgの量で、対象に経口投与され、組成物が対象に投与される1～2時間前に、第2の用量のデキサメタゾンが、10mgの量で、対象に静脈内投与され、第2の用量のコルチコステロイドは、アセトアミノフェン、H1遮断薬、またはH2遮断薬のうちの1つ以上と同時に投与される。

【0368】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、デキサメタゾンであり、組成物が対象に投与される8～24時間前に、第1の用量のデキサメタゾンが、8mgの量で、対象に経口投与され、組成物が対象に投与される1～2時間前に、第2の用量のデキサメタゾンが、10mgの量で、対象に静脈内投与され、第2の用量のコルチコステロイドは、アセトアミノフェン、H1遮断薬、およびH2遮断薬と同時に投与される。

10

【0369】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、デキサメタゾンであり、組成物が対象に投与される8～24時間前に、第1の用量のデキサメタゾンが、8mgの量で、対象に経口投与され、組成物が対象に投与される1～2時間前に、第2の用量のデキサメタゾンが、10mgの量で、アセトアミノフェンの経口投与およびH1遮断薬およびH2遮断薬の静脈内投与と同時に、対象に静脈内投与される。

【0370】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、デキサメタゾンであり、組成物が対象に投与される8～24時間前に、第1の用量のデキサメタゾンが、8mgの量で、対象に経口投与され、組成物が対象に投与される1～2時間前に、第2の用量のデキサメタゾンが、10mgの量で、500mgの量でのアセトアミノフェンの経口投与および50mgの量でのH1遮断薬および50mgの量でのH2遮断薬の静脈内投与と同時に、対象に静脈内投与される。

20

【0371】

さらに、特定のコルチコステロイドの選択に応じて、コルチコステロイドの用量が容易に調節可能であることは、当業者によって認識されている。例えば、比較の目的のために、以下は、コルチコステロイドの適切な等価物のmg投薬量である。ヒドロコルチゾン20mg、コルチゾン25mg、プレジゾンまたはプレドニゾロン5mg、デフラザコート6mg、メチルプレドニゾロン4mg、デキサメタゾンまたはベタメタゾン0.75mg、トリウムシノロン4mg。したがって、上の例に提示されるコルチコステロイドの用量は、デキサメタゾンに基づくものであるが、別のコルチコステロイドが患者に投与される場合、当業者は、上の変換情報を用いて、他のコルチコステロイドの等価用量を計算するであろう。

30

【0372】

B. ガイドRNA (gRNA)

開示される方法および組成物で使用するガイドRNAは、TTR遺伝子を標的とするガイド配列を含む。TTR遺伝子を標的とする例示的なガイド配列を、表1に配列番号5～82で示す。

40

【表 1 - 1】

表 1 : TTR 標的化ガイド配列、命名法、染色体座標、および配列

配列 番号	ガイド ID	説明	種	染色体位置	ガイド配列*
5	CR003 335	TTR (エクソン 1)	ヒト	chr18:31 591917-3 1591937	CUGCUCCUCC UCUGCCUUGC
6	CR003 336	TTR (エクソン 1)	ヒト	chr18:31 591922-3 1591942	CCUCCUCUGC CUUGCUGGAC
7	CR003 337	TTR (エクソン 1)	ヒト	chr18:31 591925-3 1591945	CCAGUCCAGC AAGGCAGAGG
8	CR003 338	TTR (エクソン 1)	ヒト	chr18:31 591928-3 1591948	AUACCAGUCC AGCAAGGCAG
9	CR003 339	TTR (エクソン 1)	ヒト	chr18:31 591934-3 1591954	ACACAAAUAC CAGUCCAGCA
10	CR003 340	TTR (エクソン 1)	ヒト	chr18:31 591937-3 1591957	UGGACUGGUA UUUGUGUCUG
11	CR003 341	TTR (エクソン 1)	ヒト	chr18:31 591941-3 1591961	CUGGUAUUUG UGUCUGAGGC
12	CR003 342	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592880-3 1592900	CUUCUCUACA CCCAGGGCAC
13	CR003 343	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592902-3 1592922	CAGAGGACAC UUGGAUUCAC
14	CR003 344	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592911-3 1592931	UUUGACCAUC AGAGGACACU

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

15	CR003 345	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592919-3 1592939	UCUAGAACUU UGACCAUCAG
16	CR003 346	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592928-3 1592948	AAAGUUCUAG AUGCUGUCCG
17	CR003 347	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592948-3 1592968	CAUUGAUGGC AGGACUGCCU
18	CR003 348	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592948-3 1592968	AGGCAGUCCU GCCAUCAAUG
19	CR003 349	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592958-3 1592978	UGCACGGCCA CAUUGAUGGC
20	CR003 350	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592962-3 1592982	CACAUGCACG GCCACAUGA
21	CR003 351	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592974-3 1592994	AGCCUUUCUG AACACAUGCA
22	CR003 352	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592986-3 1593006	GAAAGGCUGC UGAUGACACC
23	CR003 353	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592987-3 1593007	AAAGGCUGCU GAUGACACCU
24	CR003 354	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 593003-3 1593023	ACCUGGGAGC CAUUUGCCUC
25	CR003 355	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 593007-3 1593027	CCCAGAGGCA AAUGGCUCCC
26	CR003 356	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 593015-3 1593035	GCAACUUACC CAGAGGCCAAA

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

27	CR003 357	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 593022-3 1593042	UUCUUUGGCA ACUUACCCAG
28	CR003 358	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595127-3 1595147	AUGCAGCUCU CCAGACUCAC
29	CR003 359	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595126-3 1595146	AGUGAGUCUG GAGAGCUGCA
30	CR003 360	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595127-3 1595147	GUGAGUCUGG AGAGCUGCAU
31	CR003 361	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595140-3 1595160	GCUGCAUGGG CUCACAACUG
32	CR003 362	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595143-3 1595163	GCAUGGGCUC ACAACUGAGG
33	CR003 363	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595156-3 1595176	ACUGAGGAGG AAUUUGUAGA
34	CR003 364	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595157-3 1595177	CUGAGGAGGA AUUUGUAGAA
35	CR003 365	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595170-3 1595190	UGUAGAAGGG AUAUACAAAG
36	CR003 366	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595193-3 1595213	AAAUAGACAC CAAAUCUUAC
37	CR003 367	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595197-3 1595217	AGACACCAAA UCUUACUGGA
38	CR003 368	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595205-3 1595225	AAGUGCCUUC CAGUAAGAUC

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

39	CR003 369	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595235-3 1595255	CUCUGCAUGC UCAUGGAAUG
40	CR003 370	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595236-3 1595256	CCUCUGCAUG CUCAUGGAAU
41	CR003 371	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595237-3 1595257	ACCUCUGCAU GCUCAUGGAA
42	CR003 372	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595242-3 1595262	UACUCACCUC UGCAUGCUCU
43	CR003 373	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598570-3 1598590	GUAUUCACAG CCAACGACUC
44	CR003 374	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598583-3 1598603	GCGGCGGGGG CCGGAGUCGU
45	CR003 375	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598592-3 1598612	AAUGGUGUAG CGGCGGGGGC
46	CR003 376	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598596-3 1598616	CGGCAAUGGU GUAGCGGCGG
47	CR003 377	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598597-3 1598617	GCGGCAAUGG UGUAGCGGCG
48	CR003 378	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598598-3 1598618	GGCGGCAAUG GUGUAGCGGC
49	CR003 379	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598599-3 1598619	GGGCGGCAAU GGUGUAGCGG
50	CR003 380	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598602-3 1598622	GCAGGGCGGC AAUGGUGUAG

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

51	CR003 381	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598610-3 1598630	GGGGCUCAGC AGGGCGGCAA
52	CR003 382	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598616-3 1598636	GGAGUAGGGG CUCAGCAGGG
53	CR003 383	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598619-3 1598639	AUAGGAGUAG GGGCUCAGCA
54	CR003 384	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598620-3 1598640	AAUAGGAGUA GGGGCUCAGC
55	CR003 385	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598626-3 1598646	CCCCUACUCC UAUCCACCA
56	CR003 386	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598629-3 1598649	CCGUGGUGGA AUAGGAGUAG
57	CR003 387	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598630-3 1598650	GCCGUGGUGG AAUAGGAGUA
58	CR003 388	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598637-3 1598657	GACGACAGCC GUGGUGGAAU
59	CR003 389	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598643-3 1598663	AUUGGUGACG ACAGCCGUGG
60	CR003 390	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598646-3 1598666	GGGAUUGGUG ACGACAGCCG
61	CR003 391	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598647-3 1598667	GGCUGUCGUC ACCAAUCCCA
62	CR003 392	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598661-3 1598681	AGUCCCUCAU UCCUUGGGAU

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

63	CR005 298	TTR (エクソン 1)	ヒト	chr18:31 591883-3 1591903	UCCACUCAUU CUUGGCAGGA
64	CR005 299	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598631-3 1598651	AGCCGUGGUG GAAUAGGAGU
65	CR005 300	TTR (エクソン 1)	ヒト	chr18:31 591967-3 1591987	UCACAGAAAC ACUCACCGUA
66	CR005 301	TTR (エクソン 1)	ヒト	chr18:31 591968-3 1591988	GUCACAGAAA CACUCACCGU
67	CR005 302	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592874-3 1592894	ACGUGUCUUC UCUACACCCA
68	CR005 303	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592903-3 1592923	UGAAUCCAAG UGUCCUCUGA
69	CR005 304	TTR (エクソン 2)	ヒト	chr18:31 592969-3 1592989	GGCCGUGCAU GUGUUCAGAA
70	CR005 305	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595114-3 1595134	UAUAGGAAAA CCAGUGAGUC
71	CR005 306	TTR (エクソン 3)	ヒト	chr18:31 595204-3 1595224	AAAUUUUACU GGAAGGCACU
72	CR005 307	TTR (エクソン 4)	ヒト	chr18:31 598548-3 1598568	UGUCUGUCUU CUCUCAUAGG
73	CR000 689	TTR	カニク イザル	chr18:50 681533-5 0681553	ACACAAAUAC CAGUCCAGCG
74	CR005 364	TTR	カニク イザル	chr18:50 680481-5 0680501	AAAGGCUGCU GAUGAGACCU

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

75	CR005 365	TTR	カニク イザル	chr18:50 680520-5 0680540	CAUUGACAGC AGGACUGCCU
76	CR005 366	TTR	カニク イザル	chr18:50 681539-5 0681559	AUACCAGUCC AGCGAGGCAG
77	CR005 367	TTR	カニク イザル	chr18:50 681542-5 0681562	CCAGUCCAGC GAGGCAGAGG
78	CR005 368	TTR	カニク イザル	chr18:50 681545-5 0681565	CCUCCUCUGC CUCGUGGAC
79	CR005 369	TTR	カニク イザル	chr18:50 680540-5 0680560	AAAGUUCUAG AUGCCGUGCG
80	CR005 370	TTR	カニク イザル	chr18:50 680594-5 0680614	ACUUGUCUUC UCUAUACCCA
81	CR005 371	TTR	カニク イザル	chr18:50 678216-5 0678236	AAGUGACUUC CAGUAAGAUA
82	CR005 372	TTR	カニク イザル	chr18:50 680482-5 0680502	AAAAGGCUGC UGAUGAGACC

10

20

【0373】

上述のガイド配列の各々は、*crRNA*を形成するための追加のヌクレオチドをさらに含んでいてもよく、例えば、その3'末端で、ガイド配列に続く以下の例示的なヌクレオチド配列を有する。GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG（配列番号126）。*sgRNA*の場合、上述のガイド配列は、*sgRNA*を形成するための追加のヌクレオチドをさらに含んでいてもよく、例えば、ガイド配列の3'末端に続く以下の例示的なヌクレオチド配列を有する。5'から3'への配向で、GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU（配列番号125）。

30

【0374】

いくつかの実施形態において、*sgRNA*は、修飾されている。いくつかの実施形態において、*sgRNA*は、配列番号3で以下に示される修飾パターンを含み、ここで、Nが、任意の天然または非天然のヌクレオチドであり、Nの全体が、本明細書に記載されるようなガイド配列を含み、修飾*sgRNA*が、以下の配列：mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU（配列番号3）を含み、「N」が、任意の天然または非天然のヌクレオチドであってもよい。例えば、本明細書に包含されるのは、配列番号3であり、ここで、Nは、本明細書に開示されるガイド配列のいずれかに置き換えられる。修飾は、ガイドのヌクレオチドについてのN置換にかかわらず、配列番号3に示されるままである。すなわち、ガイドのヌクレオチドは「N」を置き換えるが、最初の3つのヌクレオチドは、2'OMe修飾され、第1のヌクレオチドと第2のヌクレオチドとの間、第2のヌクレオチドと第3のヌクレオチドとの間、および第3のヌクレオチドと第4のヌクレオチドとの間にホスホロチオエート結合が存在する。

40

【0375】

いくつかの実施形態において、表2に列挙される配列のうちのいずれか1つが包含される。

50

【表 2－1】

表 2：TTR 標的化 s g RNA 配列

配列番号	ガイド ID	標的および説明	種	配列
87	G000480	TTR sg RNA 修飾配列	ヒト	mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUUAAGGCCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU *mU*mU*mU
88	G000481	TTR sg RNA 修飾配列	ヒト	mU*mC*mU*AGAACUUUGACCAUCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUUAAGGCCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU *mU*mU*mU
89	G000482	TTR sg RNA 修飾配列	ヒト	mU*mG*mU*AGAAGGGAUAUACAAAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUUAAGGCCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU *mU*mU*mU

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

90	G000 483	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mU*mC*mC*ACUCAUUCU UGGCAGGAGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
91	G000 484	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mA*mG*mA*CAACAAAUC UUACUGGAGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
92	G000 485	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mC*mC*mU*CCUCUGCCU UGCUGGACGUUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
93	G000 486	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mA*mC*mA*CAAAUACCA GUCCAGCAGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

94	G000 487	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mU*mU*mC*UUUGGCAAC UUACCCAGGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
95	G000 488	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mA*mA*mA*GUUCUAGAU GCUGUCCGGUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
96	G000 489	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mU*mU*mU*GACCAUCAG AGGACACUGUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
97	G000 490	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mA*mA*mA*UAGACACCA AAUCUUACGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

98	G000491	TTR sgRNA修飾配列	ヒト	mA*mU*mA*CCAGUCCAG CAAGGCAGGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAinAmC mUinUmGmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
99	G000492	TTR sgRNA修飾配列	ヒト	mC*mU*mU*CUUACACC CAGGCACGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAinAmC mUinUmGmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
100	G000493	TTR sgRNA修飾配列	ヒト	mA*mA*mG*UGCCUCCA GUAAGAUGUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAinAmC mUinUmGmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
101	G000494	TTR sgRNA修飾配列	ヒト	mG*mU*mG*AGUCUGGAG AGCUGCAUGUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAinAmC mUinUmGmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

102	G000 495	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mC*mA*mG*AGGACACUU GGAUUCACGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAinAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
103	G000 496	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mG*mG*mC*CGUGCAUGU GUUCAGAAGUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAinAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
104	G000 497	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mC*mU*mG*CUCCUCCUC UGCCUUGCGUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAinAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
105	G000 498	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mA*mG*mU*GAGUCUGGA GAGCUGCAGUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAinAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

106	G000 499	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mU*mG*mA*AUCCAAGUG UCCUCUGAGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCmGmA mGinUmCmGinGmUmGmCmU *mU*mU*mU
107	G000 500	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mC*mC*mA*GUCCAGCAA GGCAGAGGGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCmGmA mGinUmCmGinGmUmGmCmU *mU*mU*mU
108	G000 501	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mU*mC*mA*CAGAAACAC UCACCGUAGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCmGmA mGinUmCmGinGmUmGmCmU *mU*mU*mU
109	G000 567	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mG*mA*mA*AGGCUGCUG AUGACACCGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCmGmA mGinUmCmGinGmUmGmCmU *mU*mU*mU

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

110	G000 568	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mG*mG*mC*UGUCGUCAC CAAUCCCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU *mU*mU*mU
111	G000 570	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mC*mA*mU*UGAUGGCAG GACUGCCUGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU *mU*mU*mU
112	G000 571	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mG*mU*mC*ACAGAAACA CUCACCGUGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU *mU*mU*mU
113	G000 572	TTR sg RNA修飾配 列	ヒト	mC*mC*mC*CUACUCCUA UCCACCCAGUUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU *mU*mU*mU

10

20

30

40

50

【表 2 - 8】

114	G000 502	TTRカニク イザル特異的 sgRNA修 飾配列	カニク イザル	mA*mC*mA*CAAAUACCA GUCCAGCGGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
115	G000 503	TTRカニク イザル特異的 sgRNA修 飾配列	カニク イザル	mA*mA*mA*AGGCUGCCUG AUGAGACCGUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
116	G000 504	TTRカニク イザル特異的 sgRNA修 飾配列	カニク イザル	mA*mA*mA*GGCUGCUGA UGAGACCGUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
117	G000 505	TTRカニク イザル特異的 sgRNA修 飾配列	カニク イザル	mC*mA*mU*UGACAGCAG GACUGCCGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU

10

20

30

40

50

【表 2 - 9】

118	G000 506	TTRカニク イザル特異的 s gRNA修 飾配列	カニク イザル	mA*mU*mA*CCAGUCCAG CGAGGCAGGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
119	G000 507	TTRカニク イザル特異的 s gRNA修 飾配列	カニク イザル	mC*mC*mA*GUCCAGCGA GGCAGAGGGUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
120	G000 508	TTRカニク イザル特異的 s gRNA修 飾配列	カニク イザル	mC*mC*mU*CCUCUGCCU CGCUGGACGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU
121	G000 509	TTRカニク イザル特異的 s gRNA修 飾配列	カニク イザル	mA*mA*mA*GUUCUAGA GCCGUCGCGUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmAmUmA mGinCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGinCmU *mU*mU*mU

10

20

30

40

50

【表 2－10】

122	G000 510	TTRカニク イザル特異的 s gRNA修 飾配列	カニク イザル	mA*mC*mU*UGUCUUCUC UAUACCCAGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmUmA mGinCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGmCmU *mU*mU*mU
123	G000 511	TTRカニク イザル特異的 s gRNA修 飾配列	カニク イザル	mA*mA*mG*UGACUCCA GUAAGAUGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmUmA mGinCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGmCmU *mU*mU*mU
124	G000 282	TTR	マウス	mU*mU*mA*CAGCCACGU CUACAGCAGUUUUAGAmG mCinUmAmGinAmAmUmA mGinCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmC mUinUmGmAmAmAmAmG mUinGmGmCinAmCmCinGmA mGinUmCmGinGmUmGmCmU *mU*mU*mU

*ーP S連結、 「m」ー2'ーOーMeヌクレオチド

【0376】

対応するs gRNA IDを有するガイドIDのアラインメントマッピング、ならびに
カニクイザルゲノムに対する相同性およびカニクイザル適合ガイドIDを表3に提供する。

10

20

30

40

50

【表 3－1】

表 3：TTR 標的化ガイド配列 ID マッピングおよびカニクイザル相同性

説明	ヒトデューアル ガイド ID	ヒトシ ン グ ル ガ イ ド ID	カニクイザルゲ ノムとの不一致 数	カニクイザ ルの一致し た d g R N Λ の ID	カニクイザ ルの一致し た s g R N Λ の ID
TTR	CR0033 35	G000 497	1		
TTR	CR0033 36	G000 485	1	CR005 368	G0005 08
TTR	CR0033 37	G000 500	1	CR005 367	G0005 07
TTR	CR0033 38	G000 491	1	CR005 366	G0005 06
TTR	CR0033 39	G000 486	1	CR000 689	G0005 02
TTR	CR0033 40		0		
TTR	CR0033 41		0		
TTR	CR0033 42	G000 492	カニクイザルに おいて PAM な し		
TTR	CR0033 43	G000 495	カニクイザルに おいて PAM な し		
TTR	CR0033 44	G000 489	0		
TTR	CR0033 45	G000 481	0		
TTR	CR0033 46	G000 488	1	CR005 369	G0005 09
TTR	CR0033 47	G000 570	2	CR005 365	G0005 05
TTR	CR0033 48		2		

10

20

30

40

50

【表 3－2】

TTR	CR0033 49		>3		
TTR	CR0033 50		カニクイザルに おいてPAMな し		
TTR	CR0033 51		カニクイザルに おいてPAMな し		
TTR	CR0033 52	G000 567	2	CR005 372	G0005 03
TTR	CR0033 53	G000 480	1	CR005 364	G0005 04
TTR	CR0033 54		1		
TTR	CR0033 55		1		
TTR	CR0033 56		3		
TTR	CR0033 57	G000 487	>3		
TTR	CR0033 58		0		
TTR	CR0033 59	G000 498	0		
TTR	CR0033 60	G000 494	0		
TTR	CR0033 61		0		
TTR	CR0033 62		0		
TTR	CR0033 63		0		
TTR	CR0033 64		0		
TTR	CR0033 65	G000 482	0		

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

TTR	CR0033 66	G000 490	0		
TTR	CR0033 67	G000 484	カニクイザルに おいてPAMな し		
TTR	CR0033 68	G000 493	1	CR005 371	G0005 11
TTR	CR0033 69		0		
TTR	CR0033 70		0		
TTR	CR0033 71		0		
TTR	CR0033 72		0		
TTR	CR0033 73		1		
TTR	CR0033 74		2		
TTR	CR0033 75		2		
TTR	CR0033 76		2		
TTR	CR0033 77		2		
TTR	CR0033 78		2		
TTR	CR0033 79		2		
TTR	CR0033 80		1		
TTR	CR0033 81		1		
TTR	CR0033 82		0		

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

TTR	CR0033 83		0		
TTR	CR0033 84		0		
TTR	CR0033 85	G000 572	0		
TTR	CR0033 86		0		
TTR	CR0033 87		0		
TTR	CR0033 88		0		
TTR	CR0033 89	G000 569	0		
TTR	CR0033 90		0		
TTR	CR0033 91	G000 568	0		
TTR	CR0033 92		0		
TTR	CR0052 98	G000 483	1		
TTR	CR0052 99		0		
TTR	CR0053 00	G000 501	カニタイザルに おいてPAMな し		
TTR	CR0053 01	G000 571	0		
TTR	CR0053 02		2	CR005 370	G0005 10
TTR	CR0053 03	G000 499	0		
TTR	CR0053 04	G000 496	>3		

10

20

30

【表 3 - 5】

TTR	CR0053 05		0		
TTR	CR0053 06		1		
TTR	CR0053 07		0		

【0377】

いくつかの実施形態において、gRNAは、ヌクレアーゼ（例えば、Cas9などのCasヌクレアーゼ）であってもよいRNAガイドDNA結合剤を、TTR中の標的DNA配列に指向させるガイド配列を含む。gRNAは、表1に示されるガイド配列を含むcrRNAを含み得る。gRNAは、表1に示されるガイド配列の17、18、19、または20個の連続ヌクレオチドを含むcrRNAを含み得る。いくつかの実施形態において、gRNAは、表1に示されるガイド配列の少なくとも17、18、19、または20個の連続ヌクレオチドに対して約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する配列を含むcrRNAを含む。いくつかの実施形態において、gRNAは、表1に示されるガイド配列と約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を

40

50

有する配列を含む *c r R N A* を含む。 *g R N A* は、 *t r R N A* をさらに含み得る。本明細書に記載される各々の組成物および方法の実施形態において、 *c r R N A* および *t r R N A* は、シングルRNA (*s g R N A*) として会合していてもよく、または別個のRNA上にあってもよい (*d g R N A*)。 *s g R N A* の文脈において、 *c r R N A* および *t r R N A* の構成要素は、例えば、ホスホジエステル結合または他の共有結合を介して共有結合され得る。

【0378】

本明細書に記載される各々の組成物、使用および方法の実施形態において、ガイドRNAは、「デュアルガイドRNA」または「*d g R N A*」として2つのRNA分子を含み得る。 *d g R N A* は、例えば、表1に示されるガイド配列を含む *c r R N A* を含む第1のRNA分子と、 *t r R N A* を含む第2のRNA分子と、を含む。第1のRNA分子と第2のRNA分子は共有結合していなくてもよいが、 *c r R N A* と *t r R N A* の部分の間の塩基対形成によってRNA二本鎖を形成してもよい。

10

【0379】

本明細書に記載される各々の組成物、使用および方法の実施形態において、ガイドRNAは、「シングルガイドRNA」または「*s g R N A*」としてシングルRNA分子を含み得る。 *s g R N A* は、 *t r R N A* に共有結合した表1に示されるガイド配列を含む *c r R N A* (またはその一部) を含み得る。 *s g R N A* は、表1に示されるガイド配列のも17、18、19、または20個の連続ヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、 *c r R N A* および *t r R N A* は、リンカーを介して共有結合される。いくつかの実施形態において、 *s g R N A* は、 *c r R N A* と *t r R N A* の部分の間の塩基対形成によって、ステムループ構造を形成する。いくつかの実施形態において、 *c r R N A* および *t r R N A* は、ホスホジエステル結合ではない1つ以上の結合を介して共有結合される。

20

【0380】

いくつかの実施形態において、 *t r R N A* は、天然に存在するCRISPR/Cas系由来の *t r R N A* 配列のすべてまたは一部を含み得る。いくつかの実施形態において、 *t r R N A* は、先端切断または修飾された野生型 *t r R N A* を含む。 *t r R N A* の長さは、使用されるCRISPR/Cas系に依存する。いくつかの実施形態において、 *t r R N A* は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、または100個より多いヌクレオチドを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態において、 *t r R N A* は、例えば1つ以上のヘアピン構造もしくはステムループ構造、または1つ以上のバルジ構造などの特定の二次構造を含み得る。

30

【0381】

いくつかの実施形態において、組成物は、配列番号5～82から選択されるガイド配列を含む1つ以上のガイドRNAを含む。

【0382】

いくつかの実施形態において、組成物は、配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列を含む *g R N A* を含む。

40

【0383】

いくつかの実施形態において、組成物は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択されるガイド配列を含む1つ以上のガイドRNAを含む。いくつかの実施形態において、組成物は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一であるガイド配列を含む *g R N A* を含む。いくつかの実施形態において、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列は、配列番号5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、17、22、23、27、29、30、35、36、37、38、55、61、63、65、66、68、または69である。いくつかの実施形態において、配列番号5～72、74～78、および8

50

0～82から選択される配列は、配列番号5、6、9、13、14、15、16、17、22、23、27、30、35、36、37、38、55、63、65、66、68、または69である。

【0384】

他の実施形態において、組成物は、配列番号5～82のガイド配列のうちのいずれか2つ以上から選択されるガイド配列を含む少なくとも1つ、例えば、少なくとも2つのgRNAを含む。いくつかの実施形態において、組成物は、配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一であるガイド配列を各々含む少なくとも2つのgRNAを含む。

【0385】

他の実施形態において、組成物は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択されるガイド配列のうちのいずれか2つ以上から選択されるガイド配列を含む少なくとも1つ、例えば、少なくとも2つのgRNAを含む。いくつかの実施形態において、組成物は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列のいずれかと少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一であるガイド配列を各々含む少なくとも2つのgRNAを含む。いくつかの実施形態において、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列は、配列番号5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、17、22、23、27、29、30、35、36、37、38、55、61、63、65、66、68、または69から選択される1つの配列、または2つの配列を含む。いくつかの実施形態において、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列は、配列番号5、6、9、13、14、15、16、17、22、23、27、30、35、36、37、38、55、63、65、66、68、または69から選択される1つの配列、または2つの配列を含む。

【0386】

いくつかの実施形態において、gRNAは、表2に示される配列（配列番号87～124）のいずれか1つを含むsgRNAである。いくつかの実施形態において、gRNAは、表2に示される配列（配列番号87～124）のいずれか1つを含むが、示される修飾を含まない（すなわち、非修飾配列番号87～124）sgRNAである。いくつかの実施形態において、sgRNAは、配列番号87～124の核酸のいずれかと少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態において、sgRNAは、配列番号87～124の核酸のいずれかと少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一であるが、示される修飾を含まない（すなわち、非修飾配列番号87～124）配列を含む。いくつかの実施形態において、sgRNAは、修飾の有無にかかわらず、配列番号87～124で表2のsgRNA配列に示されるガイド配列の代わりに、表1に示されるガイド配列のいずれか1つを含む。

【0387】

いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号87～113、115～120、または122～124のいずれか1つを含むsgRNAである。いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号87～113、115～120、または122～124のいずれか1つを含むが、表2に示される修飾を含まない（すなわち、非修飾配列番号87～113、115～120、または122～124）sgRNAである。いくつかの実施形態において、sgRNAは、配列番号87～113、115～120、または122～124の核酸のいずれかと少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態において、sgRNAは、配列番号87～113、115～120、または122～124の核酸のいずれかと少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一であるが、示される修飾を含まない（すなわち、非修飾配列番号87～113、115～120、または122～124）配列を含む。いく

つかの実施形態において、sgRNAは、修飾の有無にかかわらず、配列番号87～113、115～120、または122～124における表2のsgRNA配列に示されるガイド配列の代わりに、表1に示されるガイド配列のうちのいずれか1つを含む。

【0388】

本明細書に提供されるガイドRNAは、TTR遺伝子内の標的配列を認識する（例えば、それにハイブリダイズする）ために有用であり得る。例えば、TTR標的配列は、ガイドRNAを含む提供されるCasクリパーゼによって認識され、切断され得る。したがって、RNAガイドDNA結合剤、例えば、Casクリパーゼは、ガイドRNAをTTR遺伝子の標的配列に対して指向させてもよく、ガイドRNAのガイド配列は、標的配列とハイブリダイズし、RNAガイドDNA結合剤、例えば、Casクリパーゼは、標的配列を切断する。

10

【0389】

いくつかの実施形態において、1つ以上のガイドRNAの選択は、TTR遺伝子内の標的配列に基づいて決定される。

【0390】

いかなる特定の理論にも拘束されることなく、遺伝子の特定の領域における変異（例えば、ヌクレアーゼ媒介性DSBの結果として生じるインデルに起因するフレームシフト変異）は、遺伝子の他の領域における変異よりも許容性が低くてもよく、したがって、DSBの位置は、もたらされ得るタンパク質ノックダウンの量または種類における重要な因子である。いくつかの実施形態において、TTR内の標的配列に対して相補的であるか、または相補性を有するgRNAは、RNAガイドDNA結合剤をTTR遺伝子内の特定の位置に指向させるために使用される。いくつかの実施形態において、gRNAは、TTRのエクソン1、エクソン2、エクソン3、またはエクソン4内の標的配列に対して相補的であるか、または相補性を有するガイド配列を有するように設計されている。

20

【0391】

いくつかの実施形態において、ガイド配列は、ヒトTTR遺伝子内に存在する標的配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一である。いくつかの実施形態において、標的配列は、ガイドRNAのガイド配列に対して相補的であり得る。いくつかの実施形態において、ガイドRNAのガイド配列とそれに対応する標的配列との間の相補性または同一性の程度は、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であり得る。いくつかの実施形態において、標的配列とgRNAのガイド配列とは、100%相補的であるか、または同一であり得る。他の実施形態において、標的配列とgRNAのガイド配列は、少なくとも1個のミスマッチを含んでいてもよい。例えば、標的配列とgRNAのガイド配列は、1、2、3、または4個のミスマッチを含んでいてもよく、ここで、ガイド配列の全長は、約20である。いくつかの実施形態において、標的配列とgRNAのガイド配列は、1～4個のミスマッチを含んでいてもよく、ここで、ガイド配列は、20個のヌクレオチドである。

30

【0392】

C. gRNAの修飾

40

いくつかの実施形態において、gRNAは、化学修飾されている。1つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含むgRNAは、標準的なA、G、C、およびU残基の代わりに、またはそれらに加えて使用される1つ以上の非天然および／または天然に存在する成分または構造の存在を記載するために、「修飾」gRNAまたは「化学修飾」gRNAと呼ばれる。いくつかの実施形態において、修飾gRNAは、非標準的なヌクレオシドまたはヌクレオチドを用いて合成され、本明細書では「修飾された」と呼ばれる。修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、(i) ホスホジエステル骨格結合における改変、例えば、非架橋のリン酸酸素の1つもしくは両方、および／または、架橋リン酸酸素の1つ以上の置き換え（例示的な骨格修飾）、(ii) リボース糖の成分、例えば、リボース糖の2'ヒドロキシルの改変、例えば、置き換え（例示的な糖修飾）、(iii) リン酸部分の

50

「脱リン酸型」リンカーによる大規模な置き換え（例示的な骨格修飾）、（i v）非標準的な核酸塩基によるものを含め、天然に存在する核酸塩基の修飾または置き換え（例示的な塩基修飾）、（v）リボースリン酸骨格の置き換えまたは修飾（例示的な骨格修飾）、（v i）オリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾もしくは置き換え、または部分、キャップ、もしくはリンカーのコンジュゲーション（そのような3'または5'のキャップ修飾は、糖および／または骨格の修飾を含み得る）、ならびに（v i i）糖の修飾または置き換え（例示的な糖修飾）の1つ以上を含み得る。

【0393】

上に列挙されるものなどの化学修飾を組み合わせ、2、3、4、またはそれ以上の修飾を有し得るヌクレオシドおよびヌクレオチド（まとめて「残基」）を含む修飾gRNAを提供することができる。例えば、修飾残基は、修飾糖および修飾核酸塩基を有し得る。いくつかの実施形態において、gRNAの各々の塩基は修飾され、例えば、すべての塩基がホスホロチオエート基などの修飾リン酸基を有する。特定の実施形態において、gRNA分子のリン酸基のすべて、または実質的にすべてがホスホロチオエート基によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、修飾gRNAは、RNAの5'末端において、またはその近傍において少なくとも1つの修飾残基を含む。いくつかの実施形態において、修飾gRNAは、RNAの3'末端において、またはその近傍において少なくとも1つの修飾残基を含む。

【0394】

いくつかの実施形態において、gRNAは、1、2、3、またはそれ以上の修飾残基を含む。いくつかの実施形態において、修飾gRNA内の位置の少なくとも5%（例えば、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%）が、修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドである。

【0395】

非修飾核酸は、例えば、細胞内ヌクレアーゼまたは血清中にみられるものによる分解を受けやすい場合がある。例えば、ヌクレアーゼは核酸のホスホジエステル結合を加水分解し得る。したがって、一態様において、本明細書に記載されるgRNAは、例えば、細胞内または血清に由来するヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、1つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される修飾gRNA分子は、インビボとエクスピボの両方において細胞集合体に導入されるとき、低減した自然免疫応答を示し得る。「自然免疫応答」という用語は、サイトカイン（特にインターフェロン）発現および放出の誘導および細胞死を含む、一本鎖核酸を含む外来性核酸に対する細胞応答を含む。

【0396】

骨格修飾のいくつかの実施形態において、修飾残基のリン酸基は、1つ以上の酸素を異なる置換基によって置き換えることによって修飾され得る。さらに、修飾残基、例えば修飾核酸中に存在する修飾残基は、本明細書において記載されるように、非修飾リン酸部分の修飾リン酸基による大規模な置き換えを含み得る。いくつかの実施形態において、リン酸骨格の骨格修飾は、帯電していないリンカーまたは非対称な電荷分布を有する帯電したリンカーのいずれかをもたらす改変を含み得る。

【0397】

修飾リン酸基の例は、ホスホロチオエート、ホスホロセネート、ボラノリン酸、ボラノリン酸エステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリアルホスホネート、およびホスホトリエステルを含む。非修飾リン酸基中のリン酸原子は、アキラルである。しかしながら、非架橋酸素のうちの1つの、上述の原子または原子群のうちの1つによる置き換えは、リン原子をキラルにすることができる。立体リン原子は、「R

10

20

30

40

50

」配置（本明細書においてR p）または「S」配置（本明細書においてS p）のいずれかを有し得る。骨格は、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに連結する酸素）の、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、および炭素（架橋メチレンホスホネート）による置き換えによってもまた修飾できる。置き換えは、いずれかの架橋酸素または両方の架橋酸素において生じ得る。

【0398】

リン酸基は、ある骨格修飾において、非リン含有連結基によって置き換えることができる。いくつかの実施形態において、帯電したリン酸基は、中性部分によって置き換えることができる。リン酸基を置き換えることのできる部分の例は、非限定的に、例えば、メチルホスホン酸、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリinker、スフホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ（methylenehydrazo）、メチレンジメチルヒドラゾ（methylenedimethylhydrazo）、メチレンオキシメチルイミノ（methyleneoxymethylimino）を含み得る。

【0399】

リン酸リンカーとリボース糖が、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシドまたはヌクレオチドの代替物によって置き換えられている核酸を模倣できるスキャフォールドもまた構築できる。そのような修飾は、骨格および糖修飾を含み得る。いくつかの実施形態において、核酸塩基は、代替骨格によって係留され得る。例は、非限定的に、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸（PNA）ヌクレオシド代替物を含み得る。

【0400】

修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、糖に対する1つ以上の修飾、すなわち糖修飾を含み得る。例えば、2' ヒドロキシル基（OH）は、修飾されていてもよく、例えば、多くの異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基によって置き換えることができる。いくつかの実施形態において、2' ヒドロキシル基に対する修飾は、ヒドロキシルが2' -アルコキシドイオンを形成するようにさらに脱プロトン化されることがもはや起こり得ないので、核酸の安定性を増強し得る。

【0401】

2' ヒドロキシル基修飾の例は、アルコキシまたはアリアルオキシ（OR、式中「R」がアルキル、シクロアルキル、アリアル、アラキル、ヘテロアリアル、または糖であり得る）、ポリエチレングリコール（PEG）、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ であって式中Rが、例えば、Hまたは任意選択で置換されたアルキルであり、nが0~20の整数であり得るもの（例えば、0~4、0~8、0~10、0~16、1~4、1~8、1~10、1~16、1~20、2~4、2~8、2~10、2~16、2~20、4~8、4~10、4~16、および4~20）を含み得る。いくつかの実施形態において、2' ヒドロキシル基修飾は、2' -O-Meであり得る。いくつかの実施形態において、2' ヒドロキシル基修飾は、2' -ヒドロキシル基をフッ素で置き換える2' -フルオロ修飾であり得る。いくつかの実施形態において、2' ヒドロキシル基修飾は、2' ヒドロキシルが、例えばC₁-6アルキレンまたはC₁-6ヘテロアルキレン架橋を介して同一のリボース糖の4' 炭素へと接続し得る「ロックド」核酸（LNA）を含んでいてもよく、例示的な架橋としては、メチレン、プロピレン、エーテル、またはアミノ架橋、O-アミノ（ここで、アミノは、例えば、NH₂、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、もしくはジヘテロアリアルアミノ、エチレンジアミン、もしくはポリアミノであり得る）、およびアミノアルコキシ、 $O(CH_2)_n$ -アミノ（ここで、アミノは、例えば、NH₂、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、もしくはジヘテロアリアルアミノ、エチレンジアミン、もしくはポリアミノであり得る）を含み得る。いくつかの実施形態において、2' ヒドロキシル基修飾は、リボース環がC2'-C3' 結合を欠失している「アンロックド（unlocked）」核酸（UNA）を

10

20

30

40

50

含み得る。いくつかの実施形態において、2'ヒドロキシル基修飾は、メトキシエチル基 (MOE)、 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)$ 、例えばPEG誘導体)を含み得る。

【0402】

「デオキシ」2'修飾は、水素（すなわち、デオキシリボース糖、例えば、部分的なdsRNAの突出部分）、ハロ（例えば、ブロモ、クロロ、フルオロ、またはヨード）、アミノ（ここでアミノは、例えば、 NH_2 、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸であり得る）、 $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ -アミノ（ここでアミノは、例えば、本明細書において記載されるようなものである）、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ （ここでRは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖であり得る）、シアノ、メルカプト、アルキルチオアルキル、チオアルコキシ、ならびにアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルを含み得、任意選択で、例えば本明細書において記載されるようなアミノによって置換されていてもよい。

【0403】

糖修飾は、1つ以上の炭素を含み、リボースにおける対応する炭素のものとは反対の立体化学配置を有する糖基を含み得る。したがって、修飾核酸は、糖として例えばアラビノースを含むヌクレオチドを含み得る。修飾核酸はまた、脱塩基糖をも含み得る。これらの脱塩基糖はまた、構成要素の糖原子の1つ以上においてさらに修飾され得る。修飾核酸はまた、L型である1つ以上の糖、例えばL-ヌクレオチドを含み得る。

【0404】

修飾核酸に組み込むことのできる本明細書において記載される修飾ヌクレオチドおよび修飾ヌクレオチドは、核酸塩基とも呼ばれる修飾塩基を含み得る。核酸塩基の例は、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、およびウラシル(U)を含むが、これらに限定されない。これらの核酸塩基は、修飾されて、または完全に置き換えられて、修飾核酸に組み込むことのできる修飾残基をもたらすことができる。ヌクレオチドの核酸塩基は、独立して、プリン、ピリミジン、プリン類似体、またはピリミジン類似体から選択することができる。いくつかの実施形態において、核酸塩基は、例えば、天然に存在する塩基、および塩基の合成誘導体を含み得る。

【0405】

デュアルガイドRNAを用いる実施形態において、crRNAとtracrRNAの各々は、修飾を含み得る。このような修飾は、crRNAおよび／またはtracrRNAの一方または両方の末端に存在してもよい。sgRNAを含む実施形態において、sgRNAの一方または両方の末端における1つ以上の残基は、化学修飾されていてもよく、またはsgRNA全体が化学修飾されていてもよい。特定の実施形態は、5'末端修飾を含む。特定の実施形態は、3'末端修飾を含む。特定の実施形態において、ガイドRNA分子の一本鎖突出におけるヌクレオチドの1つ以上またはそのすべては、デオキシヌクレオチドである。

【0406】

いくつかの実施形態において、本明細書において開示されるガイドRNAは、2016年12月8日出願された「Chemically Modified Guide RNAs」という発明の名称のUS62/431,756に開示された修飾パターンの1つを含み、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0407】

いくつかの実施形態において、本発明は、1つ以上の修飾を含むgRNAを含む。いくつかの実施形態において、修飾は、2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、修飾は、ヌクレオチド間ホスホロチオエート(PTS)結合を含む。

【0408】

「mA」、「mC」、「mU」、または「mG」という用語は、2'-O-Meによって

10

20

30

40

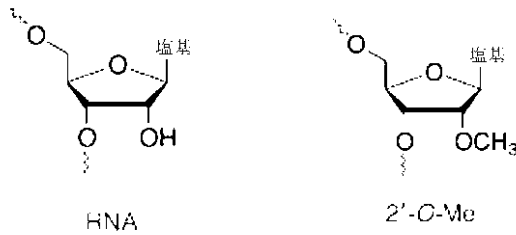
50

修飾されているヌクレオチドを表すために使用され得る。

【0409】

2'-O-メチルの修飾は、以下のように描写され得る。

【化1】



10

【0410】

ヌクレオチド糖環に影響を及ぼすことが示されている別の化学修飾は、ハロゲン置換である。例えば、ヌクレオチド糖環上の2'-フルオロ(2'-F)置換は、オリゴヌクレオチド結合親和性およびヌクレアーゼ安定性を増加させることができる。

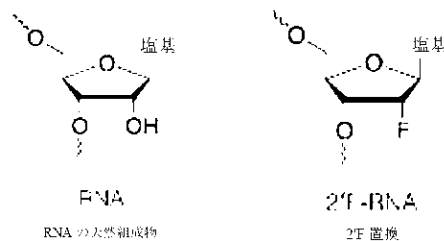
【0411】

本出願において、用語「fA」、「fC」、「fU」、または「fG」は、2'-Fで置換されたヌクレオチドを表すために使用され得る。

【0412】

2'-Fの置換は、以下のように描写され得る。

【化2】



20

30

【0413】

ホスホロチオエート(P S)連結または結合とは、ホスホジエステル連結、例えばヌクレオチド塩基間の結合での1個の非架橋リン酸酸素を硫黄が置換する結合を指す。ホスホロチオエートを使用してオリゴヌクレオチドを生成する場合、修飾オリゴヌクレオチドはS-オリゴとも称され得る。

【0414】

P S修飾を示すために、「*」を使用し得る。本出願では、用語A*、C*、U*、またはG*を使用して、P S結合で隣の(例えば3')ヌクレオチドに結合されているヌクレオチドを示すことができる。

【0415】

本出願では、用語「mA*」、「mC*」、「mU*」、または「mG*」を使用して、2'-O-Meで置換され、P S結合で次の(例えば3')ヌクレオチドに連結されているヌクレオチドを示すことができる。

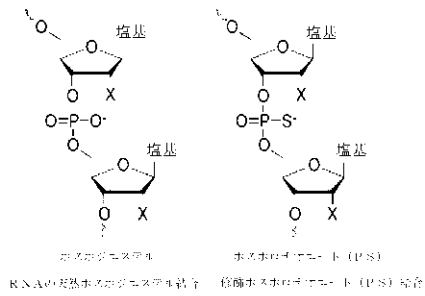
【0416】

以下の図は、非架橋リン酸酸素へのS-の置換を示し、ホスホジエステル結合の代わりにP S結合を生じる。

40

50

【化 3】

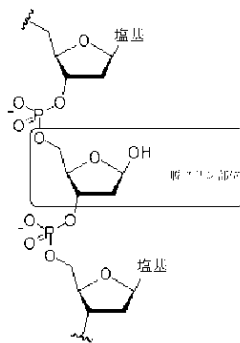


10

【0417】

脱塩基ヌクレオチドは、窒素塩基を欠いているものを指す。以下の図は、塩基を欠く脱塩基（脱プリンとしても知られる）部位を有するオリゴヌクレオチドを描写する。

【化 4】

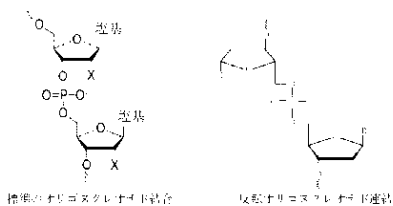


20

【0418】

反転した塩基は、通常の5'から3'への連結とは反転した連結を有するものを指す（すなわち、5'から5'への連結または3'から3'への連結のいずれか）。例えば、

【化 5】



30

【0419】

脱塩基ヌクレオチドは、反転した結合と結合することができる。例えば、脱塩基ヌクレオチドは、5'-5'連結を介して末端部の5'ヌクレオチドに接続してもよく、または脱塩基ヌクレオチドは、3'-3'連結を介して末端部の3'ヌクレオチドに接続してもよい。末端部の5'または3'ヌクレオチドのいずれかにおける反転した脱塩基ヌクレオチドはまた、反転した脱塩基末端キャップと称され得る。

40

【0420】

いくつかの実施形態において、5'末端部における最初の3、4、または5個のヌクレオチドのうちの1つ以上、および3'末端部における最後の3、4、または5個のヌクレオチドのうちの1つ以上が修飾されている。いくつかの実施形態において、修飾は、2'-O-Me、2'-F、反転した脱塩基ヌクレオチド、PS結合、または安定性および／もしくは性能を増加させることが当該技術分野において周知の他のヌクレオチド修飾である。

【0421】

50

いくつかの実施形態において、5'末端部における最初の4個のヌクレオチド、および3'末端部における最後の4個のヌクレオチドは、ホスホロチオエート（PS）結合を用いて連結される。

【0422】

いくつかの実施形態において、5'末端部における最初の3個のヌクレオチド、および3'末端部における最後の3個のヌクレオチドは、2'-O-メチル（2'-O-Me）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、5'末端部における最初の3個のヌクレオチド、および3'末端部における最後の3個のヌクレオチドは、2'-フルオロ（2'-F）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、5'末端部における最初の3個のヌクレオチド、および3'末端部における最後の3個のヌクレオチドは、反転した脱塩基ヌクレオチドを含む。

10

【0423】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、修飾sgRNAを含む。いくつかの実施形態において、sgRNAは、配列番号3に示される修飾パターンを含み、Nが、任意の天然もしくは非天然のヌクレオチドであり、Nの全体が、標的配列にヌクレアーゼを指向させるガイド配列を含む。

【0424】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、配列番号87~124のうちのいずれか1つに示されるsgRNAを含む。いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、配列番号5~82のガイド配列のうちのいずれか1つと、配列番号125のヌクレオチドと、を含むsgRNAを含み、配列番号125のヌクレオチドは、ガイド配列の3'末端にあり、ガイド配列は、配列番号3に示されるように修飾され得る。

20

【0425】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、配列番号5~72、74~78、および80~82から選択されるガイド配列と、配列番号3のヌクレオチド21~100と、を含むsgRNAを含み、配列番号3のヌクレオチドが、ガイド配列の3'末端にあり、ガイド配列は、配列番号3に示されるように修飾され得る。

【0426】

D. RNAガイドDNA結合剤

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、クラス2Casヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、クリパーゼ活性を有し、これは二本鎖エンドヌクレアーゼ活性とも称され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、Casヌクレアーゼ、例えば、クラス2Casヌクレアーゼ（例えば、II型、V型またはVI型のCasヌクレアーゼであってもよい）を含む。クラス2Casヌクレアーゼとしては、例えば、Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、およびC2c3タンパク質、ならびにそれらの修飾物が含まれる。Cas9ヌクレアーゼの例としては、*S. pyogenes*、*S. aureus*、および他の原核生物のII型CRISPR系のもの（例えば、次の段落のリストを参照のこと）、ならびにそれらの修飾（例えば、操作型または変異体）態様が挙げられる。例えば、US2016/0312198A1、US2016/0312199A1を参照のこと。Casヌクレアーゼの他の例としては、III型CRISPR系のCsmまたはCmr複合体、またはCas10、Csm1、もしくはそのCmr2サブユニット、およびI型CRISPR系のカスケード複合体、またはそのCas3サブユニットが挙げられる。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、IIA型、IIB型、またはIIC型の系に由来していてもよい。様々なCRISPR系およびCasヌクレアーゼの考察については、例えば、Makarova et al., Nat. Rev. Microbiol. 9:467-477 (2011)、Makarova et al., Nat. Rev. Microbiol. 13:722-36 (2015)、Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015)を参照されたい。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、Casクリパーゼ、例えば、Cas9ク

30

40

50

リバーゼである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、Casニッカーゼ、例えば、Cas9ニッカーゼである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、Cas9ヌクレアーゼ、例えば、クリパーゼまたはニッカーゼである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、*S. pyogenes* Cas9ヌクレアーゼ、例えば、クリパーゼである。

【0427】

Casヌクレアーゼの由来となり得る非限定的な例示的な種としては、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus thermophilus*、*Streptococcus sp.*、*Staphylococcus aureus*、*Listeria innocua*、*Lactobacillus gasseri*、*Francisella novicida*、*Wolinella succinogenes*、*Sutterella wadsworthensis*、*Gammaproteobacterium*、*Neisseria meningitidis*、*Campylobacter jejuni*、*Pasteurella multocida*、*Fibrobacter succinogenes*、*Rhodospirillum rubrum*、*Nocardiaopsis dassonvillei*、*Streptomyces pristinaespiralis*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptosporangium roseum*、*Streptosporangium roseum*、*Alicyclobacillus acidocaldarius*、*Bacillus pseudomycooides*、*Bacillus selenitireducens*、*Exiguobacterium sibiricum*、*Lactobacillus delbrueckii*、*Lactobacillus salivarius*、*Lactobacillus buchneri*、*Treponema denticola*、*Microscilla marina*、*Burkholderiales bacterium*、*Polaromonas naphthalenivorans*、*Polaromonas sp.*、*Crocospaera watsonii*、*Cyanothecce sp.*、*Microcystis aeruginosa*、*Synechococcus sp.*、*Acetohalobium arabaticum*、*Ammonifex degensii*、*Caldicelulosiruptor beccarii*、*Candidatus Desulforudis*、*Clostridium botulinum*、*Clostridium difficile*、*Finnegoldia magna*、*Natranaerobius thermophilus*、*Pelotomaculum thermopropionicum*、*Acidithiobacillus caldus*、*Acidithiobacillus ferrooxidans*、*Allochrochromatium vinosum*、*Marinobacter sp.*、*Nitrosococcus halophilus*、*Nitrosococcus watsoni*、*Pseudoalteromonas haloplanktis*、*Ktedonobacter racemifer*、*Methanohalobium evestigatum*、*Anabaena variabilis*、*Nodularia spumigena*、*Nostoc sp.*、*Arthrospira maxima*、*Arthrospira platensis*、*Arthrospira sp.*、*Lyngbya sp.*、*Microcoleus chthonoplastes*、*Oscillatoria sp.*、*Petrotoga mobilis*、*Thermosiphon africanus*、*Streptococcus pasteurianus*、*Neisseria cinerea*、*Campylobacter lari*、*Parvibaculum lavamentivorans*、*Corynebacterium diphtheria*、*Acidaminococcus sp.*、*Lachnospiraceae bacterium ND2006*、および *Acaryochloris marina* が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0428】

いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Streptococcus pyogenes*由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Streptococcus thermophilus*由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Neisseria meningitidis*由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Staphylococcus aureus*由来のCas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Francisella novicida*由来のCpf1ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Acidaminococcus* sp. 由来のCpf1ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Lachnospiraceae bacterium ND2006*由来のCpf1ヌクレアーゼである。さらなる実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Francisella tularensis*、*Lachnospiraceae bacterium*、*Butyrivibrio proteoclasticus*、*Peregriinibacteria bacterium*、*Parcubacteria bacterium*、*Smithella*、*Acidaminococcus*、*Candidatus Methanoplasma termitum*、*Eubacterium eligens*、*Moraxella bovoculi*、*Leptospira inadai*、*Porphyromonas crevioricanis*、*Prevotella disiens*、または*Porphyromonas macacae*由来のCpf1ヌクレアーゼである。特定の実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Acidaminococcus*または*Lachnospiraceae*由来のCpf1ヌクレアーゼである。

10

20

【0429】

野生型Cas9は、2つのヌクレアーゼドメイン、RuvCおよびHNHを有する。RuvCドメインは、非標的DNA鎖を切断し、HNHドメインは、DNAの標的鎖を切断する。いくつかの実施形態において、Cas9ヌクレアーゼは、1個より多いRuvCドメインおよび／または1個より多いHNHドメインを含む。いくつかの実施形態において、Cas9ヌクレアーゼは、野生型Cas9である。いくつかの実施形態において、Cas9は、標的DNAにおける二本鎖切断を誘導することができる。特定の実施形態において、Casヌクレアーゼは、dsDNAを切断してもよく、dsDNAの1つの鎖を切断してもよく、またはDNAクリパーゼまたはニッカーゼ活性を有していなくてもよい。例示的なCas9アミノ酸配列は、配列番号203として提供される。開始および終止コードを含む例示的なCas9 mRNA ORF配列は、配列番号311として提供される。融合タンパク質に含めるのに好適な例示的なCas9 mRNAコード配列は、配列番号210として提供される。

30

【0430】

いくつかの実施形態において、キメラCasヌクレアーゼが使用され、タンパク質の1つのドメインまたは領域が、異なるタンパク質の一部によって置き換えられている。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼドメインは、FokIなどの異なるヌクレアーゼ由来のドメインで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、修飾ヌクレアーゼであってもよい。

40

【0431】

他の実施形態において、Casヌクレアーゼは、I型CRISPR/Cas系由来であり得る。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、I型CRISPR/Cas系のカスケード複合体の構成要素であり得る。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、Cas3タンパク質であり得る。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、III型CRISPR/Cas系由来であり得る。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、RNA切断活性を有し得る。

50

【0432】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、一本鎖ニッカーゼ活性を有し、すなわち、1つのDNA鎖を切断して一本鎖切断（「ニック」としても知られる）を産生することができる。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、Casニッカーゼを含む。ニッカーゼは、dsDNA内でニックを作製する酵素であり、すなわち、DNA二重らせんの一方の鎖を切断するが、他方の鎖を切断しない。いくつかの実施形態において、Casニッカーゼは、例えば、触媒ドメイン内の1つ以上の改変（例えば、点変異）によって、エンドヌクレオチド分解活性部位が不活性化されたCasヌクレアーゼ（例えば、上述のCasヌクレアーゼ）の一態様である。例えば、Casニッカーゼおよび例示的な触媒ドメイン改変の考察については、米国特許第8,889,356号を参照のこと。いくつかの実施形態において、Cas9ニッカーゼなどのCasニッカーゼは、不活性化されたRuvCまたはHNHドメインを有する。例示的なCas9ニッカーゼアミノ酸配列は、配列番号206として提供される。開始および終止コドンを含む例示的なCas9ニッカーゼmRNA ORF配列は、配列番号207として提供される。融合タンパク質に含めるのに好適な例示的なCas9ニッカーゼmRNAコード配列は、配列番号211として提供される。

10

【0433】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、1個の機能的ヌクレアーゼドメインのみを含有するように修飾される。例えば、薬剤タンパク質は、その核酸切断活性を低減させるために、ヌクレアーゼドメインの1つが変異されるか、または完全もしくは部分的に欠失するように修飾されてもよい。いくつかの実施形態において、活性が低減したRuvCドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態において、不活性なRuvCドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態において、活性が低減したHNHドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態において、不活性なHNHドメインを有するニッカーゼが使用される。

20

【0434】

いくつかの実施形態において、Casタンパク質ヌクレアーゼドメイン内の保存アミノ酸は、ヌクレアーゼ活性を低減させるか、または改変させるように置換される。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、RuvCまたはRuvC様ヌクレアーゼドメイン内にアミノ酸置換を含み得る。RuvCまたはRuvC様ヌクレアーゼドメインにおける例示的なアミノ酸置換としては、D10A (*S. pyogenes* Cas9タンパク質に基づく)が挙げられる。例えば、Zetsche et al. (2015) Cell Oct 22:163(3):759-771を参照のこと。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、HNHまたはHNH様ヌクレアーゼドメイン内にアミノ酸置換を含み得る。HNHまたはHNH様ヌクレアーゼドメインにおける例示的なアミノ酸置換としては、E762A、H840A、N863A、H983A、およびD986A (*S. pyogenes*のCas9タンパク質に基づく)が挙げられる。例えば、Zetsche et al. (2015)を参照のこと。さらなる例示的なアミノ酸置換としては、D917A、E1006A、およびD1255A (*Francisella novicida* U112 Cpf1 (FnCpf1) 配列 (UniProtKB-A0Q7Q2 (CPF1_FRNATN) に基づく)が挙げられる。

30

40

【0435】

いくつかの実施形態において、ニッカーゼをコードする核酸は、それぞれ、標的配列のセンス鎖およびアンチセンス鎖に対して相補的な一対のガイドRNAと組み合わせて提供される。この実施形態において、ガイドRNAは、標的配列の反対側の鎖にニックを生成することによって（すなわち、ダブルニックング）、ニッカーゼを標的配列に指向させ、DSBを導入する。いくつかの実施形態において、ダブルニックングの使用は、特異性を改善し、オフターゲット効果を低減し得る。いくつかの実施形態において、ニッカーゼは、DNAの反対側の鎖を標的とする2つの別個のガイドRNAとともに使用され、標的DNA内にダブルニックを産生する。いくつかの実施形態において、ニッカーゼは、ごく接

50

近した位置にあるように選択された2つの別個のガイドRNAとともに使用され、標的DNA内にダブルニックを産生する。

【0436】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、クリバーゼ活性およびニッカーゼ活性を欠いている。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、dCas DNA結合ポリペプチドを含む。dCasポリペプチドは、触媒（クリバーゼ／ニッカーゼ）活性を本質的に欠く一方で、DNA結合活性を有する。いくつかの実施形態において、dCasポリペプチドは、dCas9ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、クリバーゼ活性およびニッカーゼ活性を欠くRNAガイドDNA結合剤、またはdCas DNA結合ポリペプチドは、例えば、その触媒ドメイン内の1つ以上の改変（例えば、点変異）によって、そのエンドヌクレオチド分解活性部位が不活性化されたCasヌクレアーゼ（例えば、上述のCasヌクレアーゼ）の一態様である。例えば、US2014/0186958A1、US2015/0166980A1を参照のこと。例示的なdCas9アミノ酸配列は、配列番号208として提供される。開始および終止コドンを含む例示的なdCas9 mRNA ORF配列は、配列番号209として提供される。融合タンパク質に含めるのに好適な例示的なdCas9 mRNAコード配列は、配列番号346として提供される。

10

【0437】

a) 異種機能ドメイン、核局在化シグナル

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤（例えば、S. pyogenes Cas9などのCas9ヌクレアーゼ）は、1つ以上の異種機能ドメインを含む（例えば、融合ポリペプチドであるか、または融合ポリペプチドを含む）。

20

【0438】

いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤の細胞核への輸送を促進し得る。例えば、異種機能ドメインは、核局在化シグナル（NLS）であり得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、1～10個のNLSと融合され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、1～5個のNLSと融合され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、1個のNLSと融合され得る。1個のNLSが使用される場合、NLSは、RNAガイドDNA結合剤の配列のN末端部またはC末端部で連結され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、少なくとも1個のNLSに対してC末端に融合され得る。NLSを、RNAガイドDNA結合剤の配列内に挿入することもできる。他の実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、1個より多いNLSと融合され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、2、3、4、または5個のNLSと融合され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、2個のNLSと融合され得る。特定の状況では、2個のNLSは、同じ（例えば、2個のSV40 NLS）であってもよく、または異なってもよい。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、カルボキシ末端部で連結された2個のSV40 NLSの配列に融合される。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、2個のNLSと融合していてもよく、1つはN末端部に連結しており、1つはC末端部に連結している。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、3個のNLSと融合され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、NLSなしで融合され得る。いくつかの実施形態において、NLSは、単節型配列、例えば、SV40 NLS、PKKKRKV（配列番号278）またはPKKKRRV（配列番号290）であってもよい。いくつかの実施形態において、NLSは、双節型配列、例えば、ヌクレオプラスミンのNLSであるKRPAATKKAGQAKKKK（配列番号91）であってもよい。いくつかの実施形態において、NLS配列は、LAAKRSRTT（配列番号279）、QAAKRSRTT（配列番号280）、PAPAKRERTT（配列番号281）、QAAKRPRRTT（配列番号282）、RAAKRPRRTT（配列番号283）、AAAKRSWSMAA（配列番号284）、AAAKRVWSMAF（配列

30

40

50

番号285)、AAAKRSWSMAF(配列番号286)、AAAKRKYFAA(配列番号287)、RAAKRKAF(AA(配列番号288)、またはRAAKRKYFAV(配列番号289)を含み得る。特定の実施形態において、単一のPKKKRKV(配列番号278)NLSは、RNAガイドDNA結合剤のC末端部で連結され得る。1つ以上のリンカーは、任意選択で、融合部位に含まれる。いくつかの実施形態において、前述の実施形態のいずれかの1つ以上のNLSは、以下に記載される異種機能ドメインのいずれかなどの1つ以上の追加の異種機能ドメインと組み合わせて、RNAガイドDNA結合剤中に存在する。

【0439】

いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤の細胞内半減期を修正することができる。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤の半減期が増加し得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤の半減期が低減し得る。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤の安定性を増加させることができる。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤の安定性を低減させることができる。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、タンパク質分解のシグナルペプチドとして機能し得る。いくつかの実施形態において、タンパク質分解は、例えば、プロテアソーム、リソソームプロテアーゼ、またはカルペインプロテアーゼなどのタンパク質分解酵素によって媒介され得る。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、PEST配列を含み得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、ユビキチンまたはポリユビキチン鎖の付加によって修飾され得る。いくつかの実施形態において、ユビキチンは、ユビキチン様タンパク質(UBL)であってもよい。ユビキチン様タンパク質の非限定的な例としては、小さなユビキチン様修飾因子(SUMO)、ユビキチン交差反応性タンパク質(UCRP、インターフェロン刺激遺伝子-15(ISG15)としても知られる)、ユビキチン関連修飾因子-1(URM1)、神経前駆細胞が発現する発達的に下方制御されたタンパク質-8(NEDD8、S.cerevisiaeにおいてRub1とも呼ばれる)、ヒト白血球抗原F関連(FAT10)、オートファジー-8(ATG8)および-12(ATG12)、Fauユビキチン様タンパク質(FUB1)、膜固定UBL(MUB)、ユビキチン折りたたみ修飾因子-1(UFM1)、およびユビキチン様タンパク質-5(UBL5)が挙げられる。

【0440】

いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、マーカードメインであってもよい。マーカードメインの非限定的な例としては、蛍光タンパク質、精製タグ、エピトープタグ、およびレポーター遺伝子配列が挙げられる。いくつかの実施形態において、マーカードメインは、蛍光タンパク質であってもよい。好適な蛍光タンパク質の非限定的な例としては、緑色蛍光タンパク質(例えば、GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、sfGFP、EGFP、Emerald、Azami Green、Monomeric Azami Green、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1)、黄色蛍光タンパク質(例えば、YFP、EYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1)、青色蛍光タンパク質(例えば、EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal、GFPuv、Sapphire、T-sapphire)、シアン蛍光タンパク質(例えば、ECFP、Cerulean、Cypet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan)、赤色蛍光タンパク質(例えば、mKate、mKate2、mPlum、DsRed単量体、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed-Monomer、HcRed-Tandem、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、Jred)、および橙色蛍光タンパク質(mOrange、mKO、Kusabira-Orange、Monomeric Kusabira-Orange、mTangerine、tdTomato)、または任意の他の適切な蛍光タンパク質が挙げられる。他の実施形態において、マーカードメインは、精製タグ

10

20

30

40

50

および／またはエピトープタグであってもよい。非限定的な例示的なタグとしては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、キチン結合タンパク質 (CBP)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオレドキシン (TRX)、ポリ (NANP)、タンデムアフィニティ精製 (TAP) タグ、myc、AcV5、AU1、AU5、E、ECS、E2、FLAG、HA、nus、Softag 1、Softag 3、Strep、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、S1、T7、V5、VSV-G、6xHis、8xHis、ビオチンカルボキシル担体タンパク質 (BCCP)、ポリ-His、およびカルモジュリンが挙げられる。非限定的な例示的なレポーター遺伝子としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質が挙げられる。

10

【0441】

追加の実施形態において、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤を特異的なオルガネラ、細胞型、組織、または臓器に標的化し得る。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤をミトコンドリアに標的化し得る。

【0442】

さらなる実施形態において、異種機能ドメインは、エフェクタードメインであってもよい。RNAガイドDNA結合剤がその標的配列に指向されるとき、例えば、Casヌクレアーゼが、gRNAによって標的配列に指向されるとき、エフェクタードメインは、標的配列を修飾するか、または影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態において、エフェクタードメインは、核酸結合ドメイン、ヌクレアーゼドメイン (例えば、非Casヌクレアーゼドメイン)、エピジェネティック修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、または転写抑制ドメインから選択され得る。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、ヌクレアーゼ、例えばFokIヌクレアーゼである。例えば、米国特許第9,023,649号を参照のこと。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、転写活性化因子または転写抑制因子である。例えば、Qi et al., "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression", Cell 152:1173-83 (2013)、Perez-Pinera et al., "RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors," Nat. Methods 10:973-6 (2013)、Mali et al., "CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering," Nat. Biotechnol. 31:833-8 (2013)、Gilbert et al., "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes," Cell 154:442-51 (2013)を参照のこと。したがって、RNAガイドDNA結合剤は、本質的に、ガイドRNAを使用して所望の標的配列に結合するように指向され得る転写因子になる。特定の

実施形態において、DNA修飾ドメインは、脱メチル化ドメインまたはメチルトランスフェラーゼドメインなどのメチル化ドメインである。特定の実施形態において、エフェクタードメインは、塩基編集ドメインなどのDNA修飾ドメインである。特定の実施形態において、DNA修飾ドメインは、DNAに特異的修飾、例えばデアミナーゼドメインを導入する核酸編集ドメインである。例えば、WO2015/089406、US 2016/0304846を参照のこと。WO2015/089406およびUS2016/0304846に記載されている核酸編集ドメイン、デアミナーゼドメイン、およびCas9バリエーションは、参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

40

【0443】

E. RNAガイドDNA結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含

50

む核酸

本明細書に開示されるRNAガイドDNA結合剤（例えば、*S. pyogenes* Cas9などのCas9ヌクレアーゼ）をコードするORFを含む核酸を、任意選択で、本明細書に開示されるgRNAのいずれかを用いる組成物または方法に組み合わせてもよい。本明細書に記載の実施形態のいずれかにおいて、RNAガイドDNA結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸は、mRNAであり得る。

1. 低アデニン含有量のORF

【0444】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤、例えば、*S. pyogenes* Cas9などのCas9ヌクレアーゼをコードするORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の約150%の範囲である。いくつかの実施形態において、ORFのアデニン含有量は、その最小アデニン含有量の約145%以下、140%以下、135%以下、130%以下、125%以下、120%以下、115%以下、110%以下、105%以下、104%以下、103%以下、102%以下、または101%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量に等しい。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約150%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約145%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約140%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約135%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約130%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約125%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約120%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約115%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約110%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約105%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約104%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約103%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約102%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約101%以下である。

【0445】

いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の200%の範囲である。いくつかの実施形態において、ORFのアデニンジヌクレオチド含有量は、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約195%以下、190%以下、185%以下、180%以下、175%以下、170%以下、165%以下、160%以下、155%以下、150%以下、145%以下、140%以下、135%以下、130%以下、125%以下、120%以下、115%以下、110%以下、105%以下、104%以下、103%以下、102%以下、または101%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量に等しい。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約200%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約195%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約190%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデ

ニンジヌクレオチド含有量の約185%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約180%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約175%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約170%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約165%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約160%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約155%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量に等しい。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約150%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約145%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約140%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約135%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約130%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約125%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約120%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約115%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約110%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約105%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約104%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約103%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約102%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約101%以下である。

【0446】

いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量から、問題となるmRNAと同じタンパク質をコードする参照配列の最大アデニンジヌクレオチド含有量の90%以下であるアデニンジヌクレオチド含有量までの範囲である。いくつかの実施形態において、ORFのアデニンジヌクレオチド含有量は、問題となるmRNAと同じタンパク質をコードする参照配列の最大アデニンジヌクレオチド含有量の約85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下である。

【0447】

いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が、0個のアデントリヌクレオチドから、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、または50個のアデントリヌクレオチドまでの範囲である（さらに長い数のアデニン、その中の固有の3個のアデニンセグメントの数として計数する、例えば、アデニンテトラヌクレオチドは、2個のアデントリヌクレオチドを含有し、アデニンペン

タヌクレオチドは、3個のアデントリヌクレオチドを含有するなど）。いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が、0%のアデントリヌクレオチドから、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、または2%のアデントリヌクレオチドまでの範囲であり、アデントリヌクレオチドの含有パーセントは、アデントリヌクレオチド（またはさらに長い数のアデニン）の一部を形成するアデニンによって占められる配列中の位置のパーセントとして計算され、その結果、配列UUUAAAおよびUUUAAAは、各々、アデントリヌクレオチド含有量が50%である。例えば、いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が2%以下である。例えば、いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が1.5%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が、1%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が、0.9%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が、0.8%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が、0.7%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が、0.6%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が、0.5%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が、0.4%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が、0.3%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が、0.2%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が、0.1%以下である。いくつかの実施形態において、アデントリヌクレオチドを含まないORFを含むRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸が提供される。

【0448】

いくつかの実施形態において、ORFは、アデントリヌクレオチド含有量が、その最小アデントリヌクレオチド含有量から、問題となるmRNAと同じタンパク質をコードする参照配列の最大アデントリヌクレオチド含有量の90%以下であるアデントリヌクレオチド含有量までの範囲である。いくつかの実施形態において、ORFのアデントリヌクレオチド含有量は、問題となるmRNAと同じタンパク質をコードする参照配列の最大アデントリヌクレオチド含有量の約85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下である。

【0449】

例えば、ORFの十分な画分において最小アデニンコドンを使用することによって、所与のORFは、アデニン含有量またはアデニンジヌクレオチド含有量またはアデントリヌクレオチド含有量を低減することができる。例えば、RNAガイドDNA結合剤のアミノ酸配列は、アミノ酸をコドンに変換することによってORF配列に逆翻訳することができ、ORFの一部またはすべては、以下に示される例示的な最小アデニンコドンを使用する。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約98%、約99%、または約100%が、表4に列挙されるコドンである。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. 例示的な最小アデニンコドン

	アミノ酸	最小アデニンコドン
A	アラニン	G C UまたはG C CまたはG C G
G	グリシン	G G UまたはG G CまたはG G G
V	バリン	G U CまたはG U UまたはG U G
D	アスパラギン酸	G A CまたはG A U
E	グルタミン酸	G A G
I	イソロイシン	A U CまたはA U U
T	スレオニン	A C UまたはA C CまたはA C G
N	アスパラギン	A A CまたはA A U
K	リジン	A A G
S	セリン	U C UまたはU C CまたはU C G
R	アルギニン	C G UまたはC G CまたはC G G
L	ロイシン	C U GまたはC U CまたはC U U
P	プロリン	C C GまたはC C UまたはC C C
H	ヒスチジン	C A CまたはC A U
Q	グルタミン	C A G
F	フェニルアラニン	U U CまたはU U U
Y	チロシン	U A CまたはU A U
C	システイン	U G CまたはU G U
W	トリプトファン	U G G
M	メチオニン	A U G

10

20

【0 4 5 0】

いくつかの実施形態において、コドンの少なくとも約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、約 9 8 %、約 9 9 %、または約 1 0 0 %が表 4 に列挙されるコドンであるコドンのセットからなる O R F を含む、RNA ガイド DNA 結合剤（例えば、S . p y o g e n e s C a s 9 などの C a s 9 ヌクレアーゼ）をコードする核酸が提供される。いくつかの実施形態において、O R F は、最小ヌクレオチドホモポリマー、例えば、同じヌクレオチドの反復ストリングを有する。例えば、いくつかの実施形態において、表 4 に列挙されるコドンから最小ウリジンコドンを選択するとき、核酸は、ヌクレオチドホモポリマーの数および長さを減少させる最小アデニンコドンを選択すること、例えば、アラニンについて G C C の代わりに G C G を選択すること、またはグリシンについて G G G の代わりに G G C を選択することによって構築される。

30

【0 4 5 1】

先行実施形態のいずれにおいても、核酸は m R N A であり得る。

【0 4 5 2】

2 . 翻訳を増加させ、かつ／または高発現 t R N A に対応するコドン、例示的なコドンセット

いくつかの実施形態において、核酸は、ヒトなどの哺乳動物における翻訳を増加させるコドンを有する O R F を含む。さらなる実施形態において、核酸は、哺乳動物（例えば、ヒト）の臓器（例えば肝臓）における翻訳を増加させるコドンを有する O R F を含む。さらなる実施形態において、核酸は、哺乳動物（例えば、ヒト）の細胞型（例えば肝細胞）における翻訳を増加させるコドンを有する O R F を含む。哺乳動物、細胞型、哺乳動物の臓器、ヒト、ヒトの臓器などにおける翻訳の増加は、O R F の野生型配列の翻訳の程度と比較して、または O R F の由来となる生物もしくはアミノ酸レベルで最も良く似た O R F を含有する生物（例えば、S . p y o g e n e s、S . a u r e u s、または原核生物に由来する C a s ヌクレアーゼであり得る場合には、別の原核生物、例えば、他の以下に記載の原核生物由来の C a s ヌクレアーゼ）のコドン分布と一致するコドン分布を有する O R F と比較して、決定することができる。あるいは、いくつかの実施形態において、哺乳動物、細胞型、哺乳動物の臓器、ヒト、ヒトの臓器などにおける C a s 9 配列の翻訳の増加は、任意の適用可能な点変異、異種ドメインなどを含む、他がすべて等しい配列番号 2

40

50

05の配列を有するORFの翻訳と比較して決定される。ヒト肝臓およびヒト肝細胞を含むヒトにおける発現を増加させるのに有用なコドンは、ヒト肝臓／肝細胞における高発現tRNAに対応するコドンであってもよく、これらはDittmar KA, PLoS Genetics 2(12): e221(2006)に記載されている。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%は、ヒトなどの哺乳動物における高発現tRNA（例えば、各アミノ酸についての最高発現tRNA）に対応するコドンである。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%は、ヒト臓器などの哺乳動物臓器における高発現tRNA（例えば、各アミノ酸についての最高発現tRNA）に対応するコドンである。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%は、ヒト肝臓などの哺乳動物肝臓における高発現tRNA（例えば、各アミノ酸についての最高発現tRNA）に対応するコドンである。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%は、ヒト肝細胞などの哺乳動物肝細胞における高発現tRNA（例えば、各アミノ酸についての最高発現tRNA）に対応するコドンである。

10

【0453】

あるいは、生物（例えば、ヒト）における高発現tRNAに対応するコドンを一般に使用してもよい。

20

【0454】

コドン選択に対する前述のアプローチのうちのいずれかは、例えば、表4のコドンから開始し、次いで、1つより多い選択肢が利用可能な場合、一般に生物（例えば、ヒト）において、または目的の臓器または細胞型、例えば、肝臓または肝細胞（例えば、ヒトの肝臓またはヒトの肝細胞）のいずれかにおいて、より高発現のtRNAに対応するコドンを使用することによって、上に示される最小アデニンコドンと組み合わせることができる。

【0455】

いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%は、表5に示されるコドンセット（例えば、低U1、低A、または低A／Uコドンセット）由来のコドンである。低U1、低G、低C、低A、および低A／Uセット中のコドンは、1つより多い選択肢が利用可能な場合、より高発現のtRNAに対応するコドンも使用しつつ、示されるヌクレオチドを最小限にするコドンを使用する。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%は、表5に示される低U1コドンセット由来のコドンである。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%は、表5に示される低Aコドンセット由来のコドンである。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%は、表5に示される低A／Uコドンセット由来のコドンである。

30

40

50

【表 5】

表 5. 例示的なコドンセット

アミノ酸	低U1	低U2	高U	低G	低C	低A	低A/U	長い半減期
G l y	G G C	G G G	G G T	G G C	G G A	G G C	G G C	G G T
G l u	G A G	G A A	G A A	G A A	G A G	G A G	G A G	G A A
A s p	G A C	G A C	G A T	G A C	G A T	G A C	G A C	G A C
V a l	G T G	G T A	G T T	G T C	G T G	G T G	G T G	G T C
A l a	G C C	G C G	G C T	G C C	G C T	G C C	G C C	G C C
A r g	A G A	C G A	C G T	A G A	A G A	C G G	C G G	A G A
S e r	A G C	A G C	T C T	T C C	A G T	T C C	A G C	T C T
L y s	A A G	A A A	A A A	A A A	A A G	A A G	A A G	A A G
A s n	A A C	A A C	A A T	A A C	A A T	A A C	A A C	A A C
M e t	A T G	A T G	A T G	A T G	A G T	A T G	A T G	A T G
I l e	A T C	A T A	A T T	A T C	A T T	A T C	A T C	A T C
T h r	A C C	A C G	A C T	A C C	A C A	A C C	A C C	A C C
T r p	T G G	T G G	T G G	T G G	T G G	T G G	T G G	T G G
C y s	T G C	T G C	T G T	T G C	T G T	T G C	T G C	T G C
T y r	T A C	T A C	T A T	T A C	T A T	T A C	T A C	T A C
L e u	C T G	C T A	T T A	C T C	T T G	C T G	C T G	T T G
P h e	T T C	T T C	T T T	T T C	T T T	T T C	T T C	T T C
G l n	C A G	C A A	C A A	C A A	C A G	C A G	C A G	C A A
H i s	C A C	C A C	C A T	C A C	C A T	C A C	C A C	C A C

10

20

【 0 4 5 6 】

30

3. 例示的な配列

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFは、配列番号311と少なくとも93%の同一性を有する配列を含み、かつ／あるいはORFは、少なくともその最初の50、200、250、もしくは300個のヌクレオチドにわたって配列番号311と少なくとも93%の同一性を有するか、または少なくともその最初の30、50、70、100、150、200、250、もしくは300個のヌクレオチドにわたって配列番号311と少なくとも95%の同一性を有し、かつ／あるいはORFは、コドンの少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくは100%が表1に列挙されるコドンであるコドンのセットからなり、かつ／あるいはORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の123%までの範囲であり、かつ／あるいはORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の150%までの範囲である。

40

【 0 4 5 7 】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするポリヌクレオチドは、配列番号377と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%の同一性を有する配列を含む。

【 0 4 5 8 】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFは、配列番号201、204、207、209、210、211、212、214、215、21

50

7、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または307～375のいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、mRNAは、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含み、RNAガイドDNA結合剤は、配列番号203、206、208、213、216、219、222、225、228、268、もしくは386～396のうちのいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の150%までの範囲であり、かつ／あるいはアデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の150%までの範囲である。いくつかの実施形態において、コードされたRNAガイドDNA結合剤は、配列番号203、206、208、213、216、219、222、225、228、268、もしくは386～396のうちのいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量～その最小ウリジン含有量の150%までの範囲であり、かつ／あるいはウリジンジヌクレオチド含有量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量～その最小ウリジンジヌクレオチド含有量の150%までの範囲である。いくつかのこのような実施形態において、アデニンおよびウリジンヌクレオチド含有量の両方は、それぞれの最小値の150%以下である。いくつかの実施形態において、アデニンおよびウリジンジヌクレオチド含有量の両方は、それぞれの最小値の150%以下である。いくつかの実施形態において、mRNAは、配列番号243、244、251、253、255～261、もしくは267のうちのいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、この配列が、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む。いくつかの実施形態において、mRNAは、配列番号243、244、251、253、255～261、もしくは267のうちのいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、この配列が、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含み、配列番号243、244、251、253、255～261、もしくは267の最初の3個のヌクレオチドが省かれる。いくつかの実施形態において、前述の同一性レベルのいずれかは、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%である。

【0459】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFは、少なくともその最初の30、50、70、100、150、200、250、もしくは300個のヌクレオチドにわたって配列番号201、204、207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または307～375のうちのいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する。その最初の30、50、70、100、150、200、250、もしくは300個のヌクレオチドは、開始コドンの最初のヌクレオチド（典型的には、ATG）から測定され、その結果、Aがヌクレオチド1であり、Tがヌクレオチド2である、などである。いくつかの実施形態において、オープンリーディングフレームは、その配列の少なくともその最初の10%、12%、15%、20%、25%、30%、または35%にわたって配列番号201、204、207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または307～375のいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する。ORFの配列の長さは、開始コドンの始まりから終止コドンの最後までヌクレオチドの数であり、その配列の最初の10%、12%、15%、20%、25%、30%、または35%は、全配列の長さの所定のパーセンテージを構成する開始コドンの最初のヌクレオチドから始まるヌクレオチドの数に対応する。

【0460】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号243と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号243のORF（す

なわち、配列番号 204) が、配列番号 207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または 307～375 のうちのいずれか 1 つの ORF と置換されている、配列を含む。

【0461】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 244 と少なくとも 90% の同一性を有し、配列番号 244 の ORF (すなわち、配列番号 204) が、配列番号 207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または 307～375 のうちのいずれか 1 つの ORF と置換されている、配列を含む。

10

【0462】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 256 と少なくとも 90% の同一性を有し、配列番号 256 の ORF (すなわち、配列番号 204) が、配列番号 207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または 307～375 のうちのいずれか 1 つの代替 ORF と置換されている、配列を含む。

【0463】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 257 と少なくとも 90% の同一性を有し、配列番号 257 の ORF (すなわち、配列番号 204) が、配列番号 207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または 307～375 のうちのいずれか 1 つの ORF と置換されている、配列を含む。

20

【0464】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 258 と少なくとも 90% の同一性を有し、配列番号 258 の ORF (すなわち、配列番号 204) が、配列番号 207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または 307～375 のうちのいずれか 1 つの ORF と置換されている、配列を含む。

30

【0465】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 259 と少なくとも 90% の同一性を有し、配列番号 259 の ORF (すなわち、配列番号 204) が、配列番号 207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または 307～375 のうちのいずれか 1 つの ORF と置換されている、配列を含む。

【0466】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 260 と少なくとも 90% の同一性を有し、配列番号 260 の ORF (すなわち、配列番号 204) が、配列番号 207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または 307～375 のうちのいずれか 1 つの ORF と置換されている、配列を含む。

40

【0467】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 261 と少なくとも 90% の同一性を有し、配列番号 261 の ORF (すなわち、配列番号 204) が、配列番号 207、209、210、211、212、21

50

4、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または307～375のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

【0468】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号376と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号376のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または307～375のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

10

【0469】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号377と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号377のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または307～375のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

【0470】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号378と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号378のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または307～375のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

20

【0471】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号379と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号379のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または307～375のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

30

【0472】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号380と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号380のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または307～375のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

【0473】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号381と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号381のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または307～375のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

40

【0474】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号382と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号382のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、22

50

9、230、250、252、254、265、266、または307～375のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

【0475】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号383と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号383のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または307～375のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

【0476】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号384と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号384のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または307～375のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

【0477】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号385と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号385のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号207、209、210、211、212、214、215、217、218、220、221、223、224、226、227、229、230、250、252、254、265、266、または307～375のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

【0478】

いくつかの実施形態において、配列番号243、244、256～61、または376～385の任意選択で置換された配列との同一性の程度は、少なくとも95%である。いくつかの実施形態において、配列番号243、244、256～61、または376～385の任意選択で置換された配列との同一性の程度は、少なくとも98%である。いくつかの実施形態において、配列番号243、244、256～61、または376～385の任意選択で置換された配列との同一性の程度は、少なくとも99%である。いくつかの実施形態において、配列番号243、244、256～61、または376～385の任意選択で置換された配列との同一性の程度は、100%である。

【0479】

4. 核酸、mRNA、およびORFの追加の特徴

本明細書に記載の追加の特徴のいずれも、実現可能な範囲で、上述の実施形態のいずれかと組み合わせられ得る。

【0480】

a) 低ウリジン含有量

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤（例えば、S. pyogenes Cas9などのCas9ヌクレアーゼ）をコードするORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量～その最小ウリジン含有量の約150%の範囲である。いくつかの実施形態において、ORFのウリジン含有量は、その最小ウリジン含有量の約145%以下、140%以下、135%以下、130%以下、125%以下、120%以下、115%以下、110%以下、105%以下、104%以下、103%以下、102%以下、または101%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量に等しい。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約150%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約145%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約140%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、そ

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

かの実施形態において、ORFは、ウリジンジヌクレオチド含有量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量の約125%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジンジヌクレオチド含有量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量の約120%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジンジヌクレオチド含有量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量の約115%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジンジヌクレオチド含有量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量の約110%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジンジヌクレオチド含有量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量の約105%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジンジヌクレオチド含有量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量の約104%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジンジヌクレオチド含有量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量の約103%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジンジヌクレオチド含有量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量の約102%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジンジヌクレオチド含有量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量の約101%以下である。

【0482】

いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジンジヌクレオチド含有量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量から、問題となるmRNAと同じタンパク質をコードする参照配列の最大ウリジンジヌクレオチド含有量の90%以下であるウリジンジヌクレオチド含有量までの範囲である。いくつかの実施形態において、ORFのウリジンジヌクレオチド含有量は、問題となるmRNAと同じタンパク質をコードする参照配列の最大ウリジンジヌクレオチド含有量の約85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下である。

【0483】

いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0個のウリジントリヌクレオチドから、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、または50個のウリジントリヌクレオチドまでの範囲である（さらに長い数のウリジンは、その中の固有の3個のウリジンセグメントの数として計数する、例えば、ウリジンテトラヌクレオチドは、2個のウリジントリヌクレオチドを含有し、ウリジンペンタヌクレオチドは、3個のウリジントリヌクレオチドを含有するなど）。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0%のウリジントリヌクレオチドから、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、または2%のウリジントリヌクレオチドまでの範囲であり、ウリジントリヌクレオチドの含有パーセントは、ウリジントリヌクレオチド（またはさらに長い数のウリジン）の一部を形成するウリジンによって占められる配列中の位置のパーセントとして計算され、その結果、配列UUUAAAおよびUUUUAAAは、各々のウリジントリヌクレオチド含有量が50%である。例えば、いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、2%以下である。例えば、いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、1.5%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、1%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.9%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.8%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.7%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.6%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.5%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.4%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.3%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌ

クレオチド含有量が、0.2%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.1%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチドを有しない。

【0484】

いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、その最小ウリジントリヌクレオチド含有量から、問題となるmRNAと同じタンパク質をコードする参照配列の最大ウリジントリヌクレオチド含有量の90%以下であるウリジントリヌクレオチド含有量までの範囲である。いくつかの実施形態において、ORFのウリジントリヌクレオチド含有量は、問題となるmRNAと同じタンパク質をコードする参照配列の最大ウリジントリヌクレオチド含有量の約85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下である。

【0485】

例えば、ORFの十分な画分において最小ウリジンコドンを使用することによって、所与のORFは、ウリジン含有量またはウリジンジヌクレオチド含有量またはウリジントリヌクレオチド含有量を低減することができる。例えば、RNAガイドDNA結合剤のアミノ酸配列は、アミノ酸をコドンに変換することによってORF配列に逆翻訳することができ、ORFの一部またはすべては、以下に示される例示的な最小ウリジンコドンを使用する。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約98%、約99%、または約100%が、表6に列挙されるコドンである。

【表6】

表6. 例示的な最小ウリジンコドン

	アミノ酸	最小ウリジンコドン
A	アラニン	GCAまたはGCCまたはGCG
G	グリシン	GGAまたはGGCまたはGGG
V	バリン	GUCまたはGUAまたはGUG
D	アスパラギン酸	GAC
E	グルタミン酸	GAAまたはGAG
I	イソロイシン	AUCまたはAUA
T	スレオニン	ACAまたはACCまたはACG
N	アスパラギン	AAC
K	リジン	AAGまたはAAA
S	セリン	AGC
R	アルギニン	AGAまたはAGG
L	ロイシン	CUGまたはCUAまたはCUC
P	プロリン	CCGまたはCCAまたはCCC
H	ヒスチジン	CAC
Q	グルタミン	CAGまたはCAA
F	フェニルアラニン	UUC
Y	チロシン	UAC
C	システイン	UGC
W	トリプトファン	UGG
M	メチオニン	AUG

【0486】

いくつかの実施形態において、ORFは、コドンの少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%が、表6に列挙されるコドンである、コドンのセットからなる。

【0487】

b) 低アデニンおよびウリジン含有量

実行可能な範囲で、低アデニン含有量に関して本明細書に記載される特徴のいずれかを、低ウリジン含有量に関して本明細書に記載される特徴のいずれかと組み合わせることが

できる。例えば、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量～その最小ウリジン含有量の約150%の範囲であり（例えば、ORFのウリジン含有量は、その最小ウリジン含有量の約145%以下、140%以下、135%以下、130%以下、125%以下、120%以下、115%以下、110%以下、105%以下、104%以下、103%以下、102%以下、または101%以下であり）、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の約150%の範囲である（例えば、その最小アデニン含有量の約145%以下、140%以下、135%以下、130%以下、125%以下、120%以下、115%以下、110%以下、105%以下、104%以下、103%以下、102%以下、または101%以下である）ORFを含む、RNAガイドDNA結合剤をコードする核酸（例えば、mRNA）が提供され得る。ウリジンおよびアデニンジヌクレオチドについても同様である。同様に、ORF中のウリジンヌクレオチドおよびアデニンジヌクレオチドの含有量は、上に記載したとおりであってもよい。同様に、ORF中のウリジンジヌクレオチドおよびアデニンヌクレオチドの含有量は、上に記載したとおりであってもよい。

【0488】

例えば、ORFの十分な画分において最小ウリジンおよびアデニンコドンを使用することによって、所与のORFは、ウリジンおよびアデニンヌクレオチドおよび／またはジヌクレオチド含有量を低減することができる。例えば、RNAガイドDNA結合剤のアミノ酸配列は、アミノ酸をコドンに変換することによってORF配列に逆翻訳することができ、ORFの一部またはすべては、以下に示される例示的な最小ウリジンおよびアデニンコドンを使用する。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約98%、約99%、または約100%が、表7に列挙されるコドンである。

【表7】

表7. 例示的な最小ウリジンおよびアデニンコドン

	アミノ酸	最小ウリジンコドン
A	アラニン	GCCまたはGCG
G	グリシン	GGCまたはGGG
V	バリン	GUCまたはGUG
D	アスパラギン酸	GAC
E	グルタミン酸	GAG
I	イソロイシン	AUC
T	スレオニン	ACCまたはACG
N	アスパラギン	AAC
K	リジン	AAG
S	セリン	AGCまたはUCCまたはUCG
R	アルギニン	CGCまたはCGG
L	ロイシン	CUGまたはCUC
P	プロリン	CCGまたはCCC
H	ヒスチジン	CAC
Q	グルタミン	CAG
F	フェニルアラニン	UUC
Y	チロシン	UAC
C	システイン	UGC
W	トリプトファン	UGG
M	メチオニン	AUG

【0489】

いくつかの実施形態において、ORFは、コドンの少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%が、表7に列挙されるコドンである、コドンのセットからなる。表7からわかるだろうが、列挙されている3つのセリンコドンの各々は、1個のAまたは1個のUのいずれかを含有する。いくつかの実施形態において、ウリジン最小化は、セリンについてAGCコドンを使用することによって優先される。いくつかの実施形態において、アデニン最小化は、セリンに対してUCCおよび／ま

たはUCGコドンを使用することによって優先される。

【0490】

c) UTR、Kozak配列

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、5'UTR、3'UTR、または5'UTRおよび3'UTRを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、ヒドロキシステロイド 17-β-デヒドロゲナーゼ4（HSD17B4またはHSD）由来の少なくとも1つのUTR、例えば、HSD由来の5'UTRを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、グロビンポリヌクレオチド（例えば、mRNA）、例えば、ヒトアルファグロビン（HBA）ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）、ヒトベータグロビン（HBB）ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）、またはXenopus laevisベータグロビン（XBG）ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）由来の少なくとも1つのUTRを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、グロビンポリヌクレオチド（例えば、mRNA）、例えば、HBA、HBB、またはXBG由来の5'UTR、3'UTR、または5'および3'UTRを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス（CMV）、マウスHba-a1、HSD、アルブミン遺伝子、HBA、HBB、またはXBG由来の5'UTRを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス、マウスHba-a1、HSD、アルブミン遺伝子、HBA、HBB、またはXBG由来の3'UTRを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス、マウスHba-a1、HSD、アルブミン遺伝子、HBA、HBB、XBG、熱ショックタンパク質90（Hsp90）、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）、ベータ-アクチン、アルファ-チューブリン、腫瘍タンパク質（p53）、または上皮成長因子受容体（EGFR）由来の5'および3'UTRを含む。

【0491】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、同じ供給源、例えば、アクチン、アルブミン、またはHBA、HBB、またはXBGなどのグロビンなどの構成的に発現されたポリヌクレオチド（例えば、mRNA）由来の5'および3'UTRを含む。

【0492】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、配列番号232、234、236、238、241、または275~277のうちのいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する5'UTRを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、配列番号233、235、237、239、または240のうちのいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する3'UTRを含む。いくつかの実施形態において、前述の同一性レベルのいずれかは、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%である。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、配列番号232、234、236、238、または241のうちのいずれか1つの配列を有する5'UTRを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、配列番号233、235、237、239、または240のうちのいずれか1つの配列を有する3'UTRを含む。

【0493】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、5'UTRを含まず、例えば、5'キャップと開始コドンとの間に追加のヌクレオチドは存在しない。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、5'キャップと開始コドンとの間にKozak配列（以下に記載される）を含むが、任意の追加の5'UTRを有しない。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、3'UTRを含まず、例えば、終止コドンとポリAテールとの間に追加のヌクレオチドは存

在しない。

【0494】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、Kozak配列を含む。Kozak配列は、核酸から翻訳されるポリペプチドの翻訳開始および全収率に影響を及ぼす可能性がある。Kozak配列は、開始コドンとして機能し得るメチオニンコドンを含む。最小Kozak配列は、NNNRUGNであり、以下のうちの少なくとも1つが真である。第1のNがAまたはGであり、第2のNがGである。ヌクレオチド配列の文脈において、Rは、プリン（AまたはG）を意味する。いくつかの実施形態において、Kozak配列は、RNNRUGN、NNNRUGG、RNNRUGG、RNNAUGN、NNNAUGG、またはRNNAUGGである。いくつかの実施形態において、Kozak配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、または1個もしくは2個までのミスマッチを有するrccRUGgである。いくつかの実施形態において、Kozak配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、または1個もしくは2個までのミスマッチを有するrccAUGgである。いくつかの実施形態において、Kozak配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、または1個、2個、もしくは3個までのミスマッチを有するgccRccAUGG（配列番号305のヌクレオチド4～13）である。いくつかの実施形態において、Kozak配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、または1個、2個、3個、もしくは4個までのミスマッチを有するgccAccAUGである。いくつかの実施形態において、Kozak配列は、GCCACCAUGである。いくつかの実施形態において、Kozak配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、または1個、2個、3個、もしくは4個までのミスマッチを有するgccgccRccAUGG（配列番号305）である。

【0495】

d) ポリAテール

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、ポリアデニル化（ポリA）テールをさらに含む。場合によっては、ポリAテールは、ポリAテール内の1つ以上の位置で、1つ以上の非アデニンヌクレオチド「アンカー」で「中断される」。ポリAテールは、少なくとも8個の連続するアデニンヌクレオチドを含み得るが、1個以上の非アデニンヌクレオチドも含む。本明細書で使用される場合、「非アデニンヌクレオチド」は、アデニンを含まない任意の天然または非天然ヌクレオチドを指す。グアニン、チミン、およびシトシンヌクレオチドは、例示的な非アデニンヌクレオチドである。したがって、本明細書に記載のポリヌクレオチド（例えば、mRNA）上のポリAテールは、目的のRNAガイドDNA結合剤または配列をコードするヌクレオチドに対して3'に位置する連続するアデニンヌクレオチドを含み得る。場合によっては、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）上のポリAテールは、RNAガイドDNA結合剤または目的の配列をコードするヌクレオチドに対して3'に位置する非連続アデニンヌクレオチドを含み、非アデニンヌクレオチドは、規則的な間隔もしくは不規則な間隔でアデニンヌクレオチドを中断する。

【0496】

いくつかの実施形態において、ポリAテールは、mRNAのインビトロ転写に使用されるプラスミドにコードされ、転写産物の一部となる。プラスミドにコードされるポリA配列、すなわち、ポリA配列中の連続するアデニンヌクレオチドの数は、正確でなくてもよく、例えば、プラスミド中の100個のポリA配列は、転写されたmRNA中に正確に100個のポリA配列を生じさせなくてもよい。いくつかの実施形態において、ポリAテールは、プラスミドにコードされておらず、PCRテーリングまたは酵素テーリングによって、例えば、E. coliポリ（A）ポリメラーゼを使用して追加される。

【0497】

いくつかの実施形態において、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、ポリ（A）結合タンパク質が一連の連続するアデニンヌクレオチドに結合することができるように、連続

したアデニンヌクレオチドを中断するように配置される。いくつかの実施形態において、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8、9、10、11、または12個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。いくつかの実施形態において、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8～50個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。いくつかの実施形態において、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8～100個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。いくつかの実施形態において、非アデニンヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、または7個のアデニンヌクレオチドの後にあり、その後に少なくとも8個の連続するアデニンヌクレオチドが続く。

【0498】

本開示のポリAテールは、連続するアデニンヌクレオチドの1個の配列、それに続く1個以上の非アデニンヌクレオチド、任意選択で、追加のアデニンヌクレオチドを含み得る。

【0499】

いくつかの実施形態において、ポリAテールは、1個の非アデニンヌクレオチドまたは1個の連続する一連の2～10個の非アデニンヌクレオチドを、含むかまたは含有する。いくつかの実施形態において、非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8、9、10、11、または12個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。場合によっては、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8～50個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。いくつかの実施形態において、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。

【0500】

いくつかの実施形態において、非アデニンヌクレオチドは、グアニン、シトシン、またはチミンである。場合によっては、非アデニンヌクレオチドはグアニンヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、非アデニンヌクレオチドは、シトシンヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、非アデニンヌクレオチドは、チミンヌクレオチドである。場合によっては、1個より多い非アデニンヌクレオチドが存在する場合、非アデニンヌクレオチドは、a) グアニンおよびチミンヌクレオチド、b) グアニンおよびシトシンヌクレオチド、c) チミンおよびシトシンヌクレオチド、またはd) グアニン、チミンおよびシトシンヌクレオチドから選択されてもよい。非アデニンヌクレオチドを含む例示的なポリAテールは、配列番号262として提供される。

【0501】

e) 修飾ヌクレオチド

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、一部またはすべてのウリジン位置に、修飾ウリジンを含む。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、例えば、ハロゲンまたはC1～C3アルコキシで、5位で修飾されたウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、例えば、C1～C3アルキルで、1位で修飾されたシュードウリジンである。修飾ウリジンは、例えば、シュードウリジン、N1-メチルシュードウリジン、5-メトキシウリジン、5-ヨードウリジン、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、5-メトキシウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、シュードウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、N1-メチルシュードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、シュードウリジンとN1-メチルシュードウリジンとの組み合わせである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、シュードウリジンと5-メトキシウリジンとの組み合わせである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、N1-メチルシュードウリジンと5-メトキシウリジンとの組み合わせである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、5-ヨ

10

20

30

40

50

ードウリジンとN1-メチルシュードウリジンとの組み合わせである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、シュードウリジンと5-ヨードウリジンとの組み合わせである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、5-ヨードウリジンと5-メトキシウリジンとの組み合わせである。

【0502】

いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%は、修飾ウリジンである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の10%~25%、15~25%、25~35%、35~45%、45~55%、55~65%、65~75%、75~85%、85~95%、または90~100%は、修飾ウリジン、例えば、5-メトキシウリジン、5-ヨードウリジン、N1-メチルシュードウリジン、シュードウリジン、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の10%~25%、15~25%、25~35%、35~45%、45~55%、55~65%、65~75%、75~85%、85~95%、または90~100%は、5-メトキシウリジンである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の10%~25%、15~25%、25~35%、35~45%、45~55%、55~65%、65~75%、75~85%、85~95%、または90~100%は、シュードウリジンである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の10%~25%、15~25%、25~35%、35~45%、45~55%、55~65%、65~75%、75~85%、85~95%、または90~100%は、N1-メチルシュードウリジンである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の10%~25%、15~25%、25~35%、35~45%、45~55%、55~65%、65~75%、75~85%、85~95%、または90~100%は、5-ヨードウリジンである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の10%~25%、15~25%、25~35%、35~45%、45~55%、55~65%、65~75%、75~85%、85~95%、または90~100%は、5-メトキシウリジンであり、残りは、N1-メチルシュードウリジンである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の10%~25%、15~25%、25~35%、35~45%、45~55%、55~65%、65~75%、75~85%、85~95%、または90~100%は、5-ヨードウリジンであり、残りは、N1-メチルシュードウリジンである。

【0503】

f) 5' キャップ

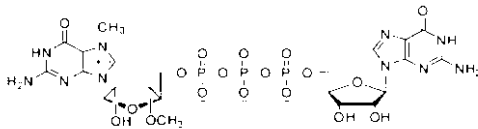
いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸（例えば、mRNA）は、5' キャップ、例えば、Cap0、Cap1、またはCap2を含む。5' キャップは、一般に、核酸の5'-3' 鎖の第1のヌクレオチド（すなわち、第1のキャップ近位のヌクレオチド）の5' 位に対して5'-トリホスフェートを介して連結した7-メチルグアニンリボヌクレオチド（例えば、ARCAに関して、以下に記載されるようにさらに修飾されてもよい）である。Cap0において、mRNAの第1および第2のキャップ近位のヌクレオチドのリボースは、両方とも、2'-ヒドロキシルを含む。Cap1において、mRNAの第1および第2の転写ヌクレオチドのリボースは、それぞれ、2'-メトキシおよび2'-ヒドロキシを含む。Cap2において、mRNAの第1および第2のキャップ近位のヌクレオチドのリボースは、両方とも、2'-メトキシを含む。例えば、Katibah et al. (2014) Proc Natl Acad Sci USA 111(33):12025-30、Abbas et al. (2017) Proc Natl Acad Sci USA 114(11):E2106-E2115を参照のこと。ヒト核酸などの哺乳動物核酸を含む、ほとんどの内因性の高級真核生物mRNAは、Cap1またはCap2を含む。Cap0、およびCap1およびCap2とは異なる他のキャップ構造は、IFIT-1およびIFIT-5等の自然免疫系の構成要素によって「非自己」として認識されるため、ヒト等の哺乳動物において免疫原性である場

合があり、I型インターフェロンを含むサイトカインレベルの上昇を引き起こし得る。I F I T-1およびI F I T-5などの自然免疫系の構成要素はまた、C a p 1またはC a p 2以外のキャップとの核酸の結合についてe I F 4 Eと競合する場合があります、m R N Aの翻訳を潜在的に阻害する。

【0504】

キャップは、RNA中に共転写的に含めることができる。例えば、A R C A（抗逆キャップ類似体、Thermo Fisher Scientificカタログ番号A M 8 0 4 5）は、グアニンリボヌクレオチドの5'位に連結する7-メチルグアニン3'-メトキシ-5'-トリホスフェートを含むキャップ類似体であり、開始時にインビトロで転写産物に組み込むことができる。A R C Aは、第1のキャップ近位のヌクレオチドの2'位がヒドロキシルであるC a p 0キャップをもたらす。例えば、Stepinski et al., (2001) "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl (3'-O-methyl) GpppG and 7-methyl (3'-deoxy) GpppG," RNA 7:1486-1495を参照のこと。A R C Aの構造を以下に示す。

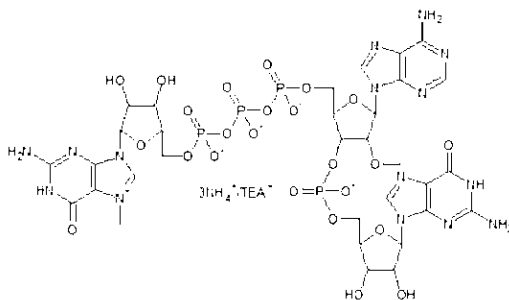
【化6】



【0505】

CleanCap（商標）A G（m7G（5'）ppp（5'）（2'OMeA）pG、TriLink Biotechnologiesカタログ番号N-7113）またはCLeanCap（商標）G G（m7G（5'）ppp（5'）（2'OMeG）pG、TriLink Biotechnologiesカタログ番号N-7133）を使用して、C a p 1構造を共転写的に提供することができる。CLeanCap（商標）A GおよびCLeanCap（商標）G Gの3'-O-メチル化態様も、それぞれ、カタログ番号N-7413およびN-7433としてTriLink Biotechnologiesから入手可能である。CLeanCap（商標）A Gの構造を以下に示す。CLeanCap（商標）構造は、本明細書において、上に列挙されているカタログ番号の最後の3桁を使用して言及されることがある（例えば、TriLink Biotechnologiesカタログ番号N-7113について「CleanCap（商標）113」）。

【化7】



【0506】

あるいは、転写後に、キャップをRNAに付加することができる。例えば、Vacciniaキャッピング酵素は市販されており（New England Biolabs カタログ番号M2080S）、そのD1サブユニットによって与えられるRNAトリホスファターゼおよびグアニリルトランスフェラーゼ活性、ならびにそのD12サブユニットに

よって与えられるグアニンメチルトランスフェラーゼを有する。したがって、S-アデノシルメチオニンおよびGTPの存在下で、Cap0を与えるように、7-メチルグアニンをRNAに付加することができる。例えば、Guo, P. and Moss, B. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4023-4027、Mao, X. and Shuman, S. (1994) J. Biol. Chem. 269, 24472-24479を参照のこと。キャップおよびキャッピングアプローチの追加の考察については、例えば、WO2017/053297およびIshikawa et al., Nucl. Acids. Symp. Ser. (2009) No. 53, 129-A130を参照のこと。

【0507】

F. RNAの有効性の決定

いくつかの実施形態において、gRNAの有効性は、他の構成要素、例えば、本明細書に記載されるもののいずれかなどのRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸とともに送達されるときに決定される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドおよびgRNA、ならびに任意選択でRNAガイドDNA結合剤またはこのような薬剤をコードする核酸の組み合わせの有効性が決定される。

【0508】

本明細書に記載される場合、本明細書に開示されるRNAガイドDNA結合剤およびガイドRNAの使用は、DNAにおいて二本鎖切断を生じる場合があり、細胞機構による修復時に挿入／欠失（インデル）変異の形態でエラーを生じ得る。インデルに起因する多くの変異は、リーディングフレームを改変させるか、または未成熟終止コドンを導入し、したがって、非機能性タンパク質を産生する。

【0509】

いくつかの実施形態において、gRNA、コルチコステロイド、および任意選択でRNAガイドDNA結合剤またはこのような薬剤をコードする核酸を投与することを含む、特定のgRNA、組成物、または治療の有効性は、インビトロモデルに基づいて決定される。いくつかの実施形態において、インビトロモデルは、HEK293細胞である。いくつかの実施形態において、インビトロモデルは、HUH7ヒト肝臓癌細胞である。いくつかの実施形態において、インビトロモデルは、HepG2細胞である。いくつかの実施形態において、インビトロモデルは、初代ヒト肝細胞である。いくつかの実施形態において、インビトロモデルは、初代カニクイザル肝細胞である。初代ヒト肝細胞を使用することに関して、市販の初代ヒト肝細胞を使用して、実験間のより高い一貫性を提供することができる。いくつかの実施形態において、インビトロモデルにおいて（例えば、初代ヒト肝細胞において）欠失または挿入が起こるオフターゲット部位の数は、例えば、インビトロでCas9 mRNAおよびガイドRNAでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞由来のゲノムDNAを分析することによって、決定される。いくつかの実施形態において、そのような決定は、インビトロでCas9 mRNA、ガイドRNA、およびドナーオリゴヌクレオチドでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞由来のゲノムDNAを分析することを含む。そのような決定のための例示的な手順を以下の作業実施例に提供する。

【0510】

いくつかの実施形態において、gRNA、コルチコステロイド、および任意選択でRNAガイドDNA結合剤またはこのような薬剤をコードする核酸を投与することを含む、特定のgRNA、組成物、または治療の有効性は、gRNA選択プロセスのための複数のインビトロ細胞モデルにわたって決定される。いくつかの実施形態において、選択されたgRNAとのデータの細胞株比較が行われる。いくつかの実施形態において、複数の細胞モデルで交差スクリーニングを実施する。

【0511】

いくつかの実施形態において、gRNA、コルチコステロイド、および任意選択でRNAガイドDNA結合剤またはこのような薬剤をコードする核酸を投与することを含む、特定のgRNA、組成物、または治療の有効性は、インビボモデルに基づいて決定される。

いくつかの実施形態において、インビボモデルは、げっ歯類モデルである。いくつかの実施形態において、げっ歯類モデルは、変異体ヒト T T R 遺伝子であり得るヒト T T R 遺伝子を発現するマウスである。いくつかの実施形態において、インビボモデルは、非ヒト霊長類、例えばカニクイザルである。

【0512】

いくつかの実施形態において、gRNA、コルチコステロイド、および任意選択でRNAガイドDNA結合剤またはこのような薬剤をコードする核酸を投与することを含む、ガイドRNA、組成物、または治療の有効性は、T T R の編集パーセントによって測定される。いくつかの実施形態において、T T R の編集パーセントを、例えば、インビトロモデルの場合には全細胞培養物において、またはインビボモデルの場合には血清または組織において、T T R タンパク質のノックダウンを達成するために必要な編集パーセントと比較する。

10

【0513】

いくつかの実施形態において、gRNA、コルチコステロイド、および任意選択でRNAガイドDNA結合剤またはこのような薬剤をコードする核酸を投与することを含む、gRNA、組成物、または治療の有効性は、標的細胞型のゲノム内のオフターゲット配列のインデルの数および／または頻度によって測定される。いくつかの実施形態において、細胞集合体において、および／または標的部位におけるインデル生成の頻度と比較して、非常に低い頻度（例えば、5%未満）で、オフターゲット部位でインデルを生成する有効なガイドRNAが提供される。したがって、本開示は、標的細胞型（例えば、肝細胞）においてオフターゲットインデル形成を示さないか、または細胞集合において、および／または標的部位でのインデル生成の頻度と比較して、オフターゲットインデル形成の頻度が5%未満であるガイドRNAを提供する。いくつかの実施形態において、本開示は、標的細胞型（例えば、肝細胞）において任意のオフターゲットインデル形成を示さないガイドRNAを提供する。いくつかの実施形態において、例えば、本明細書に記載される1つ以上の方法によって評価される場合、5個未満のオフターゲット部位においてインデルを生成するガイドRNAが提供される。いくつかの実施形態において、例えば、本明細書に記載される1つ以上の方法によって評価される場合、4、3、2、または1個以下のオフターゲット部位においてインデルを生成するガイドRNAが提供される。いくつかの実施形態において、オフターゲット部位は、標的細胞（例えば、肝細胞）ゲノム内のタンパク質コード領域内では発生しない。

20

30

【0514】

いくつかの実施形態において、遺伝子編集事象、例えば、挿入／欠失（「インデル」）変異の形成、および標的DNAにおける相同性誘導修復（HDR）事象を検出することは、WO2018/067447またはSchmidt et al., Nature Methods 4:1051-1057 (2007)に記載されるように、タグ化プライマーを用いた線形増幅およびタグ化増幅産物の単離を利用する（本明細書ではこれ以降、「LAM-PCR」または「線形増幅（LA）」法と呼ばれる）。

【0515】

いくつかの実施形態において、本方法は、二本鎖切断（DSB）を有するように誘導され、任意選択でDSBを修復するためにHDRテンプレートとともに提供された細胞から細胞DNAを単離することと、タグ化プライマーを用いてDNAの線形増幅の少なくとも1つのサイクルを行うことと、タグを含む線形増幅産物を単離することによって、非タグ化プライマーで増幅された任意の増幅産物を破棄することと、任意選択で、単離された産物をさらに増幅することと、線形増幅産物もしくはさらなる増幅産物を分析して、編集事象、例えば、標的DNAにおける二本鎖切断、挿入、欠失、またはHDRテンプレート配列の有無を決定することと、を含む。場合によっては、編集イベントを定量化することができる。本明細書で使用される定量化など（HDRおよびインデルなどの非HDR編集事象の文脈を含む）は、集合体における編集事象の頻度および／または種類を検出することを含む。

40

【0516】

50

いくつかの実施形態において、線形増幅の1つのサイクルのみが実施される。

【0517】

場合によっては、タグ化プライマーは、分子バーコードを含む。いくつかの実施形態において、タグ化プライマーは、分子バーコードを含み、線形増幅の1つのサイクルのみが実施される。

【0518】

いくつかの実施形態において、遺伝子編集事象、例えば、挿入／欠失（「インデル」）変異の形成、および標的DNAにおける相同性誘導修復（HDR）事象を検出することは、線形増幅産物またはさらなる増幅産物をシーケンシングすることをさらに含む。シーケンシングは、次世代配列決定、および線形増幅産物またはさらなる増幅産物のプラスミドへのクローニング、プラスミドまたはプラスミドの一部のシーケンシングを含め、当業者に既知の任意の方法を含んでもよい。例示的な次世代シーケンシング方法は、例えば、Shendure et al., Nature 26: 1135-1145 (2008)に記載される。他の態様において、遺伝子編集事象、例えば、挿入／欠失（「インデル」）変異の形成、および標的DNAにおける相同性誘導修復（HDR）事象を検出することは、線形増幅産物もしくはさらなる増幅産物に対してデジタルPCR（dPCR）またはドロップレットデジタルPCR（ddPCR）を行うこと、または線形増幅産物もしくはさらなる増幅産物と、HDRテンプレート配列を含むDNAを特定するように設計された核酸プローブとを接触させること、および線形増幅産物もしくはさらなる増幅産物に結合したプローブを検出することをさらに含む。いくつかの実施形態において、本方法は、標的DNAにおけるHDRテンプレートの位置を決定することをさらに含む。

【0519】

特定の実施形態において、本方法は、標的DNA内の挿入部位の配列を決定することをさらに含み、挿入部位は、HDRテンプレートが標的DNAに組み込まれる位置であり、挿入部位は、いくつかの標的DNA配列およびいくつかのHDRテンプレート配列を含み得る。

【0520】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAまたは組み合わせの有効性は、TTRの分泌によって測定される。いくつかの実施形態において、TTRの分泌は、細胞培地または血清を用いた酵素結合免疫吸着（ELISA）アッセイを用いて測定される。いくつかの実施形態において、TTRの分泌は、編集を測定するために使用されるのと同じインビトロまたはインビボ系またはモデルにおいて測定される。いくつかの実施形態において、TTRの分泌は、初代ヒト肝細胞において測定される。いくつかの実施形態において、TTRの分泌は、HUH7細胞において測定される。いくつかの実施形態において、TTRの分泌は、HepG2細胞において測定される。

【0521】

ELISAアッセイは、当業者に一般的に知られており、血清TTRレベルを決定するように設計することができる。例示的な一実施形態において、血液を収集し、血清を単離する。全TTR血清レベルは、Mouse Prealbumin (Transferrin) ELISA Kit (Aviva Systems Biology、カタログOKIA00111) またはヒトTTRを測定するための同様のキットを使用して決定され得る。キットが利用可能ではない場合、測定するときにTTRに特異的な捕捉抗体で事前にコーティングされたプレートを使用して、ELISAを開発することができる。プレートを室温で所定時間インキュベートした後、洗浄する。酵素-抗TTR抗体コンジュゲートを添加し、インキュベートする。未結合の抗体コンジュゲートを除去し、プレートを洗浄した後、酵素と反応する発色基質溶液を添加する。プレートを、使用される酵素および基質に特有の吸光度で、適切なプレートリーダーで読み取る。

【0522】

いくつかの実施形態において、細胞（組織由来のものを含む）中のTTRの量は、gRNAまたは組み合わせの有効性を測定する。いくつかの実施形態において、細胞中のTTR

Rの量は、ウェスタンブロットを使用して測定される。いくつかの実施形態において、使用される細胞は、H U H 7細胞である。いくつかの実施形態において、使用される細胞は、初代ヒト肝細胞である。いくつかの実施形態において、使用される細胞は、動物から得られる初代細胞である。いくつかの実施形態において、T T Rの量を、細胞数の変化を制御するために、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼG A P D H（ハウスキーパー遺伝子）の量と比較する。

【0523】

III. LNP製剤およびA T T Rの治療

いくつかの実施形態において、A T T Rを治療する方法であって、コルチコステロイドと、本明細書に記載されるガイドRNA（例えば、配列番号5～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む）を含む組成物とを投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号5～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが投与され、A T T Rを治療する。ガイドRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）、またはRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする、本明細書に記載の核酸もしくはベクターとともに投与され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、Casクリパーゼである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、II型CRISPR/Cas系由来のCasである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、Cas9である。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9ヌクレアーゼである。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

【0524】

いくつかの実施形態において、A T T Rを治療する方法であって、コルチコステロイドと、本明細書に記載のガイドRNA（例えば、配列番号5～72、74～78、および80～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～113、115～120、および122～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む）を含む組成物とを投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号5～72、74～78、および80～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～113、115～120、および122～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが投与され、A T T Rを治療する。ガイドRNAは、任意選択で、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）、またはRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする、本明細書に記載の核酸もしくはベクターとともに投与される。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、Casクリパーゼである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、II型CRISPR/Cas系由来のCasである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、Cas9である。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9ヌクレアーゼである。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

【0525】

いくつかの実施形態において、TTR血清濃度を低減する方法であって、コルチコステロイドと、本明細書に記載されるガイドRNA（例えば、配列番号5～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む）とを投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号5～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが投与され、アミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積を低減もしくは予防する。gRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードする本明細書に記載される核酸またはベクターとともに投与される。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、Casクリパーゼである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、II型CRISPR/Cas系由来のCasである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、Cas9である。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9ヌクレアーゼである。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

【0526】

いくつかの実施形態において、TTR血清濃度を低減する方法であって、本明細書に記載のガイドRNA（例えば、配列番号5～72、74～78、および80～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～113、115～120、および122～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む）を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号5～72、74～78、および80～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～113、115～120、および122～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが投与され、アミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積を低減もしくは予防する。ガイドRNAは、任意選択で、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）、またはRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする、本明細書に記載の核酸もしくはベクターとともに投与される。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、Casクリパーゼである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、II型CRISPR/Cas系由来のCasである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、Cas9である。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9ヌクレアーゼである。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

【0527】

いくつかの実施形態において、対象のアミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積を低減もしくは予防する方法であって、コルチコステロイドと、本明細書に記載されるガイドRNA（例えば、配列番号5～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む）とを含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、対象のアミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積を低減もしくは予防する方法であって、コルチコステロイドと、配列番号87～113のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む組成物とを投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形

態において、配列番号 5～82 のガイド配列のうちのいずれか 1 つ以上、または配列番号 87～124 の sgRNA のうちのいずれか 1 つ以上を含む gRNA が投与され、アミロイドもしくはアミロイド原線維における TTR の蓄積を低減もしくは予防する。gRNA は、任意選択で、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼ、例えば、Cas ヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードする本明細書に記載される核酸またはベクターとともに投与される。いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼは、Cas クリパーゼである。いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼは、II 型 CRISPR/Cas 系由来の Cas である。いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼは、Cas9 である。いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9 ヌクレアーゼである。特定の実施形態において、ガイド RNA は化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイド RNA および RNA ガイド DNA ヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載の LNP、例えば、CCD 脂質（例えば、脂質 A などのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMG などの PEG 脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含む LNP で投与される。

【0528】

いくつかの実施形態において、対象のアミロイドもしくはアミロイド原線維における TTR の蓄積を低減もしくは予防する方法であって、本明細書に記載されるガイド RNA（例えば、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 のガイド配列のうちのいずれか 1 つ以上、または配列番号 87～124 の sgRNA のうちのいずれか 1 つ以上を含む）を含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、対象のアミロイドもしくはアミロイド原線維における TTR の蓄積を低減もしくは予防する方法であって、配列番号 87～113、115～120、および 122～124 の sgRNA のうちのいずれか 1 つ以上を含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 のガイド配列のうちのいずれか 1 つ以上、または配列番号 87～113、115～120、および 122～124 の sgRNA のうちのいずれか 1 つ以上を含む gRNA が投与され、アミロイドもしくはアミロイド原線維における TTR の蓄積を低減もしくは予防する。ガイド RNA は、任意選択で、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼ、例えば、Cas ヌクレアーゼ（例えば、Cas9）、または RNA ガイド DNA ヌクレアーゼをコードする、本明細書に記載の核酸もしくはベクターとともに投与される。いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼは、Cas クリパーゼである。いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼは、II 型 CRISPR/Cas 系由来の Cas である。いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼは、Cas9 である。いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9 ヌクレアーゼである。特定の実施形態において、ガイド RNA は化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイド RNA および RNA ガイド DNA ヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載の LNP、例えば、CCD 脂質（例えば、脂質 A などのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMG などの PEG 脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含む LNP で投与される。

【0529】

いくつかの実施形態において、表 1 のガイド配列もしくは表 2 からの 1 つ以上の sgRNA を、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼ、例えば、核酸から翻訳された Cas ヌクレアーゼと一緒に含む gRNA は、DSB を誘導し、修復中の非相同性末端結合（NHEJ）が、TTR 遺伝子内の変異をもたらす。いくつかの実施形態において、NHEJ は、ヌクレオチドの欠失または挿入を引き起こし、TTR 遺伝子におけるフレームシフトまたはナンセンスを誘導する。

【0530】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドおよびガイド RNA（および任意選

択でRNAガイドDNA結合剤もしくはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸)を(例えば、本明細書に提供される組成物で)投与することは、対象におけるTTRのレベル(例えば、血清レベル)を低下させ、したがって、アミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積および凝集を予防する。

【0531】

いくつかの実施形態において、対象のアミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積および凝集を低減もしくは予防することは、対象の1つ以上の組織、例えば、胃、結腸、または神経組織におけるTTR沈着を低減または予防することを含む。いくつかの実施形態において、神経組織は、坐骨神経または後根神経節を含む。いくつかの実施形態において、TTR沈着は、胃、結腸、坐骨神経、および後根神経節のうちの2つ、3つ、または4つにおいて低減する。所与の組織における沈着のレベルは、例えば、免疫染色を使用して、生検試料を使用して決定することができる。いくつかの実施形態において、対象のアミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積を低減もしくは予防すること、および／またはTTR沈着を低減もしくは予防することは、所定時間、血清TTRレベルを低減することに基づいて推測される。実施例で考察されるように、本明細書で提供される方法および使用に従って血清TTRレベルを低減することによって、例えば、組成物の投与の8週間後に測定されるように、上および実施例で考察されるものなどの組織から沈着したTTRのクリアランスを引き起こし得ることが見出されている。

【0532】

いくつかの実施形態において、対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態において、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態において、対象は、ウシ、ブタ、サル、ヒツジ、イヌ、ネコ、魚、または家禽である。

【0533】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の1つ以上のガイドRNA(例えば、表1のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または表2からの1つ以上のsgRNAを含む)(例えば、本明細書で提供される組成物で)の使用、ならびにRNAガイドDNA結合剤をコードする本明細書に記載の核酸(例えば、mRNA)の使用は、ATTRを有するヒト対象を治療するための医薬の調製のために提供される。RNAガイドDNA結合剤は、Cas9、例えば、Spyogenes Cas9であってもよい。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。

【0534】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよび核酸を含む組成物は、静脈内に投与される。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよび核酸を含む組成物は、肝循環に投与される。

【0535】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるガイドRNA(および任意選択でRNAガイドDNA結合剤もしくはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸)を含む組成物の単回投与は、変異体タンパク質の発現をノックダウンするのに十分である。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるガイドRNA(および任意選択でRNAガイドDNA結合剤もしくはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸)を含む組成物の単回投与は、細胞の集合体における変異体タンパク質の発現をノックダウンするのに十分である。他の実施形態において、本明細書で提供されるガイドRNA(および任意選択でRNAガイドDNA結合剤もしくはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸)を含む組成物の1回より多い投与は、累積的な効果によって編集を最大化するのに有益であり得る。例えば、本明細書で提供される組成物は、2回、3回、4回、5回、またはさらに多く、例えば、2回投与することができる。投与は、例えば、1日間～2年間、例えば、1日間～7日間、7日間～14日間、14日間～30日間、30日間～60日間、60日間～120日間、120日間～183日間、183日間～274日間、274日間～366日間、または366日間～2年間の範囲の期間で分割することができる。

【0536】

いくつかの実施形態において、組成物は、 $0.01 \sim 10 \text{ mg/kg (mpk)}$ 、例えば、 $0.01 \sim 0.1 \text{ mpk}$ 、 $0.1 \sim 0.3 \text{ mpk}$ 、 $0.3 \sim 0.5 \text{ mpk}$ 、 $0.5 \sim 1 \text{ mpk}$ 、 $1 \sim 2 \text{ mpk}$ 、 $2 \sim 3 \text{ mpk}$ 、 $3 \sim 5 \text{ mpk}$ 、 $5 \sim 10 \text{ mpk}$ の範囲、または 0.1 、 0.2 、 0.3 、 0.5 、 1 、 2 、 3 、 5 、もしくは 10 mpk の有効量で投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、 $2 \sim 4 \text{ mpk}$ 、例えば、 $2.5 \sim 3.5 \text{ mpk}$ の量で投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、約 3 mpk の量で投与される。本明細書で報告されるように、LNP組成物について、投薬量または有効量は、投与される総RNAによって評価される。

【0537】

いくつかの実施形態において、本明細書の組成物による治療の有効性は、送達から1年後、2年後、3年後、4年後、5年後、または10年後にみられる。いくつかの実施形態において、本発明の組成物による治療の有効性は、治療の前後のTTRの血清レベルを測定することによって評価される。いくつかの実施形態において、TTRの血清レベルの低減によって評価される、組成物による治療の有効性は、1週目、2週目、3週目、4週目、2ヶ月目、3ヶ月目、4ヶ月目、5ヶ月目、6ヶ月目、7ヶ月目、8ヶ月目、9ヶ月目、10ヶ月目、または11ヶ月目でみられる。

10

【0538】

いくつかの実施形態において、治療は、疾患の進行を遅らせるか、または止める。

【0539】

いくつかの実施形態において、治療は、FAPの進行を遅らせるか、または止める。いくつかの実施形態において、治療は、感覚運動ニューロパチーまたは自律神経ニューロパチーの症状を改善し、安定化し、または変化を遅らせる。

20

【0540】

いくつかの実施形態において、治療は、FACの症状を改善し、安定化し、または変化を遅らせる。いくつかの実施形態において、治療は、拘束型心筋症またはうっ血性心不全の症状を改善し、安定化し、または変化を遅らせる。

【0541】

いくつかの実施形態において、治療の有効性は、対象の生存時間の増加によって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、治療の許容性の増加によって測定される。いくつかの実施形態において、許容性の増加、例えば、サイトカイン、補体、または他の免疫応答が測定される。

30

【0542】

いくつかの実施形態において、治療の有効性は、感覚運動ニューロパチーまたは自律神経ニューロパチーの症状の改善、またはその進行の遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、身体のある領域を移動させるか、または身体の任意の領域において感じる能力の増加、または低減の遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、嚥下、呼吸、腕、手、脚、または足の使用、または歩行の能力の改善または能力の増加、または低減の遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、神経痛の進行の改善、または遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、神経痛は、疼痛、熱傷、しびれ、または異常な感覚を特徴とする。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、姿勢低血圧、めまい、消化管運動障害、膀胱機能障害、または性機能障害の改善、または増加の遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、脱力の進行の改善または遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、筋電図、神経伝導検査、または患者が報告する転帰を使用して測定される。

40

【0543】

いくつかの実施形態において、治療の有効性は、うっ血性心不全またはCHFの症状の改善または進行の遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、息切れ、呼吸困難、疲労、足首、足、脚、腹部、または首の静脈の腫脹の低減または増加の遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、体内の

50

流体蓄積の改善または進行の遅れによって測定され、体重増加、頻尿、または夜間の咳などの尺度によって評価されてもよい。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、心臓バイオマーカー試験（例えば、B型ナトリウム利尿ペプチド [BNP] またはN末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド [NT-proBNP]）、肺機能検査、胸部x線、または心電図法を使用して測定される。

【0544】

A. 併用療法

いくつかの実施形態において、本発明は、コルチコステロイドと、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上または表2のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAのいずれか1つ（および任意選択でRNAガイドDNA結合剤もしくはRNAガイドDNA結合剤をコードする本明細書に記載の核酸）、例えば、S.pyogenes Cas9をコードする本明細書に記載の核酸（例えば、mRNA）またはベクターを（例えば、本明細書に提供される組成物で）、ATTRの症状を緩和するのに好適な追加の療法とともに投与することを含む併用療法を含む。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

【0545】

いくつかの実施形態において、ATTRのための追加の療法は、感覚運動ニューロパチーまたは自律神経ニューロパチーのための治療である。いくつかの実施形態において、感覚運動ニューロパチーまたは自律神経ニューロパチーのための治療は、非ステロイド性抗炎症薬、抗うつ薬、抗けいれん薬、抗不整脈薬、または麻薬剤である。いくつかの実施形態において、抗うつ薬は、三環系薬剤またはセロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤である。いくつかの実施形態において、抗うつ薬は、アミトリプチリン、デュロキセチン、またはベンラファキシンである。いくつかの実施形態において、抗けいれん薬は、ガバペンチン、プレガバリン、トピラメート、またはカルバマゼピンである。いくつかの実施形態において、感覚運動ニューロパチーのための追加の療法は、経皮的電気神経刺激である。

【0546】

いくつかの実施形態において、ATTRのための追加の療法は、拘束型心筋症またはうっ血性心不全（CHF）のための治療である。いくつかの実施形態において、CHFの治療は、ACE阻害剤、アルドステロンアンタゴニスト、アンジオテンシン受容体遮断薬、ベータ遮断薬、ジゴキシン、利尿薬、またはイソソルビド二硝酸塩/ヒドララジン塩酸塩である。いくつかの実施形態において、ACE阻害剤は、エナラプリル、カプトプリル、ラミプリル、ペリンドプリル、イミダプリル、またはキナプリルである。いくつかの実施形態において、アルドステロンアンタゴニストは、エプレレノンまたはスピロノラクトンである。いくつかの実施形態において、アンジオテンシン受容体遮断薬は、アジルサルタン、カデサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、ロサルタン、オルメサルタン、テルミサルタン、またはバルサルタンである。いくつかの実施形態において、ベータ遮断薬は、アセブトロール、アテノロール、ビソプロロール、メトプロロール、ナドロール、ネビボロール、またはプロプラノロールである。いくつかの実施形態において、利尿薬は、クロロチアジド、クロルタリドン、ヒドロクロロチアジド、インダパミド、メトラゾン、ブメタニド、フロセミド、トルセミド、アミロリド、またはトリアメテレンである。

【0547】

いくつかの実施形態において、併用療法は、コルチコステロイドと、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上または表2のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAのいずれか1つ（および任意選択でRNAガイドDNA結合剤もしくはRNAガイドDNA結合剤をコードする本明細書に記載の核酸）を（例えば、本明細書に提

供される組成物で)、TTRまたは変異体TTRを標的とするsiRNAとともに投与することを含む。いくつかの実施形態において、siRNAは、野生型または変異体TTRの発現をさらに低減するか、またはなくすことができる任意のsiRNAである。いくつかの実施形態において、siRNAは、薬物パチシラン(ALN-TTR02)またはALN-TTRsc02である。いくつかの実施形態において、siRNAは、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上または表2のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAのいずれか1つ(例えば、本明細書で提供される組成物で)の後に投与される。いくつかの実施形態において、siRNAは、本明細書で提供されるgRNA組成物のいずれかで治療した後に、定期的に投与される。

【0548】

いくつかの実施形態において、併用療法は、コルチコステロイドと、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上または表2のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAのいずれか1つ(および任意選択でRNAガイドDNA結合剤もしくはRNAガイドDNA結合剤をコードする本明細書に記載の核酸)を(例えば、本明細書に提供される組成物で)、TTRまたは変異体TTRを標的とするアンチセンスヌクレオチドとともに投与することを含む。いくつかの実施形態において、アンチセンスヌクレオチドは、野生型または変異体TTRの発現をさらに低減するか、またはなくすことができる任意のアンチセンスヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、アンチセンスヌクレオチドは、薬物イノテルセン(IONS-TTR_{Rx})である。いくつかの実施形態において、アンチセンスヌクレオチドは、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上または表2のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAのいずれか1つ、およびRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸(例えば、本明細書に提供される組成物で)の後に投与される。いくつかの実施形態において、アンチセンスヌクレオチドは、本明細書で提供されるgRNA組成物のいずれかで治療した後に、定期的に投与される。

【0549】

いくつかの実施形態において、併用療法は、コルチコステロイドと、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上または表2のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAのいずれか1つ(および任意選択でRNAガイドDNA結合剤もしくはRNAガイドDNA結合剤をコードする本明細書に記載の核酸)を(例えば、本明細書に提供される組成物で)、TTRの正しくフォールディングされた四量体形態の動的安定化を促進する小分子安定剤とともに投与することを含む。いくつかの実施形態において、小分子安定剤は、薬物タファミジス(Vyndaqel(登録商標))またはジフルニサルである。いくつかの実施形態において、小分子安定剤は、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上または表2のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAのいずれか1つ(例えば、本明細書で提供される組成物で)の後に投与される。いくつかの実施形態において、小分子安定剤は、本明細書で提供される組成物のいずれかで治療した後に、定期的に投与される。

【0550】

前述の実施形態のいずれかにおいて、表1に開示されるガイド配列は、配列番号5~72、74~78、および80~82から選択されてもよく、および/または表2のsgRNAは、配列番号87~113、115~120、および122~124から選択されてもよく、および/またはガイドRNAは、化学修飾されたガイドRNAであってもよい。

【0551】

B. 核酸組成物の送達

いくつかの実施形態において、gRNA、および任意選択でRNAとしてRNAガイドDNA結合剤をコードする本明細書に記載の核酸を含むか、または1つ以上のベクター上でコードされる、本明細書に記載の核酸組成物は、脂質ナノ粒子で製剤化されるか、または脂質ナノ粒子を介して投与される。例えば、それらの内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる2017年10月5日に公開されたWO2017/173054A1および2019年4月4日に公開されたWO2019/067992A1を参照のこ

10

20

30

40

50

と。対象にヌクレオチドを送達することが可能な当業者に公知の任意の脂質ナノ粒子（LNP）は、本明細書に記載のガイドRNA、および任意選択でRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸とともに利用され得る。

【0552】

CRISPR/Casカーゴを含む、RNAのためのLNP製剤の様々な実施形態が、本明細書に開示される。かかるLNP製剤は、(i) CCD脂質、例えば、アミン脂質と、(ii) 中性脂質と、(iii) ヘルパー脂質と、(iv) ステルス脂質、例えば、PEG脂質とを含み得る。LNP製剤のいくつかの実施形態は、ヘルパー脂質、中性脂質、およびPEG脂質などのステルス脂質とともに、「アミン脂質」を含む。いくつかの実施形態において、LNP製剤は、1%未満の中性リン脂質を含む。いくつかの実施形態において、LNP製剤は、0.5%未満の中性リン脂質を含む。「脂質ナノ粒子」によって、分子間力によって互いに物理的に結合する複数の（すなわち、1つを超える）脂質分子を含む粒子を意味する。

10

【0553】

CCD脂質

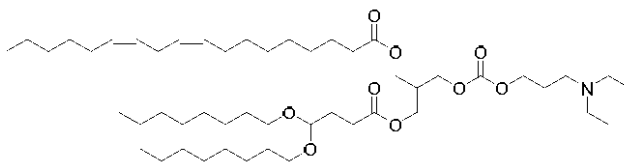
CRISPR/Cas mRNAおよびガイドRNA成分を標的細胞（例えば、肝臓細胞）に送達するための液体組成物は、CCD脂質を含む。

【0554】

いくつかの実施形態において、CCD脂質は、3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピル(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエノアートとも呼ばれる、(9Z,12Z)-3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9,12-ジエノアートである脂質Aである。脂質Aは以下のように描写できる。

20

【化8】



30

【0555】

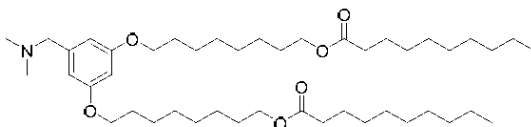
脂質Aは、WO2015/095340（例えば84～86ページ）に従って合成され得る。

【0556】

いくつかの実施形態において、CCD脂質は、((5-((ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(オクタン-8,1-ジイル)ビス(デカノアート)とも呼ばれる、((5-((ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(オクタン-8,1-ジイル)ビス(デカノアート)である脂質Bである。脂質Bは以下のように描写できる。

40

【化9】



【0557】

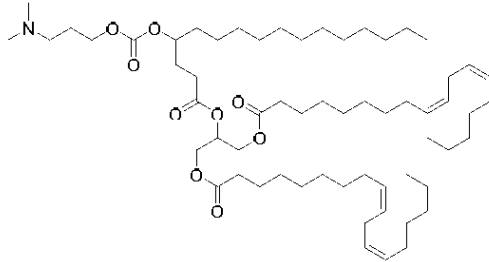
脂質Bは、WO2014/136086（例えば107～09ページ）に従って合成され得る。

50

【0558】

いくつかの実施形態において、CCD脂質は、2-((4-((3-(ジメチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)ヘキサデカノイル)オキシ)プロパン-1,3-ジイル(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-ビス(オクタデカ-9,12-ジエノアート)である脂質Cである。脂質Cは以下のように描写できる。

【化10】



10

【0559】

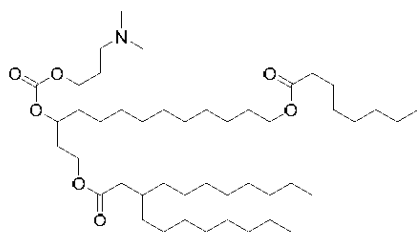
いくつかの実施形態において、CCD脂質は、3-((3-(ジメチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)-13-(オクタノイルオキシ)トリデシル3-オクチルウンデカノアートである脂質Dである。

【0560】

脂質Dは以下のように描写できる。

20

【化11】



【0561】

脂質Cおよび脂質Dは、WO2015/095340に従って合成され得る。

30

【0562】

CCD脂質はまた、脂質A、脂質B、脂質C、または脂質Dに対する等価物であり得る。ある特定の実施形態において、CCD脂質は、脂質Aに対する等価物、脂質Bに対する等価物、脂質Cに対する等価物、または脂質Dに対する等価物である。

【0563】

アミン脂質

いくつかの実施形態において、生理活性薬剤の送達のためのLNP組成物は、「アミン脂質」を含み、アミン脂質は、脂質A、脂質B、脂質C、脂質D、または脂質Aの等価物(脂質Aのアセタール類似体を含む)、脂質Bの等価物、脂質Cの等価物、および脂質Dの等価物として定義される。

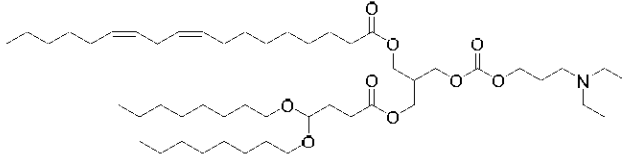
40

【0564】

いくつかの実施形態において、アミン脂質は、3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピル(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエノアートとも呼ばれる、(9Z,12Z)-3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9,12-ジエノアートである脂質Aである。脂質Aは以下のように描写できる。

50

【化 1 2】



【0 5 6 5】

脂質 A は、WO 2 0 1 5 / 0 9 5 3 4 0（例えば 8 4 ～ 8 6 ページ）に従って合成される。特定の実施形態において、アミン脂質は、脂質 A に対する等価物である。

【0 5 6 6】

特定の実施形態において、アミン脂質は、脂質 A の類似体である。特定の実施形態において、脂質 A 類似体は、脂質 A のアセタール類似体である。特定の L N P 組成物において、アセタール類似体は、C 4 ～ C 1 2 アセタール類似体である。いくつかの実施形態において、アセタール類似体は、C 5 ～ C 1 2 アセタール類似体である。追加の実施形態において、アセタール類似体は、C 5 ～ C 1 0 アセタール類似体である。さらなる実施形態において、アセタール類似体は、C 4、C 5、C 6、C 7、C 9、C 1 0、C 1 1、および C 1 2 アセタール類似体から選択される。

【0 5 6 7】

本明細書に記載の L N P における使用に好適なアミン脂質は、インビボで生分解可能であり、生理活性薬剤（例えば、RNA）を細胞に送達するのに適している。アミン脂質は、低い毒性を有する（例えば、1 0 m g / k g 以上の量の RNA カーゴで副作用がない動物モデルにおいて許容される）。特定の実施形態において、アミン脂質を含む L N P は、アミン脂質の少なくとも 7 5 % が、8、1 0、1 2、2 4、もしくは 4 8 時間以内、または 3、4、5、6、7、もしくは 1 0 日以内に血漿から除去されるものを含む。特定の実施形態において、アミン脂質を含む L N P は、mRNA または gRNA の少なくとも 5 0 % が、8、1 0、1 2、2 4、もしくは 4 8 時間以内、または 3、4、5、6、7、もしくは 1 0 日以内に血漿から除去されるものを含む。特定の実施形態において、アミン脂質を含む L N P は、例えば、脂質（例えば、アミン脂質）、RNA（例えば、mRNA）、または別の構成要素を測定することによって、L N P の少なくとも 5 0 % が、8、1 0、1 2、2 4、もしくは 4 8 時間以内、または 3、4、5、6、7、もしくは 1 0 日以内に血漿から除去されるものを含む。特定の実施形態において、L N P の脂質封入されたもの対遊離の脂質、RNA、または核酸成分が測定される。

【0 5 6 8】

脂質クリアランスは、文献に記載されているように測定されてもよい。Maier, M. A., et al. Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. Mol. Ther. 2013, 21 (8), 1570-78（「Maier」）を参照のこと。例えば、Maier において、ルシフェラーゼを標的とする siRNA を含有する L N P - siRNA 系が、6 ～ 8 週齢の雄 C 5 7 B l / 6 マウスに、外側尾静脈を介する静脈内ボーラス注射によって、0.3 m g / k g で投与された。投与後 0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、24、48、96、および 168 時間で、血液、肝臓、および脾臓試料を採取した。組織採取の前にマウスを生理食塩水で灌流させ、血液試料を処理して血漿を得た。すべての試料は、処理され、LC - MS によって分析された。さらに、Maier は、L N P - siRNA 製剤の投与後の毒性を評価するための手順を記載している。例えば、ルシフェラーゼを標的とする siRNA を、雄の Sprague - Dawley ラットに、5 m L / k g の用量体積で単回静脈内ボーラス注射により、0、1、3、5、および 10 m g / k g（5 動物 / 群）で投与した。24 時間後、意識のある動物の頸静脈から約 1 m L の血液が得られ、血清を単離した。投与後 72 時間で、すべての動物

を剖検のために安楽死させた。臨床的徴候、体重、血清化学、臓器重量および組織病理の評価を行った。Maierは、siRNA-LNP製剤を評価するための方法を記載しているが、これらの方法は、本開示のLNP組成物の投与のクリアランス、薬物動態、および毒性の評価に適用され得る。

【0569】

アミン脂質によって、クリアランス速度が増加し得る。いくつかの実施形態において、クリアランス速度は、脂質クリアランス速度であり、例えば、脂質が血液、血清、または血漿から除去される速度である。いくつかの実施形態において、クリアランス速度は、RNAクリアランス速度であり、例えば、mRNAまたはgRNAが血液、血清、または血漿から除去される速度である。いくつかの実施形態において、クリアランス速度は、LNPが血液、血清、または血漿から除去される速度である。いくつかの実施形態において、クリアランス速度は、LNPが肝臓組織または脾臓組織などの組織から除去される速度である。特定の実施形態において、高いクリアランス速度によって、実質的な有害作用のない安全性プロファイルが得られる。アミン脂質は、循環および組織におけるLNP蓄積を減少させ得る。いくつかの実施形態において、循環および組織におけるLNP蓄積の低減によって、実質的な有害作用のない安全性プロファイルが得られる。

【0570】

本開示のアミン脂質は、それらが含まれる媒体のpHに応じて電離していてもよい（例えば、塩を形成してもよい）。例えば、わずかに酸性の媒体において、アミン脂質はプロトン化され、したがって正電荷を帯びていてもよい。逆に、例えば、pHがおよそ7.35である血液などのわずかに塩基性の媒体では、アミン脂質はプロトン化されず、したがって電荷を帯びていない場合がある。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、少なくとも約9のpHでプロトン化されてもよい。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、少なくとも約9のpHでプロトン化されてもよい。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、少なくとも約10のpHでプロトン化されてもよい。

【0571】

アミン脂質の大部分がプロトン化されるpHは、その固有のpKaに関連する。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、それぞれ独立して、約5.1～約7.4の範囲のpKaを有していてもよい。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、それぞれ独立して、約5.5～約6.6の範囲のpKaを有していてもよい。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、それぞれ独立して、約5.6～約6.4の範囲のpKaを有していてもよい。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、それぞれ独立して、約5.8～約6.2の範囲のpKaを有していてもよい。例えば、本開示のアミン脂質は、それぞれ独立して、約5.8～約6.5の範囲のpKaを有してもよい。約5.1～約7.4の範囲のpKaを有する陽イオン性脂質が、インビボで、例えば肝臓にカーゴを送達するのに有効であることがわかっているため、LNPを製剤化する際にアミン脂質のpKaが重要な考慮事項となり得る。さらに、約5.3～約6.4の範囲のpKaを有する陽イオン性脂質が、インビボで、例えば腫瘍に送達するのに有効であることがわかっている。例えば、WO2014/136086を参照のこと。

【0572】

追加の脂質

【0573】

本開示の脂質組成物における使用に好適な「中性脂質」としては、例えば、様々な中性、非荷電性、または双性イオン性の脂質を含む。本開示における使用に好適な中性リン脂質の例は、5-ヘプタデシルベンゼン-1,3-ジオール（レゾルシノール）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ポスホコリン（phosphocholine）（DOPC）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）、ホスファチジルコリン（PLPC）、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン（DAPC）、ホスファチジルエタノー

ルアミン（P E）、卵ホスファチジルコリン（E P C）、ジラウリロイルホスファチジルコリン（D L P C）、ジミリストイルホスファチジルコリン（D M P C）、1－ミリストイル－2－パルミトイルホスファチジルコリン（M P P C）、1－パルミトイル－2－ミリストイルホスファチジルコリン（P M P C）、1－パルミトイル－2－ステアロイルホスファチジルコリン（P S P C）、1，2－ジアラキドイル－s n－グリセロ－3－ホスホコリン（D B P C）、1－ステアロイル－2－パルミトイルホスファチジルコリン（S P P C）、1，2－ジェイコセノイル－s n－グリセロ－3－ホスホコリン（D E P C）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（P O P C）、リソホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（D O P E）、ジリノレオイルホスファチジルコリンジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（D S P E）、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（D M P E）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（D P P E）、パルミトイルロレオイルホスファチジルエタノールアミン（P O P E）、リソホスファチジルエタノールアミン、およびこれらの組み合わせを含むが、これらには限定されない。一実施形態において、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（D S P C）、およびジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（D M P E）からなる群から選択され得る。別の実施形態において、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（D S P C）であり得る。別の実施形態において、中性リン脂質は、ジパルミトイルホスファチジルコリン（D P P C）であり得る。

【0574】

「ヘルパー脂質」には、ステロイド、ステロール、およびアルキルレゾルシノールが含まれる。本開示において使用するのに好適なヘルパー脂質としては、限定されないが、コレステロール、5－ヘプタデシルレゾルシノール、およびヘミコハク酸コレステロールが挙げられる。一実施形態において、ヘルパー脂質は、コレステロールであってもよい。一実施形態において、ヘルパー脂質は、ヘミコハク酸コレステロールであってもよい。

【0575】

「ステルス脂質」は、ナノ粒子がインビボ（例えば、血液中）で存在し得る時間の長さを改変させる脂質である。ステルス脂質は、例えば、粒子凝集を低減し、粒子サイズを制御することによって製剤化プロセスにおいて有用である。本明細書において使用されるステルス脂質は、L N Pの薬物動態特性を調節し得る。本開示の脂質組成物における使用に好適なステルス脂質としては、限定されないが、脂質部分に連結した親水性頭部基を有するステルス脂質が挙げられる。本開示の脂質組成物における使用に好適なステルス脂質およびそのような脂質の生化学に関する情報は、Romberg et al., Pharmaceutical Research, Vol. 25, No. 1, 2008, pg. 55－71、およびHoekstra et al., Biochimica et Biophysica Acta 1660 (2004) 41－52に見出すことができる。追加の好適なP E G脂質は、WO 2006／007712に開示される。

【0576】

一実施形態において、ステルス脂質の親水性頭部基は、P E Gに基づくポリマーから選択されるポリマー部分を含む。ステルス脂質は、脂質部分を含み得る。いくつかの実施形態において、ステルス脂質は、P E G脂質である。P E G脂質は、例えば、粒子凝集を低減し、粒径を制御することによって製剤化プロセスを補助し得る。本明細書において使用されるP E G脂質は、L N Pの薬物動態特性を調節し得る。典型的には、P E G脂質は、脂質部分およびP E Gに基づくポリマー部分を含む。

【0577】

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

【0578】

一実施形態において、P E G脂質は、P E Gに基づくポリマー部分（ポリ（エチレンオ

10

20

30

40

50

キシド）と呼ばれることもある）を含む。

【0579】

PEG脂質は、脂質部分をさらに含む。いくつかの実施形態において、脂質部分は、独立して約C4～約C40の飽和もしくは不飽和炭素原子を含むアルキル鎖長を有するジアルキルグリセロールまたはジアルキルグリカミド基を含むものを含め、ジアシルグリセロールまたはジアシルグリカミドに由来していてもよく、鎖は、1つ以上の官能基（例えば、アミドもしくはエステルなど）を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、アルキル鎖長は、約C10～C20を含む。ジアルキルグリセロールまたはジアルキルグリカミド基は、1つ以上の置換アルキル基をさらに含み得る。鎖長は、対称でも非対称でもよい。

10

【0580】

別に指示されない限り、本明細書において使用される「PEG」という用語は、任意のポリエチレングリコールまたは他のポリアルキレンエーテルポリマーを意味する。一実施形態において、PEGは、任意選択で置換されたエチレングリコールまたはエチレンオキシドの直鎖または分岐鎖のポリマーである。一実施形態において、PEGは非置換である。一実施形態において、PEGは、例えば、1つ以上のアルキル、アルコキシ、アシル、ヒドロキシ、またはアリアル基によって置換されている。一実施形態において、この用語は、PEG-ポリウレタンまたはPEG-ポリプロピレンなどのPEGコポリマーを含む（例えば、J. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (1992)を参照のこと）。別の実施形態において、この用語は、PEGコポリマーを含まない。一実施形態において、PEGは、約130～約50,000、副次的な実施形態において、約150～約30,000、副次的な実施形態において、約150～約20,000、副次的な実施形態において、約150～約15,000、副次的な実施形態において、約150～約10,000、副次的な実施形態において、約150～約6,000、副次的な実施形態において、約150～約5,000、副次的な実施形態において、約150～約4,000、副次的な実施形態において、約150～約3,000、副次的な実施形態において、約300～約3,000、副次的な実施形態において、約1,000～約3,000、副次的な実施形態において、約1,500～約2,500の分子量を有する。

20

30

【0581】

特定の実施形態において、PEG（例えばステルス脂質などの脂質部分または脂質に共役する）は、「PEG-2K」であり、「PEG2000」とも呼ばれ、これは約2,000ダルトンの平均分子量を有する。PEG-2Kは、本明細書において、以下の式（I）によって表され、式中、nは45であり、この数は、数平均重合度が約45サブユニットを含むことを意味する。しかしながら、例えば、数平均重合度が約23サブユニット（n=23）、および／または68サブユニット（n=68）を含む、当該技術分野において公知の他のPEGの実施形態を使用してもよい。いくつかの実施形態において、nは約30～約60の範囲であってよい。いくつかの実施形態において、nは約35～約55の範囲であってよい。いくつかの実施形態において、nは約40～約50の範囲であってよい。いくつかの実施形態において、nは約42～約48の範囲であってよい。いくつかの実施形態において、nは45であってもよい。いくつかの実施形態において、Rは、H、置換アルキル、および非置換アルキルから選択され得る。いくつかの実施形態において、Rは非置換アルキルであってもよい。いくつかの実施形態において、Rはメチルであってもよい。

40

【0582】

本明細書において記載される実施形態のいずれにおいても、PEG脂質は、PEG-ジラウロイルグリセロール、PEG-ジミリストイルグリセロール（PEG-DMG）（NOF、Tokyo、Japanからカタログ番号GM-020）、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステアロイルグリセロール（PEG-DSPG）（カタログ

50

番号DSPE-020CN、NOF、Tokyo、Japan）、PEG-ジラウリルグリカミド、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリカミド、およびPEG-ジステアロイルグリカミド、PEG-コレステロール（1-[8'-（コレスタ-5-エン-3[ベータ]-オキシ）カルボキシアミド-3', 6'-ジオキサオクタニル]カルバモイル-[オメガ]-メチル-ポリ（エチレングリコール）、PEG-DMB（3, 4-ジテトラデコキシルベンジル-[オメガ]-メチル-ポリ（エチレングリコール）エーテル）、1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000]（PEG2k-DMG）、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000]（PEG2k-DSPE）（Avanti Polar Lipids、Alabaster, Alabama, USA製のカタログ番号880120C）、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール（PEG2k-DSG、GS-020、NOF Tokyo、Japan）、ポリ（エチレングリコール）-2000-ジメタクリレート（PEG2k-DMA）、および1, 2-ジステアリルオキシプロピル-3-アミン-N-[メトキシ（ポリエチレングリコール）-2000]（PEG2k-DSA）から選択され得る。一実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DMGであってもよい。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DSGであってもよい。一実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DSPEであってもよい。一実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DMAであってもよい。一実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-C-DMAであってもよい。一実施形態において、PEG脂質は、WO2016/010840（段落[00240]～[00244]）に開示される化合物S027であってもよい。一実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DSAであってもよい。一実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-C11であってもよい。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-C14であってもよい。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-C16であってもよい。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-C18であってもよい。

【0583】

LNP製剤化

LNPは、(i) 封入およびエンドソーム脱出のためのアミン脂質と、(ii) 安定化のための中性脂質と、(iii) これも安定化のためのヘルパー脂質と、(iv) ステルス脂質、例えば、PEG脂質とを含有し得る。中性脂質は、省略されてもよい。

【0584】

いくつかの実施形態において、LNP組成物は、RNAガイドDNA結合剤、CasヌクレアーゼmRNA、クラス2CasヌクレアーゼmRNA、Cas9 mRNA、およびgRNAのうちの1つ以上を含むRNA成分を含み得る。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、RNA成分として、クラス2Casヌクレアーゼ（S. pyogenes Cas9）をコードするmRNAと、gRNAとを含む。特定の実施形態において、LNP組成物は、RNA成分と、アミン脂質と、ヘルパー脂質と、中性脂質と、ステルス脂質とを含み得る。特定のLNP組成物において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。他の組成物において、中性脂質は、DSPCである。追加の実施形態において、ステルス脂質は、PEG2k-DMGまたはPEG2k-C11である。特定の実施形態において、LNP組成物は、脂質Aまたは脂質Aの等価物と、ヘルパー脂質と、中性脂質と、ステルス脂質と、ガイドRNAとを含む。特定の組成物において、アミン脂質は、脂質Aである。特定の組成物において、アミン脂質は、脂質Aまたはそのアセタール類似体であり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、中性脂質はDSPCであり、ステルス脂質はPEG2k-DMGである。

【0585】

特定の実施形態において、脂質組成物は、製剤中の成分の脂質のそれぞれのモル比に従って記載される。本開示の実施形態は、製剤中の成分の脂質のそれぞれのモル比に従って

記載される脂質組成物を提供する。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約30mol%～約60mol%であり得る。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約40mol%～約60mol%であり得る。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約45mol%～約60mol%であり得る。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約50mol%～約60mol%であり得る。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約55mol%～約60mol%であり得る。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約50mol%～約55mol%であり得る。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約50mol%であり得る。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約55mol%であり得る。いくつかの実施形態において、LNPバッチのアミン脂質のmol%は、標的mol%の±30%、±25%、±20%、±15%、±10%、±5%、または±2.5%である。いくつかの実施形態において、LNPバッチのアミン脂質のmol%は、標的mol%の±4mol%、±3mol%、±2mol%、±1.5mol%、±1mol%、±0.5mol%、または±0.25mol%である。すべてのmol%数は、LNP組成物の脂質成分の分率として示される。特定の実施形態において、アミン脂質mol%のLNPのロット間の変動性は、15%未満、10%未満、または5%未満であろう。

【0586】

一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約5mol%～約15mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約7mol%～約12mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約0mol%～約5mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約0mol%～約10mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約5mol%～約10mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約8mol%～約10mol%であり得る。

【0587】

一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約5mol%、約6mol%、約7mol%、約8mol%、約9mol%、約10mol%、約11mol%、約12mol%、約13mol%、約14mol%、または約15mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約9mol%であり得る。

【0588】

一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約1mol%～約5mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質のmol%は、約0.1mol%～約1mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約0.1mol%、約0.2mol%、約0.5mol%、1mol%、約1.5mol%、約2mol%、約2.5mol%、約3mol%、約3.5mol%、約4mol%、約4.5mol%、または約5mol%であり得る。

【0589】

一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約1mol%未満であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約0.5mol%未満であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約0mol%、約0.1mol%、約0.2mol%、約0.3mol%、約0.4mol%、約0.5mol%、約0.6mol%、約0.7mol%、約0.8mol%、約0.9mol%、または約1mol%であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される製剤は、中性脂質を含まない（すなわち、0mol%の中性脂質）。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される製剤は、中性脂質を本質的に含まない（すなわち、約0mol%の中性脂質）。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される製剤は、中性リン脂質を含まない（すなわち、0mol%の中性リン脂質）。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される製剤は、中性リン脂質を本

10

20

30

40

50

質的に含まない（すなわち、約0mol%の中性リン脂質）。

【0590】

いくつかの実施形態において、LNPバッチの中性脂質のmol%は、標的中性脂質のmol%の±30%、±25%、±20%、±15%、±10%、±5%、または±2.5%である。特定の実施形態において、LNPのロット間の変動性は、15%未満、10%未満、または5%未満であろう。

【0591】

一実施形態において、ヘルパー脂質のmol%は、約20mol%～約60mol%であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質のmol%は、約25mol%～約55mol%であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質のmol%は、約25mol%～約50mol%であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質のmol%は、約25mol%～約40mol%であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質のmol%は、約30mol%～約50mol%であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質のmol%は、約30mol%～約40mol%であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質のmol%は、脂質成分を100mol%にするように、アミン脂質、中性脂質、およびPEG脂質の濃度に基づいて調整される。一実施形態において、ヘルパー脂質のmol%は、脂質成分を100mol%にするように、アミン脂質およびPEG脂質の濃度に基づいて調整される。一実施形態において、ヘルパー脂質のmol%は、脂質成分を少なくとも99mol%にするように、アミン脂質およびPEG脂質の濃度に基づいて調整される。いくつかの実施形態において、LNPバッチのヘルパーのmol%は、標的mol%の±30%、±25%、±20%、±15%、±10%、±5%、または±2.5%である。特定の実施形態において、LNPのロット間の変動性は、15%未満、10%未満、または5%未満であろう。

【0592】

一実施形態において、PEG脂質のmol%は、約1mol%～約10mol%であり得る。一実施形態において、PEG脂質のmol%は、約2mol%～約10mol%であり得る。一実施形態において、PEG脂質のmol%は、約2mol%～約8mol%であり得る。一実施形態において、PEG脂質のmol%は、約2mol%～約4mol%であり得る。一実施形態において、PEG脂質のmol%は、約2.5mol%～約4mol%であり得る。一実施形態において、PEG脂質のmol%は、約3mol%であり得る。一実施形態において、PEG脂質のmol%は、約2.5mol%であり得る。いくつかの実施形態において、LNPバッチのPEG脂質のmol%は、標的PEG脂質のmol%の±30%、±25%、±20%、±15%、±10%、±5%、または±2.5%である。特定の実施形態において、LNPのロット間の変動性は、15%未満、10%未満、または5%未満であろう。

【0593】

特定の実施形態において、カーゴは、RNAガイドDNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ、クラス2Casヌクレアーゼ、もしくはCas9）をコードする核酸、およびgRNAもしくはgRNAをコードする核酸、またはmRNAおよびgRNAの組み合わせを含む。一実施形態において、LNP組成物は、脂質Aまたはその等価物を含み得る。いくつかの態様において、アミン脂質は、脂質Aである。いくつかの態様において、アミン脂質は、脂質A等価物、例えば脂質Aの類似体である。ある特定の態様において、アミン脂質は、脂質Aのアセタール類似体である。種々の実施形態において、LNP組成物は、アミン脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、およびPEG脂質を含む。特定の実施形態において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。特定の実施形態において、中性脂質は、DSPCである。特定の実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DMGである。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、脂質A、ヘルパー脂質、中性脂質、およびPEG脂質を含み得る。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、アミン脂質、DSPC、コレステロール、およびPEG脂質を含む。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、DMGを含むPEG脂質を含む。特定の実施形態において、アミン脂質は

、脂質 A、脂質 A のアセタール類似体を含む脂質 A の等価物から選択される。追加の実施形態において、LNP 組成物は、脂質 A と、コレステロールと、DSPC と、PEG 2k-DMG とを含む。

【0594】

種々の実施形態において、LNP 組成物は、アミン脂質と、ヘルパー脂質と、中性脂質と、PEG 脂質とを含む。種々の実施形態において、LNP 組成物は、アミン脂質と、ヘルパー脂質と、中性リン脂質と、PEG 脂質とを含む。種々の実施形態において、LNP 組成物は、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、および PEG 脂質からなる脂質成分を含む。種々の実施形態において、LNP 組成物は、アミン脂質と、ヘルパー脂質と、PEG 脂質とを含む。特定の実施形態において、LNP 組成物は、中性リン脂質などの中性脂質を含まない。種々の実施形態において、LNP 組成物は、アミン脂質、ヘルパー脂質、および PEG 脂質からなる脂質成分を含む。特定の実施形態において、中性脂質は、DSPC、DPPC、DAPC、DMPC、DOPC、DOPE、および DSPE のうちの 1 つ以上から選択される。特定の実施形態において、中性脂質は、DSPC である。特定の実施形態において、中性脂質は、DPPC である。特定の実施形態において、中性脂質は、DAPC である。特定の実施形態において、中性脂質は、DMPC である。特定の実施形態において、中性脂質は、DOPC である。特定の実施形態において、中性脂質は、DOPE である。特定の実施形態において、中性脂質は、DSPE である。特定の実施形態において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかの実施形態において、PEG 脂質は、PEG 2k-DMG である。いくつかの実施形態において、LNP 組成物は、脂質 A と、ヘルパー脂質と、PEG 脂質とを含み得る。いくつかの実施形態において、LNP 組成物は、脂質 A、ヘルパー脂質、および PEG 脂質からなる脂質成分を含み得る。いくつかの実施形態において、LNP 組成物は、アミン脂質と、コレステロールと、PEG 脂質とを含む。いくつかの実施形態において、LNP 組成物は、アミン脂質、コレステロール、および PEG 脂質からなる脂質成分を含む。いくつかの実施形態において、LNP 組成物は、DMG を含む PEG 脂質を含む。特定の実施形態において、アミン脂質は、脂質 A のアセタール類似体を含む、脂質 A および脂質 A の等価物から選択される。特定の実施形態において、アミン脂質は、脂質 A の C5～C12 または C4～C12 アセタール類似体である。追加の実施形態において、LNP 組成物は、脂質 A と、コレステロールと、PEG 2k-DMG とを含む。

【0595】

本開示の実施形態はまた、封入される核酸のアミン脂質の正に帯電したアミン基 (N) と負に帯電したリン酸基 (P) との間のモル比に従って記載される脂質組成物を提供する。これは、式 N/P によって数学的に表されてもよい。いくつかの実施形態において、LNP 組成物は、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、および PEG 脂質を含む脂質成分と、核酸成分とを含んでいてもよく、 N/P 比は、約 3～10 である。いくつかの実施形態において、LNP 組成物は、アミン脂質、ヘルパー脂質、および PEG 脂質を含む脂質成分と、核酸成分とを含んでいてもよく、 N/P 比は、約 3～10 である。いくつかの実施形態において、LNP 組成物は、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、およびヘルパー脂質を含む脂質成分と、RNA 成分とを含んでいてもよく、 N/P 比は、約 3～10 である。いくつかの実施形態において、LNP 組成物は、アミン脂質、ヘルパー脂質、および PEG 脂質を含む脂質成分と、RNA 成分とを含んでいてもよく、 N/P 比は、約 3～10 である。一実施形態において、 N/P 比は、約 5～7 であってもよい。一実施形態において、 N/P 比は、約 3～7 であってもよい。一実施形態において、 N/P 比は、約 4.5～8 であってもよい。一実施形態において、 N/P 比は、約 6 であってもよい。一実施形態において、 N/P 比は、 6 ± 1 であってもよい。一実施形態において、 N/P 比は、 6 ± 0.5 であってもよい。いくつかの実施形態において、 N/P 比は、標的 N/P 比の $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、または $\pm 2.5\%$ である。特定の実施形態において、LNP のロット間の変動性は、15%未満、10%未満、または 5%未満であろう。

【0596】

いくつかの実施形態において、RNA成分は、核酸、例えば、本明細書に開示される核酸、例えば、Casヌクレアーゼをコードする核酸を含み得る。一実施形態において、RNA成分は、Cas9 mRNAを含み得る。Casヌクレアーゼをコードする核酸を含むいくつかの組成物において、LNPは、gRNAなどのgRNA核酸をさらに含む。いくつかの実施形態において、RNA成分は、Casヌクレアーゼ mRNAと、gRNAとを含む。いくつかの実施形態において、RNA成分は、クラス2 Casヌクレアーゼ mRNAと、gRNAとを含む。前述の実施形態のいずれかにおいて、gRNAは、本明細書に記載のsgRNA、例えば、本明細書に記載の化学修飾したsgRNAであり得る。

【0597】

特定の実施形態において、LNP組成物は、本明細書に開示される核酸、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、クラス2 Casヌクレアーゼ）をコードする核酸と、gRNAと、アミン脂質と、ヘルパー脂質と、中性脂質と、PEG脂質とを含み得る。特定のLNP組成物において、ヘルパー脂質は、コレステロールであり、中性脂質は、DSPCであり、かつ／またはPEG脂質は、PEG2k-DMGまたはPEG2k-C11である。特定の組成物において、アミン脂質は、脂質Aおよびその等価物、例えば、脂質Aのアセタール類似体から選択される。一実施形態において、LNP組成物の脂質成分は、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、およびPEG脂質からなる。一実施形態において、LNP組成物の脂質成分は、アミン脂質、ヘルパー脂質、およびPEG脂質からなる。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびgRNAを含む特定の組成物において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびgRNAを含むいくつかの組成物において、中性脂質は、DSPCである。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびgRNAを含む特定の組成物は、約1mol%未満の中性脂質、例えば中性リン脂質を含む。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびgRNAを含む特定の組成物は、約0.5mol%未満の中性脂質、例えば中性リン脂質を含む。特定の組成物において、LNPは、中性脂質、例えば、中性リン脂質を含まない。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびgRNAを含む追加の実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DMGまたはPEG2k-C11である。特定の実施形態において、アミン脂質は、脂質Aおよびその等価物、例えば、脂質Aのアセタール類似体から選択される。

【0598】

一実施形態において、LNP組成物は、sgRNAを含み得る。一実施形態において、LNP組成物は、Cas9 sgRNAを含み得る。一実施形態において、LNP組成物は、Cpf1 sgRNAを含み得る。sgRNAを含むいくつかの組成物において、LNPは、アミン脂質と、ヘルパー脂質と、中性脂質と、PEG脂質とを含む。sgRNAを含む特定の組成物において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。sgRNAを含む他の組成物において、中性脂質は、DSPCである。sgRNAを含む追加の実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DMGまたはPEG2k-C11である。特定の実施形態において、アミン脂質は、脂質Aおよびその等価物、例えば、脂質Aのアセタール類似体から選択される。

【0599】

特定の実施形態において、LNP組成物は、CasヌクレアーゼmRNA（例えば、クラス2 Cas mRNA）と、少なくとも1つのgRNAとを含む。特定の実施形態において、LNP組成物は、gRNAとCasヌクレアーゼmRNA（例えば、クラス2 CasヌクレアーゼmRNA）との比が約25:1～約1:25である。特定の実施形態において、LNP製剤は、gRNAとCasヌクレアーゼmRNA（例えば、クラス2 CasヌクレアーゼmRNA）との比が約10:1～約1:10である。特定の実施形態において、LNP製剤は、gRNAとCasヌクレアーゼmRNA（例えば、クラス2 CasヌクレアーゼmRNA）との比が約8:1～約1:8である。本明細書で測定される場合、比は、重量基準である。いくつかの実施形態において、LNP製剤は、gRNAとCas

10

20

30

40

50

ヌクレアーゼmRNA（例えば、クラス2Cas mRNA）との比が約5：1～約1：5である。いくつかの実施形態において、比の範囲は、約3：1～1：3、約2：1～1：2、約5：1～1：2、約5：1～1：1、約3：1～1：2、約3：1～1：1、約3：1、約2：1～1：1である。いくつかの実施形態において、gRNAとmRNAとの比は、約3：1または約2：1である。いくつかの実施形態において、gRNAとCasヌクレアーゼmRNA（例えば、クラス2Casヌクレアーゼ）との比は、約1：1である。比は、約25：1、10：1、5：1、3：1、1：1、1：3、1：5、1：10、または1：25であり得る。

【0600】

いくつかの実施形態において、LNPは、RNA水溶液と有機溶媒系脂質溶液（例えば、100%エタノール）とを混合することによって形成される。好適な溶液または溶媒は、水、PBS、Tris緩衝液、NaCl、クエン酸緩衝液、エタノール、クロロホルム、ジエチルエーテル、シクロヘキサン、テトラヒドロフラン、メタノール、イソプロパノールを含むか、またはそれらを含んでもよい。例えば、LNPのインビボ投与のための薬学的に許容される緩衝液を使用してもよい。特定の実施形態において、緩衝液は、LNPを含む組成物のpHをpH6.5以上に維持するために使用される。特定の実施形態において、緩衝液は、LNPを含む組成物のpHをpH7.0以上に維持するために使用される。特定の実施形態において、本組成物は、約7.2～約7.7の範囲のpHを有する。追加の実施形態において、本組成物は、約7.3～約7.7の範囲、または約7.4～約7.6の範囲のpHを有する。さらなる実施形態において、本組成物は、約7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、または7.7のpHを有する。組成物のpHは、マイクロpHプローブで測定されてもよい。特定の実施形態において、凍結保護剤が組成物に含まれる。凍結保護剤の非限定的な例としては、スクロース、トレハロース、グリセロール、DMSO、およびエチレングリコールが挙げられる。例示的な組成物は、例えばスクロースなどの凍結保護剤を最大10%含んでもよい。特定の実施形態において、LNP組成物は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10%の凍結保護剤を含んでもよい。特定の実施形態において、LNP組成物は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10%のスクロースを含んでもよい。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、緩衝液を含んでもよい。いくつかの実施形態において、緩衝液は、リン酸緩衝液（PBS）、Tris緩衝液、クエン酸緩衝液、およびそれらの混合物を含んでもよい。特定の実施形態において、緩衝液は、NaClを含む。特定の実施形態において、NaClは、省かれる。NaClの例示的な量は、約20mM～約45mMの範囲であってもよい。NaClの例示的な量は、約40mM～約50mMの範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、NaClの量は、約45mMである。いくつかの実施形態において、緩衝液は、Tris緩衝液である。Trisの例示的な量は、約20mM～約60mMの範囲であってもよい。Trisの例示的な量は、約40mM～約60mMの範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、Trisの量は、約50mMである。いくつかの実施形態において、緩衝液は、NaClおよびTrisを含む。LNP組成物のある特定の例示的な実施形態は、Tris緩衝液中に5%のスクロースおよび45mMのNaClを含有する。他の例示的な実施形態において、組成物は、約5%w/vの量のスクロース、約45mMのNaCl、および約50mMのTrisをpH7.5で含有する。塩、緩衝液、および凍結保護剤の量は、製剤全体の浸透圧が維持されるように変化させてもよい。例えば、最終浸透圧は、450mOsm/L未満に維持されてもよい。さらなる実施形態において、浸透圧は、350～250mOsm/Lである。ある特定の実施形態は、300±20mOsm/Lの最終浸透圧を有する。

【0601】

いくつかの実施形態において、マイクロ流体混合、T混合、または交差混合が使用される。特定の態様において、流速、接合部のサイズ、接合部の幾何形状、接合部の形状、管の直径、溶液、および／またはRNAおよび脂質の濃度を変化させてもよい。LNPまたはLNP組成物は、例えば、透析、タンジェンシャルフロー濾過、またはクロマトグラフ

10

20

30

40

50

イーを介して濃縮または精製してもよい。LNPは、例えば、懸濁液、エマルション、または凍結乾燥粉末として保存してもよい。いくつかの実施形態において、LNP組成物は2～8℃で保存され、ある特定の態様において、LNP組成物は室温で保存される。追加の実施形態において、LNP組成物は、例えば－20℃または－80℃で冷凍保存される。他の実施形態において、LNP組成物は、約0℃～約－80℃の範囲の温度で保存される。凍結LNP組成物は、使用前に、例えば氷上で、室温で、または25℃で解凍してもよい。

【0602】

LNPは、例えば、ミクロスフェア（単層および多層の小胞、例えば、いくつかの実施形態において、実質的に球形であり、より特定の実施形態において、水性コアを含み得る「リポソーム」ラメラ相脂質二重層を含み、例えば、RNA分子の実質的な部分を含む）、エマルション中の分散相、ミセル、または懸濁液中の内相であってよい。

【0603】

さらに、LNP組成物は、治療上有効な用量でインビボにおいて細胞毒性レベルまで蓄積しないという点で生分解性である。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、治療用量レベルで実質的な有害作用をもたらす自然免疫応答を引き起こさない。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるLNP組成物は、治療用量レベルで毒性を引き起こさない。

【0604】

いくつかの実施形態において、pdiは、約0.005～約0.75の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0.01～約0.5の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0～約0.4の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0～約0.35の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0～約0.35の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0～約0.3の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0～約0.25の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0～約0.2の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0.08、0.1、0.15、0.2、または0.4未満であってもよい。

【0605】

本明細書に開示されるLNPは、サイズ（例えば、Z平均直径）が約1～約250nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約10～約200nmである。さらなる実施形態において、LNPは、サイズが約20～約150nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約50～約150nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約50～約100nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約50～約120nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約60～約100nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約75～約150nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約75～約120nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約75～約100nmである。別に指示されない限り、本明細書で言及されるすべてのサイズは、Malvern Zetasizerでの動的光散乱によって測定されるような、完全に形成されたナノ粒子の平均サイズ（直径）である。ナノ粒子試料は、カウント数がおおよそ200～400kcpとなるように、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で希釈される。データは、強度測定値の加重平均（Z平均直径）として提示される。

【0606】

いくつかの実施形態において、LNPは、約50%～約100%の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約50%～約70%の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約70%～約90%の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約90%～約100%の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNP

10

20

30

40

50

は、約75%～約95%の範囲の平均封入効率で形成される。

【0607】

いくつかの実施形態において、LNPは、約 $1.00 \times 10^5 \text{ g/mol}$ ～約 $1.00 \times 10^6 \text{ g/mol}$ の範囲の平均分子量で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約 $5.00 \times 10^5 \text{ g/mol}$ ～約 $7.00 \times 10^7 \text{ g/mol}$ の範囲の平均分子量で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約 $1.00 \times 10^6 \text{ g/mol}$ ～約 $1.00 \times 10^7 \text{ g/mol}$ の範囲の平均分子量で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約 $1.00 \times 10^7 \text{ g/mol}$ ～約 $1.00 \times 10^9 \text{ g/mol}$ の範囲の平均分子量で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約 $5.00 \times 10^6 \text{ g/mol}$ ～約 $5.00 \times 10^9 \text{ g/mol}$ の範囲の平均分子量で形成される。

10

【0608】

いくつかの実施形態において、多分散性 (M_w/M_n 、重量平均モル質量 (M_w) 対数平均モル質量 (M_n) の比) は、約1.000～約2.000の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 M_w/M_n は、約1.00～約1.500の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 M_w/M_n は、約1.020～約1.400の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 M_w/M_n は、約1.010～約1.100の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 M_w/M_n は、約1.100～約1.350の範囲であってもよい。

【0609】

本開示のLNPの多分散指数 (「 pdi 」) およびサイズを特性決定するために、動的光散乱 (「DLS」) を使用することができる。DLSは、試料を光源に供した結果として生じる光の散乱を測定する。DLS測定から決定されたPDIは、集合体内の粒径 (平均粒径付近) の分布を表し、完全に均一な集合体のPDIはゼロである。いくつかの実施形態において、 pdi は、0.005～0.75の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 pdi は、0.01～0.5の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 pdi は、0.02～0.4の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 pdi は、0.03～0.35の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 pdi は、0.1～0.35の範囲であってもよい。

20

【0610】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるLNPは、サイズが1～250 nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが10～200 nmである。さらなる実施形態において、LNPは、サイズが20～150 nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが50～150 nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが50～100 nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが50～120 nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが75～150 nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが30～200 nmである。別に指示されない限り、本明細書で言及されるすべてのサイズは、Malvern Zetasizerでの動的光散乱によって測定されるような、完全に形成されたナノ粒子の平均サイズ (直径) である。ナノ粒子試料は、カウント数がおよそ200～400 kctとなるように、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈される。データは、強度測定値の加重平均として提示される。いくつかの実施形態において、LNPは、50%～100%の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、50%～70%の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、70%～90%の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、90%～100%の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、75%～95%の範囲の平均封入効率で形成される。

30

40

【0611】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるgRNAと会合するLNPは、ATTRを治療するための医薬の調製において使用するものである。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるgRNAと会合するLNPは、ATTRを有する対

50

象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積および凝集を低減もしくは予防するための医薬の調製において使用するためのものである。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるgRNAと会合するLNPは、血清TTR濃度を低減するための医薬の調製において使用するためのものである。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるgRNAと会合するLNPは、対象、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトなどの霊長類においてATTRを治療する際に使用するためのものである。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるgRNAと会合するLNPは、ATTRを有する対象、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトなどの霊長類においてアミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積および凝集を低減もしくは予防する際に使用するためのものである。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるgRNAと会合するLNPは、対象、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトなどの霊長類において血清TTR濃度を低減する際に使用するためのものである。前述の実施形態のいずれかにおいて、LNPは、本明細書に開示されるgRNA、および本明細書に開示されるRNAガイドDNA結合剤（例えば、Cas9、SpyCas9）をコードする核酸（例えば、mRNA）と会合し得る。

10

【0612】

エレクトロポレーションも、カーゴの送達のための周知の手段であり、本明細書に開示されるgRNAのうちのいずれか1つの送達のために、任意のエレクトロポレーション方法論が使用され得る。いくつかの実施形態において、エレクトロポレーションを使用して、本明細書に開示されるgRNA、および任意選択でCas9などのRNAガイドDNAヌクレアーゼまたはCas9などのRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸のうちのいずれか1つを送達し得る。

20

【0613】

いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書に開示されるgRNAのうちのいずれか1つをエキスポで細胞に送達する方法であって、gRNAが、LNPと会合するか、またはLNPと会合しない、方法を含む。いくつかの実施形態において、gRNA/LNPまたはgRNAはまた、任意選択で、Cas9などのRNAガイドDNAヌクレアーゼ、またはRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸、例えば、本明細書に開示されるRNAガイドDNA結合剤（例えば、Cas9、SpyCas9）をコードする核酸（例えば、mRNA）とも会合する。

30

【0614】

特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上を含むガイドRNAのいずれかをコードするDNAまたはRNAベクターを含む。いくつかの実施形態において、ガイドRNA配列に加えて、ベクターは、ガイドRNAをコードしない核酸をさらに含む。ガイドRNAをコードしない核酸としては、限定されないが、プロモーター、エンハンサー、制御配列、および任意選択でRNAガイドDNAヌクレアーゼ（Cas9などのヌクレアーゼであってもよい）をコードする本明細書に記載の核酸が挙げられる。いくつかの実施形態において、ベクターは、crRNA、trRNA、またはcrRNAおよびtrRNAをコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ベクターは、sgRNAをコードする1つ以上のヌクレオチド配列、および任意選択でRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする本明細書に記載の核酸を含み、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、Casヌクレアーゼ、例えば、Cas9またはCpf1であってもよい。いくつかの実施形態において、ベクターは、crRNA、trRNAをコードする1つ以上のヌクレオチド配列、および任意選択でRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする本明細書に記載の核酸を含み、RNAガイドDNAヌクレアーゼは、Casタンパク質、例えば、Cas9であってもよい。一実施形態において、Cas9は、Streptococcus pyogenes由来である（すなわち、SpyCas9）。いくつかの実施形態において、crRNA、trRNA、またはcrRNAおよびtrRNA（sgRNAであってもよい）をコードするヌクレオチド配列は、天然に存在するCRISPR/Cas系由来の反復配列のすべてまたは

40

50

一部が隣接するガイド配列を含むか、またはそれらからなる。c r R N A、t r R N A、またはc r R N Aおよびt r R N Aを含むか、またはそれらからなる核酸は、さらにベクター配列を含んでいてもよく、ここで、ベクター配列は、自然状態ではc r R N A、t r R N A、またはc r R N Aおよびt r R N Aとともに見出されない核酸配列を含むか、またはそれらからなる。

【0615】

いくつかの実施形態において、c r R N Aおよびt r R N Aは、1つのベクター内の非連続核酸によってコードされる。他の実施形態において、c r R N Aおよびt r R N Aは、連続核酸によってコードされ得る。いくつかの実施形態において、c r R N Aおよびt r R N Aは、単一の核酸の反対側の鎖によってコードされる。他の実施形態において、c r R N Aおよびt r R N Aは、単一の核酸の同一の鎖によってコードされる。

10

【0616】

いくつかの実施形態において、ベクターは、環状であってもよい。他の実施形態において、ベクターは直線状であってもよい。いくつかの実施形態において、ベクターは、脂質ナノ粒子、リボソーム、非脂質ナノ粒子、またはウイルスカプシド内に封入され得る。非限定的な例示的なベクターは、プラスミド、ファージミド、コスミド、人工染色体、染色体、ミニ染色体、トランスポゾン、ウイルスベクター、および発現ベクターを含む。

【0617】

いくつかの実施形態において、ベクターは、ウイルスベクターであってもよい。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、その野生型の対応物から遺伝子組換えされていてもよい。例えば、ウイルスベクターは、クローニングを促進するため、またはベクターの1つ以上の特性を変更するようにするため、挿入、欠失、または1つ以上のヌクレオチドの置換を含み得る。このような特性は、パッケージング能力、形質導入効率、免疫原性、ゲノム組み込み、複製、転写、および翻訳を含み得る。いくつかの実施形態において、ウイルスゲノムの一部分は、より大きいサイズを有する外来性配列をパッケージングすることができるように、削除され得る。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、増強した形質導入効率を有し得る。いくつかの実施形態において、宿主におけるウイルスによって誘発される免疫応答は低減され得る。いくつかの実施形態において、宿主ゲノムへのウイルス配列の組み込みを促進するウイルス遺伝子（例えば、インテグラーゼ等）は、ウイルスを非組み込み性になるようにするために変異され得る。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは複製欠損であってもよい。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、ベクター上のコード配列の発現を駆動する外来性の転写または翻訳の制御配列を含み得る。いくつかの実施形態において、ウイルスはヘルパー依存性であってもよい。例えば、増幅しベクターをウイルス粒子にパッケージングするのに必要とされるウイルスの構成要素（例えばウイルスタンパク質）を供給するための1つ以上のヘルパーウイルスを必要とし得る。このような場合、ウイルス構成要素をコードする1つ以上のベクターを含む1つ以上のヘルパー構成要素は、本明細書において記載されるベクター系とともに宿主細胞に導入され得る。他の実施形態において、ウイルスはヘルパーフリーであってもよい。例えば、ウイルスは、一切のヘルパーウイルスなしで増幅し、ベクターをパッケージングすることが可能であってもよい。いくつかの実施形態において、本明細書において記載されるベクター系は、ウイルス増幅およびパッケージングに必要なウイルスの構成要素をもコードすることもできる。

20

30

40

【0618】

非限定的な例示的なウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ヘルパー依存性アデノウイルスベクター（H D A d）、単純ヘルペスウイルス（H S V - 1）ベクター、バクテリオファージT 4、バキュロウイルスベクター、およびレトロウイルスベクターを含む。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、A A Vベクターであってもよい。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、A A V 2、A A V 3、A A V 3 B、A A V 5、A A V 6、A A V 6 . 2、A A V 7、A A V r h . 6 4 R 1、A A V h u . 3 7、A A V r h .

50

8、AAVrh.32.33、AAV8、AAV9、AAVrh10、またはAAVLK03である。他の実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターであってもよい。

【0619】

いくつかの実施形態において、レンチウイルスは非組み込み性であってもよい。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターであってもよい。いくつかの実施形態において、アデノウイルスは、すべてのコードウイルス領域が、5'および3'の末端逆位配列(ITR)から離れており、パッケージングシグナル(「I」)がウイルスから削除されてそのパッケージング能力が増加している、高クロニング能、または「ガットレス」アデノウイルスであってもよい。さらに他の実施形態において、ウイルスベクターは、HSV-1ベクターであってもよい。いくつかの実施形態において、HSV-1に基づいたベクターは、ヘルパー依存性であり、他の実施形態において、それはベクター依存性ではない。例えば、パッケージング配列のみを保持するアンプリコンベクターは、パッケージングのために構造的な構成要素を有するヘルパーウイルスを必要とし、一方で、非必須のウイルス機能を除去した30kb欠失HSV-1は、ヘルパーウイルスを必要としない。追加の実施形態において、ウイルスベクターは、バクテリオファージT4であってもよい。いくつかの実施形態において、バクテリオファージT4は、ウイルスの頭部が空であるとき、任意の直線状または環状DNAまたはRNA分子をパッケージングすることができる。さらなる実施形態において、ウイルスベクターは、バキュロウイルスベクターであってもよい。なおもさらなる実施形態において、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターであってもよい。より小さいクロニング能力を有するAAVまたはレンチウイルスベクターを使用する実施形態において、本明細書において開示されるようなベクター系のすべての構成要素を送達するために1つを超えるベクターを使用する必要がある可能性がある。例えば、1つのAAVベクターは、CasヌクレアーゼなどのRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする配列を含有していてもよく、一方、第2のAAVベクターは、1つ以上のガイド配列を含有していてもよい。

【0620】

いくつかの実施形態において、ベクターは、細胞内において1つ以上のコード配列の発現を駆動することができる。いくつかの実施形態において、細胞は、例えば細菌細胞などの原核生物細胞であってもよい。いくつかの実施形態において、細胞は、例えば酵母、植物、昆虫、または哺乳動物細胞などの真核生物細胞であってもよい。いくつかの実施形態において、真核生物細胞は、哺乳動物細胞であってもよい。いくつかの実施形態において、真核生物細胞は、げっ歯類細胞であってもよい。いくつかの実施形態において、真核生物細胞は、ヒト細胞であってもよい。異なる種類の細胞における発現を駆動するための好適なプロモーターは、当該技術分野において公知である。いくつかの実施形態において、プロモーターは野生型であってもよい。他の実施形態において、プロモーターは、より効率的または効果的な発現のために修飾されていてもよい。さらに他の実施形態において、プロモーターは短縮されているが、なおもその機能を維持していてもよい。例えば、プロモーターは、ウイルスへのベクターの適切なパッケージングのために、通常の細部または低減されたサイズを有し得る。

【0621】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、構成的、誘導性、または組織特異的であってもよい。いくつかの実施形態において、プロモーターは、構成的プロモーターであってもよい。非限定的な例示的な構成的プロモーターは、サイトメガロウイルス最初期プロモーター(CMV)、シミアンウイルス(SV40)プロモーター、アデノウイルス主要後期(MLP)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーター、ホスホグリゼリン酸キナーゼ(PGK)プロモーター、伸長因子α(EF1a)プロモーター、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、チューブリンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、それらの機能性フラグメント、または先行するいずれかの組み合わせを含む。いくつかの実施形態におい

10

20

30

40

50

て、プロモーターは、CMVプロモーターであってもよい。いくつかの実施形態において、プロモーターは、短縮型CMVプロモーターであってもよい。他の実施形態において、プロモーターは、EF1aプロモーターであってもよい。いくつかの実施形態において、プロモーターは、誘導性プロモーターであってもよい。非限定的な例示的な誘導性プロモーターは、熱ショック、光、化学物質、ペプチド、金属、ステロイド、抗生物質、またはアルコールによって誘導可能なものを含む。いくつかの実施形態において、誘導性プロモーターは、Tet-On（登録商標）プロモーター（Clontech）などの、低い基底（非誘導）発現レベルを有するものであってよい。

【0622】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、組織特異的プロモーター、例えば、肝臓での発現に特異的なプロモーターであってもよい。

【0623】

ベクターは、本明細書において記載されるガイドRNAをコードするヌクレオチド配列をさらに含み得る。いくつかの実施形態において、ベクターは、ガイドRNAの1つのコピーを含む。他の実施形態において、ベクターは、ガイドRNAの1つより多いコピーを含む。1つより多いガイドRNAを有する実施形態において、ガイドRNAは、それらが非同一であり、異なる標的配列を標的化するようであってもよく、それらが同一の標的配列を標的化する点において同一であってもよい。ベクターが1つより多いガイドRNAを含むいくつかの実施形態において、各ガイドRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼとの複合体（例えば、Cas RNP複合体）内の活性または安定性などの他の異なる特性を有していてもよい。いくつかの実施形態において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、プロモーター、3' UTR、または5' UTRなどの少なくとも1つの転写または翻訳の制御配列に作動可能に連結されていてもよい。一実施形態において、プロモーターは、tRNAプロモーター、例えばtRNA^{Lys}³、またはtRNAキメラであってもよい。Mefferd et al., RNA. 2015 21:1683-9、Scherer et al., Nucleic Acids Res. 2007 35:2620-2628を参照のこと。いくつかの実施形態において、プロモーターは、RNAポリメラーゼIII（PolIII）によって認識され得る。PolIIIプロモーターの非限定的な例は、U6およびH1プロモーターを含む。いくつかの実施形態において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、マウスまたはヒトのU6プロモーターに作動可能に連結され得る。他の実施形態において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、マウスまたはヒトのH1プロモーターへと作動可能に連結され得る。1つより多いガイドRNAを有する実施形態において、発現を駆動するために使用されるプロモーターは、同一または異なってもよい。いくつかの実施形態において、ガイドRNAのcrRNAをコードするヌクレオチドおよびガイドRNAのtrRNAをコードするヌクレオチドは、同一のベクター上に提供され得る。いくつかの実施形態において、crRNAをコードするヌクレオチドおよびtrRNAをコードするヌクレオチドは、同一のプロモーターによって駆動され得る。いくつかの実施形態において、crRNAおよびtrRNAは単一の転写産物へと転写され得る。例えば、crRNAおよびtrRNAは、二重分子ガイドRNAを形成するように単一の転写産物から加工され得る。あるいは、crRNAおよびtrRNAは、単一分子ガイドRNA（sgRNA）へと転写され得る。他の実施形態において、crRNAおよびtrRNAは、同一のベクター上のそれらの対応するプロモーターによって駆動され得る。さらに他の実施形態において、crRNAおよびtrRNAは、異なるベクターによってコードされ得る。

【0624】

いくつかの実施形態において、ベクターは、任意選択で、本明細書において記載されるヌクレアーゼなどのRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含み得る。いくつかの実施形態において、ベクターによってコードされるヌクレアーゼは、Casタンパク質であってもよい。いくつかの実施形態において、ベクター系は、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の1つのコピーを含み得る。他の実施形態にお

10

20

30

40

50

いて、ベクター系は、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の1つを超えるコピーを含み得る。いくつかの実施形態において、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、少なくとも1つの転写または翻訳の制御配列へと作動可能に連結されていてもよい。いくつかの実施形態において、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、少なくとも1つプロモーターへと作動可能に連結されていてもよい。

【0625】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、CasヌクレアーゼなどのRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含む同一のベクター上に配置され得る。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびCasタンパク質などのRNAガイドDNAヌクレアーゼの発現は、それら自身の対応するプロモーターによって駆動され得る。いくつかの実施形態において、ガイドRNAの発現は、Casタンパク質などのRNAガイドDNAヌクレアーゼの発現を駆動する同一のプロモーターによって駆動され得る。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびCasタンパク質などのRNAガイドDNAヌクレアーゼの転写産物は、単一の転写産物内に含まれてもよい。例えば、ガイドRNAは、Casタンパク質などのRNAガイドDNAヌクレアーゼの転写産物の非翻訳領域(UTR)内にあってもよい。いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、転写産物の5'UTR内にあってもよい。他の実施形態において、ガイドRNAは、転写産物の3'UTR内にあってもよい。いくつかの実施形態において、転写産物の細胞内半減期は、その3'UTR内にガイドRNAを含み、それによって3'UTRの長さを短縮することによって低減することができる。追加の実施形態において、ガイドRNAは、転写産物のイントロン内にあってもよい。いくつかの実施形態において、ガイドRNAが転写産物から適切にスプライシングされるように、ガイドRNAが内部に位置するイントロンにおいて、好適なスプライス部位が追加され得る。いくつかの実施形態において、一時的に非常に近接した同じベクターからのCasタンパク質などのRNAガイドDNAヌクレアーゼおよびガイドRNAの発現は、CRISPR RNP複合体のより効率的な形成を促進し得る。

【0626】

いくつかの実施形態において、組成物は、ベクター系を含む。いくつかの実施形態において、ベクター系は、1つの単一のベクターを含み得る。他の実施形態において、ベクター系は、2つのベクターを含み得る。追加の実施形態において、ベクター系は3つのベクターを含み得る。異なるガイドRNAが多重化のために使用されるとき、またはガイドRNAの複数のコピーが使用されるとき、ベクター系は、3つを超えるベクターを含み得る。

【0627】

いくつかの実施形態において、ベクター系は、それが標的細胞に送達した後にのみ発現を開始するために、誘導性プロモーターを含み得る。非限定的な例示的な誘導性プロモーターは、熱ショック、光、化学物質、ペプチド、金属、ステロイド、抗生物質、またはアルコールによって誘導可能なものを含む。いくつかの実施形態において、誘導性プロモーターは、Tet-On(登録商標)プロモーター(Clontech)などの、低い基底(非誘導)発現レベルを有するものであってよい。

【0628】

追加の実施形態において、ベクター系は、それが特異的な組織に送達した後にのみ発現を開始するために、組織特異的プロモーターを含み得る。

【0629】

ベクターは、リボソーム、ナノ粒子、エキソソーム、または微小胞によって送達され得る。ベクターはまた、脂質ナノ粒子(LNP)によって送達されてもよい。例えば、それらの内容がそれぞれ参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、2017年10月5日に公開され、「LIPID NANOPARTICLE FORMULATIONS FOR CRISPR/CAS COMPONENTS」という名称のWO2017/173054、および2019年4月4日に公開され、「FORMULATIONS」という名称のWO2019067992A1を参照されたい。本明細書に記載されるLNPおよ

10

20

30

40

50

びLNP製剤のうちのいずれも、ガイドを単独で、またはcasヌクレアーゼまたはcasヌクレアーゼをコードする核酸とともに送達するのに好適である。いくつかの実施形態において、RNA成分と脂質成分とを含み、脂質成分が、アミン脂質と、中性脂質と、ヘルパー脂質と、ステルス脂質とを含み、N/P比が約1~10である、LNP組成物が含まれる。

【0630】

場合によっては、脂質成分は、脂質Aまたはそのアセタール類似体と、コレステロールと、DSPCと、PEG-DMGとを含み、N/P比は、約1~10である。いくつかの実施形態において、脂質成分は、約40~60mol%のアミン脂質と、約5~15mol%の中性脂質と、約1.5~10mol%のPEG脂質とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約3~10である。いくつかの実施形態において、脂質成分は、約50~60mol%のアミン脂質と、約8~10mol%の中性脂質と、約2.5~4mol%のPEG脂質とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約3~8である。場合によっては、脂質成分は、約50~60mol%のアミン脂質と、約5~15mol%のDSPCと、約2.5~4mol%のPEG脂質とを含み、脂質成分の残りが、コレステロールであり、LNP組成物のN/P比が、約3~8である。場合によっては、脂質成分は、48~53mol%の脂質Aと、約8~10mol%のDSPCと、約1.5~10mol%のPEG脂質とを含み、脂質成分の残りが、コレステロールであり、LNP組成物のN/P比が、3~8±0.2である。

【0631】

いくつかの実施形態において、LNPは、脂質成分を含み、脂質成分は、約50mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約9mol%のDSPCなどの中性脂質と、約3mol%のPEG脂質などのステルス脂質（例えば、PEG2k-DMG）とを含むか、これらから本質的になるか、またはこれらからなり、脂質成分の残りが、コレステロールなどのヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約6である。いくつかの実施形態において、アミン脂質は、脂質Aである。いくつかの実施形態において、中性脂質は、DSPCである。いくつかの実施形態において、ステルス脂質は、PEG脂質である。いくつかの実施形態において、ステルス脂質は、PEG2k-DMGである。いくつかの実施形態において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかの実施形態において、LNPは、脂質成分を含み、脂質成分は、約50mol%の脂質Aと、約9mol%のDSPCと、約3mol%のPEG2k-DMGとを含み、脂質成分の残りが、コレステロールであり、LNP組成物のN/P比が、約6である。

【0632】

いくつかの実施形態において、ベクターは、全身的に送達され得る。いくつかの実施形態において、ベクターは、肝循環に送達され得る。

【0633】

この説明および例示的な実施形態は、限定として解釈されるべきではない。本明細書および添付の特許請求の範囲において、特に明記しない限り、本明細書および特許請求の範囲で使用される量、パーセンテージ、または割合、および他の数値を表すすべての数字は、どの場合においても用語「約」によって、まだそれほど非修飾である範囲により修飾されていると理解されるべきである。したがって、そうでないことが示されない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲に示される数値パラメータは、得ようとする所望の特性に応じて変化し得る近似値である。非常に少なくとも、および均等論の適用の特許請求の範囲に限定する試みとしてではなく、各数値パラメータは、報告された有効数字の数を考慮して、通常の丸め手法を適用することにより、少なくとも解釈されるべきである。

【0634】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「a」、「an」、および「the」、および任意の単語の単数形の使用は、明示的かつ明確に1つの指示対象に限定されない限り、複数の指示対象を含めることに留意されたい。本明細書で使用さ

れる「含める (include)」という用語およびその文法上の変形は、リスト内のアイテムの列挙が、リストされたアイテムに置換または追加できる他の同様のアイテムを除外しないように、非限定的であることを意図している。

【実施例】

【0635】

以下の実施例は、ある特定の開示された実施形態を例示するために提供され、本開示の範囲を決して限定するものとして解釈されるべきではない。

【0636】

実施例1. 材料および方法

ヌクレアーゼmRNAのインビトロ転写 (「IVT」)

N1-メチルプソイド-Uを含有するキャップされたポリアデニル化 *Streptococcus pyogenes* (「Spy」) Cas9 mRNAを、線状プラスミドDNAテンプレートおよびT7 RNAポリメラーゼを用いたインビトロ転写によって生成した。T7プロモーター、配列番号1、2、もしくは本明細書に開示される別の配列の転写のための配列、および90~100 ntポリ(A/T)領域を含有するプラスミドDNAを、200 ng/μLのプラスミド、2 U/μLのXbaI (NEB)、および1 x 反応緩衝液の条件で、XbaIとともに37°Cで2時間インキュベートすることによって線状化した。XbaIを、反応物を65°Cで20分間加熱することによって不活性化した。線状プラスミドを、酵素および緩衝塩から精製した。Cas9修飾mRNAを生成するためのIVT反応を、以下の条件下、37°Cで1.5~4時間インキュベートすることによって行った。50 ng/μLの線状プラスミド、GTP、ATP、CTP、およびN1-メチルシュードUTP (Trilink) の各々、2~5 mM、10~25 mMのARCA (Trilink)、5 U/μLのT7 RNAポリメラーゼ (NEB)、1 U/μLのマウスRNase阻害剤 (NEB)、0.004 U/μLの無機E. coliピロホスファターゼ (NEB)、ならびに1 x 反応緩衝液。TURBO DNase (ThermoFisher) を、最終濃度が0.01 U/μLになるように添加し、反応物をさらに30分間インキュベートして、DNAテンプレートを除去した。MegaClear Transcription Clean-upキット (ThermoFisher) またはRNeasy Maxiキット (Qiagen) を使用し、製造者のプロトコルに従って、Cas9 mRNAを精製した。あるいは、mRNAを沈殿プロトコルにより精製し、いくつかの場合では、これに続いてHPLCベースの精製を行った。簡潔に述べると、DNase消化後、LiCl沈殿、酢酸アンモニウム沈殿、および酢酸ナトリウム沈殿を使用して、mRNAを精製する。HPLC精製mRNAについて、LiCl沈殿および再構成の後、mRNAをRP-IP HPLCによって精製した (例えば、Kariko, et al. *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 21 e142を参照のこと)。プールのために選択された画分を合わせ、上記の酢酸ナトリウム/エタノール沈殿によって脱塩した。さらなる代替的な方法において、LiCl沈殿法、これに続いてタンジェンシャルフロー濾過によるさらなる精製により、mRNAを精製した。RNA濃度を、260 nmでの光吸光度を測定することによって決定し (Nanodrop)、転写物をBioanalyzer (Agilent) によるキャピラリー電気泳動によって分析した。

【0637】

配列番号1および2が、RNAに関して以下で言及される場合、Tは、Uで置き換えられるべきであることが理解される (上述のように、N1-メチルシュードウリジンであった)。実施例で使用されるCas9 mRNAは、5' キャップおよび3' ポリAテール、例えば、最大100 ntを含み、配列番号によって特定される。

【0638】

ヒトTTRガイド設計およびカニクイザル相同性ガイド設計を有するヒトTTR

目的の領域においてPAMを特定するために、ヒト参照ゲノム (例えば、hg38) および目的のユーザが規定したゲノム領域 (例えば、TTRタンパク質コードエクソン) を

10

20

30

40

50

用い、初期のガイド選択をインシリコで行った。特定された各PAMについて、分析を行い、統計を報告した。gRNA分子をさらに選択し、いくつかの基準（例えば、GC含有量、予測されるオンターゲット活性、および潜在的オフターゲット活性）に基づいてランク付けした。

【0639】

合計68個のガイドRNAを、エクソン1、2、3、および4内のタンパク質コード領域を標的とするTTR（ENSG00000118271）に対して設計した。合計68個のガイドのうち、33個は、カニクイザル（「cyno」）において100%相同であった。加えて、カニクイザルにおいて完全に相同ではないヒトTTRガイドの10個について、「代替」ガイドを設計し、対応するカニクイザル標的配列と完全に一致するように並行して作製した。これらの「代替」または「ツール」ガイドは、例えば、相同ヒトガイド配列の活性および機能に近似するように、カニクイザルにおいてスクリーニングされ得る。ガイド配列および対応するゲノム座標を提供する（表1）。すべてのガイドRNAをデュアルガイドRNAとして作製し、ガイド配列のサブセットを、修飾シングルガイドRNAとして作製した（表2）。デュアルガイドRNA（dgRNA）ID、修飾シングルガイドRNA（sgRNA）ID、カニクイザルゲノムに対するミスマッチの数、およびカニクイザルと完全に一致するIDにわたるガイドIDアラインメントが提供される（表3）。実施例全体で詳述される実験においてdgRNAを使用する場合、配列番号270を使用した。

【0640】

以下の実施例のsgRNAを、ホスホラミダイトを使用して既知の方法によって化学的に合成した。

【0641】

インビトロでのCas9 mRNAおよびガイドRNA送達

HEK293_Cas9細胞株。Spy_Cas9を構成的に発現するヒト胚性腎臓腺癌細胞株HEK293（「HEK293_Cas9」）を、10%のウシ胎児血清および500μg/mlのG418を追加したDMEM培地中で培養した。細胞を、10,000細胞/ウェルの密度で、96ウェルプレート中、24時間プレATINGした後、トランスフェクションを行った。製造元のプロトコルに従って、細胞を、Lipofectamine RNAiMAX（ThermoFisher、カタログ番号13778150）でトランスフェクトした。細胞を、個々のcrRNA（25nM）、trRNA（25nM）、Lipofectamine RNAiMAX（0.3μL/ウェル）、およびOptiMemを含むリポプレックスによってトランスフェクトした。

【0642】

HUH7細胞株。ヒト肝細胞癌細胞株HUH7（Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank、カタログJCRB0403）を、10%のウシ胎児血清を補充したDMEM培地中で培養した。細胞を、15,000細胞/ウェルの密度で、96ウェルプレート中、20時間プレATINGした後、トランスフェクションを行った。細胞を、製造業者のプロトコルに従って、Lipofectamine MessengerMAX（ThermoFisher、カタログLMRNA003）でトランスフェクトした。細胞を、Spy_Cas9 mRNA（100ng）、MessengerMAX（0.3μL/ウェル）およびOptiMemを含有するリポプレックス、次いで、個々のcrRNA（25nM）、トレーサーRNA（25nM）、MessengerMAX（0.3μL/ウェル）およびOptiMemを含有する別個のリポプレックスを用い、順次トランスフェクトした。

【0643】

HepG2細胞株。ヒト肝細胞癌細胞株HepG2（American Type Culture Collection、カタログHB-8065）を、10%のウシ胎児血清を補充したDMEM培地中で培養した。細胞を計数し、トランスフェクションの24時間前に、96ウェルプレートにおいて10,000細胞/ウェルの密度でBio-coa

10

20

30

40

50

t collagen Iでコーティングした96ウェルプレート (ThermoFisher、カタログ番号877272) 上にプレATINGした。製造元のプロトコルに従って、細胞を、Lipofectamine 2000 (ThermoFisher、カタログ11668019) でトランスフェクトした。細胞を、Spy Cas9 mRNA (100 ng)、Lipofectamine 2000 (0.2 μ L/ウェル) およびOptiMemを含有するリポプレックス、次いで、個々のcrRNA (25 nM)、トレーサーRNA (25 nM)、Lipofectamine 2000 (0.2 μ L/ウェル) およびOptiMemを含有する別個のリポプレックスを用い、順次トランスフェクトした。

【0644】

初代肝臓肝細胞初代ヒト肝臓肝細胞 (PHH) および初代カニクイザル肝臓肝細胞 (PCH) (Gibco) を、製造者のプロトコル (Invitrogen、プロトコル11.28.2012) に従って培養した。簡単に述べると、細胞を解凍し、追加物質を含む肝細胞解凍培地 (Gibco、カタログCM7000) に再懸濁させ、その後、ヒトについては100 gで10分間、カニクイザルについては80 gで4分間、遠心分離した。上清を廃棄し、ペレット化した細胞を、肝細胞プレATING培地および追加物質パック (Invitrogen、カタログ番号A1217601およびCM3000) に再懸濁させた。細胞を計数し、ヒトについては33,000細胞/ウェル、カニクイザルについては60,000細胞/ウェル (または以下にさらに記載するように、TTRタンパク質に対する効果をアッセイする場合には65,000細胞/ウェル) の密度で、Bio-coat collagen Iでコーティングした96ウェルプレート (ThermoFisher、カタログ番号877272) 上にプレATINGした。プレATINGした細胞を、37°Cおよび5% CO₂ 雰囲気での組織培養インキュベーター中で6時間または24時間放置し、接着させた。インキュベーション後、細胞を単層形成について調べ、培地を、無血清追加物質パック (Invitrogen、カタログ番号A1217601およびCM4000) を含む肝細胞培養培地と交換した。

【0645】

Lipofectamine RNAiMax (ThermoFisher、カタログ番号13778150) に基づくトランスフェクションを、製造者のプロトコルに従って行った。細胞を、Spy Cas9 mRNA (100 ng)、Lipofectamine RNAiMax (0.4 μ L/ウェル) およびOptiMemを含有するリポプレックス、次いで、crRNA (25 nM) およびトレーサーRNA (25 nM) またはsgRNA (25 nM)、Lipofectamine RNAiMax (0.4 μ L/ウェル) およびOptiMemを含有する別個のリポプレックスを用い、順次トランスフェクトした。

【0646】

ガイドRNA (RNP) をロードしたSpy Cas9タンパク質を細胞にエレクトロポレーションまたはトランスフェクションする前に、リボヌクレオチド形成を行った。デュアルガイド (dgRNA) のために、個々のcrRNAおよびtrRNAを、等量の試薬を混合し、95°Cで2分間インキュベートし、室温まで冷却することによって、あらかじめアニーリングしておいた。シングルガイド (sgRNA) を95°Cで2分間沸騰させ、室温まで冷却した。沸騰させたdgRNAまたはsgRNAを、OptiMem中のSpy Cas9タンパク質とともに、室温で10分間インキュベートし、リボ核タンパク質 (RNP) 複合体を形成した。

【0647】

初代ヒトおよびカニクイザル肝細胞へのRNPエレクトロポレーションのために、細胞を解凍し、ヒト肝細胞については、1 μ L当たり2500個の細胞、カニクイザル肝細胞については、1 μ L当たり3500個の細胞の濃度で、Lonza electroporation Primary Cell P3緩衝液に再懸濁させる。ガイドごとに、20 μ Lの体積の再懸濁細胞および5 μ LのRNPと一緒に混合する。20 μ Lのこの混合

10

20

30

40

50

物を、Lonzaエレクトロポレーションプレートに配置する。細胞を、事前に設定されたプロトコルEX-147を有するLonzaヌクレオフェクターを用い、エレクトロポレーションした。エレクトロポレーション後、細胞を、あらかじめ温めた維持培地を含有するBiocoatプレートに移し、37℃、5%CO₂で組織培養インキュベーター中に放置する。

【0648】

RNPリポプレックストランスフェクションのために、製造元のプロトコルに従って、細胞を、Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher、カタログ番号13778150)でトランスフェクトした。Spy Cas9 (10nM)、個々のガイド (10nM)、トレーサーRNA (10nM)、Lipofectamine RNAiMAX (1.0μL/ウェル) およびOptiMemを含むRNPによって、細胞をトランスフェクトした。RNP形成を上述のように実施した。

10

【0649】

Precision Nanosystems NanoAssembler (商標) Benchtop Instrumentを使用し、製造者のプロトコルに従って、またはクロスフローコングを使用して、脂質およびRNA溶液をマイクロ流体混合することによって、LNPを形成した。

【0650】

LNP製剤-NanoAssembler

一般に、脂質ナノ粒子の構成要素を、種々のモル比の脂質成分を用いて、100%エタノールに溶解した。RNAカーゴを、25mMのクエン酸塩、100mMのNaCl (pH 5.0) に溶解して、およそ0.45mg/mLのRNAカーゴ濃度を得た。LNPを、約4.5または約6のRNAホスフェートに対する脂質アミンの (N:P) モル比、g RNAとmRNAの重量比1:1で製剤化した。

20

【0651】

Precision Nanosystems NanoAssembler (商標) Benchtop Instrumentを使用し、製造者のプロトコルに従って、脂質およびRNA溶液をマイクロ流体混合することによって、LNPを形成した。差圧式流量を使用して混合する間、水性溶媒と有機溶媒の2:1の比を維持した。混合後、LNPを収集し、水で希釈し (およそ1:1 v/v)、室温で1時間保持し、最終的な緩衝液交換の前に、水でさらに希釈した (およそ1:1 v/v)。50mMのTris、45mMのNaCl、5% (w/v) のスクロース、pH 7.5 (TSS) への最終的な緩衝液交換は、PD-10脱塩カラム (GE) を用いて完了した。必要に応じて、Amicon 100kDa遠心フィルタ (Millipore) で遠心分離することによって、製剤を濃縮した。次いで、得られた混合物を0.2μmの滅菌フィルタを使用して濾過した。最終LNPを、さらなる使用まで-80℃で保存した。

30

【0652】

LNP製剤化-クロスフロー

クロスフロー技術を使用して調製されるLNPのために、エタノール中の脂質を2体積のRNA溶液および1体積の水と衝突噴流混合することによって、LNPを調製した。エタノール中の脂質を、交差混合により、2体積部のRNA溶液と混合する。第4の水の流れを、インラインティーを通る交差の出力流と混合する。(WO2016/010840の図2を参照のこと)。LNPを室温で1時間保持し、さらに水で希釈した (およそ1:1 v/v)。希釈したLNPを、フラットシートカートリッジ (Sartorius、100kD MWCO) 上でタンジェンシャルフロー濾過を使用して濃縮し、次いで、透析濾過により、50mMのTris、45mMのNaCl、5% (w/v) のスクロース、pH 7.5 (TSS) へと緩衝液を交換した。あるいは、TSSへの最終緩衝液交換をPD-10脱塩カラム (GE) を用いて完了した。必要に応じて、Amicon 100kDa遠心フィルタ (Millipore) で遠心分離することによって、製剤を濃縮した。次いで、得られた混合物を0.2μmの滅菌フィルタを使用して濾過した。最終LN

40

50

Pを、さらなる使用まで4℃または-80℃で保存した。

【0653】

製剤分析

本開示のLNPの多分散指数(「*pdi*」)およびサイズを特性決定するために、動的光散乱(「DLS」)を使用する。DLSは、試料を光源に供した結果として生じる光の散乱を測定する。DLS測定から決定されたPDIは、集合体内の粒径(平均粒径付近)の分布を表し、完全に均一な集合体のPDIはゼロである。平均粒径および多分散性は、Malvern Zetasizer DLS装置を使用した動的光散乱(DLS)によって測定される。LNP試料をPBSで30倍に希釈した後、DLSにより測定した。平均粒径の強度に基づく測定であるZ平均直径を、数平均直径および*pdi*とともに報告した。Malvern Zetasizer装置も、LNPのゼータ電位を測定するために使用される。試料は、測定前にpH7.4の0.1×PBSで1:17に(50uLを800uLに)希釈する。

10

【0654】

電気泳動光散乱を使用して、指定のpHでのLNPの表面電荷を特性決定する。表面電荷、すなわちゼータ電位は、LNP懸濁液中の粒子間の静電反発/引力の大きさの尺度である。

【0655】

非対称フローフィールドフローフラクシオネーション-マルチアングル光散乱(AF4-MALS)を使用して、流体力学的半径によって組成物内の粒子を分離させた後、分画された粒子の分子量、流体力学半径、および二乗平均平方根半径を測定する。これにより、分子量および粒度分布、ならびにBurchard-Stockmeyer Plot(粒子の内部コア密度を示唆する時間経過に伴う流体力学的半径に対する二乗平均平方根(「*rms*」)半径の比)、および*rms*コンフォメーションプロット(分子量のlogに対する*rms*半径のlog、得られる線形フィッティングの傾きが、伸長性に対する圧縮性の程度を与える)などの二次的特徴を評価することが可能になる。

20

【0656】

ナノ粒子トラッキング分析(NTA、Malvern Nanosight)を使用して、粒度分布および粒子濃度を決定することができる。LNP試料を適切に希釈し、顕微鏡スライドに注入する。粒子が視野を通してゆっくりと注がれるときに、カメラにより散乱光を記録する。動画をキャプチャした後、ナノ粒子トラッキング分析により、ピクセルをトラッキングし、拡散係数を計算することによって動画を処理する。この拡散係数は、粒子の流体力学半径に変換することができる。また、この装置により、分析で計数された個々の粒子の数を計数し、粒子濃度を得る。

30

【0657】

低温電子顕微鏡(「cryo-EM」)を使用して、LNPの粒径、形態、および構造特性を決定することができる。

【0658】

LNPの脂質組成分析は、液体クロマトグラフィーと、それに続く帯電エアロゾル検出(LC-CAD)から決定することができる。この分析により、実際の脂質含有量と理論上の脂質含有量との比較を提供することができる。

40

【0659】

LNP組成物は、平均粒径、多分散指数(*pdi*)、全RNA含有量、RNAの封入効率、およびゼータ電位について分析される。LNP組成物は、脂質分析、AF4-MALS、NTA、および/またはcryo-EMによってさらに特性決定され得る。平均粒径および多分散性は、Malvern Zetasizer DLS装置を使用した動的光散乱(DLS)によって測定される。LNP試料をPBS緩衝液で希釈した後、DLSにより測定した。平均粒径の強度に基づく測定であるZ平均直径を、数平均直径および*pdi*とともに報告する。Malvern Zetasizer装置も、LNPのゼータ電位を測定するために使用される。試料は、測定前にpH7.4の0.1×PBSで1:17に

50

(50 μ Lを800 μ Lに)希釈する。

【0660】

蛍光に基づくアッセイ (Ribogreen (登録商標)、ThermoFisher Scientific) を使用して、全RNA濃度および遊離RNAを決定する。LNP試料は、0.2%のTriton-X100を含む1×TE緩衝液で適切に希釈して全RNAを決定するか、1×TE緩衝液で遊離RNAを決定する。標準曲線を、組成物の作製に使用した開始RNA溶液を利用することによって作成し、1×TE緩衝液±0.2%のTriton-X100で希釈する。次に、Diluted Ribogreen (登録商標) 色素 (製造業者の使用説明書に従う) を標準物および試料の各々に添加して、遮光状態で、室温でおよそ10分間インキュベートする。SpectraMax M5 Microplate Reader (Molecular Devices) を使用して、励起波長、自動カットオフ波長、および発光波長をそれぞれ488 nm、515 nm、および525 nmに設定して試料を読み取る。全RNAおよび遊離RNAを、適切な標準曲線から決定する。

【0661】

封入効率を、(全RNA-遊離RNA) / 全RNAとして計算する。DNA由来のカーゴ成分の封入効率を決定するために同じ手順を使用してもよい。蛍光に基づくアッセイでは、一本鎖DNAの場合はOligreen Dyeを使用してもよく、二本鎖DNAの場合はPicogreen Dyeを使用してもよい。あるいは、全RNA濃度は、逆相イオン対形成 (RP-IP) HPLC法によって決定することができる。Triton-X-100を使用してLNPを破壊し、RNAを放出する。次いで、RP-IP HPLCによって、脂質成分からクロマトグラフィーによってRNAを分離し、260 nmでのUV吸光度を使用して、標準曲線に対して定量化する。

【0662】

AF4-MALSを使用して、分子量および粒度分布、ならびにそれらの計算からの二次統計を調べる。LNPを必要に応じて希釈し、HPLCオートサンプラーを使用してAF4分離チャンネルに注入し、これらを集束させ、次いで、チャンネルを横切るクロスフローにおいて、指数関数的勾配で溶出させる。すべての流体は、HPLCポンプおよび Wyatt Eclipse Instrumentによって駆動される。AF4チャンネルから溶出する粒子は、UV検出器、マルチアングル光散乱検出器、準弾性光散乱検出器、および示差屈折率検出器を通過する。生データを、Debyeモデルを使用することによって処理して、検出器シグナルから分子量およびrms半径を決定する。

【0663】

LNPの脂質成分を、帯電エアロゾル検出器 (CAD) に接続したHPLCによって定量的に分析する。4つの脂質成分のクロマトグラフィー分離を逆相HPLCによって達成する。CADは、すべての不揮発性化合物を検出する破壊質量系検出器であり、分析対象物の構造に関係なくシグナルは一貫している。

【0664】

典型的には、LNPを調製する場合、封入は80%を超えており、粒径は120 nm未満であり、pdiは0.2未満であった。

【0665】

インビボでのLNP送達

別段で注記しない限り、各研究において、6~10週齢の範囲のCD-1雌マウスを使用した。動物を体重測定し、体重に従ってグループ化し、グループ平均体重に基づいて投与溶液を調製した。LNPを、1匹当たり0.2 mLの体積 (体重1キログラム当たり約10 mL) で、側尾静脈を介して投与した。投与から約6時間後、動物を有害作用について観察した。投与から24時間後に体重を測定し、イソフロラン麻酔下での心臓穿刺による失血によって様々な時点で動物を安楽死させた。血液を血清分離チューブまたは本明細書に記載される血漿用の緩衝クエン酸ナトリウムを含むチューブに収集した。インビボ編集を伴う研究のために、肝臓組織を、典型的には、DNA抽出および分析のために、各

動物からの中央葉または3つの独立葉（例えば、右中央葉、左中央葉、および左側葉）から収集した。

【0666】

動物研究で使用するトランスサイレチン（TTR）ELISA分析

血液を採取し、示されるようにして血清を単離した。全マウスTTR血清レベルは、Mouse Prealbumin (Transthyretin) ELISAキット (Aviva Systems Biology、カタログOKIA00111) を使用して決定し、ラットTTR血清レベルは、ラット特異的ELISAキット (Aviva Systems Biologyカタログ番号OKIA00159) を使用して測定した。ヒトTTR血清レベルは、ヒト特異的ELISAキット (Aviva Systems Biologyカタログ番号OKIA00081) を使用して測定し、それぞれ製造者のプロトコルに従った。簡潔に述べると、血清をキット試料希釈液により、最終希釈を、10,000倍、またはマウス血清においてヒトTTRを測定する場合には5000倍に段階希釈した。調製した標準曲線または希釈した血清試料100 μ LをELISAプレートに添加し、室温で30分間インキュベートし、次いで、提供された洗浄緩衝液で3回洗浄した。次に、100 μ Lの検出抗体を各ウェルに添加し、室温で20分間インキュベートし、続いて3回洗浄した。100 μ Lの基質を添加し、次いで、10分間、室温でインキュベートした後、100 μ Lの停止溶液を添加する。内容物の吸光度は、Spectramax M5プレートリーダーで測定し、分析はSoftmax Proバージョン7.0ソフトウェアを使用した。血清TTRレベルを、4パラメータロジスティックフィットを使用して標準曲線から定量化し、 μ g/血清のmL数または対照（ビヒクル治療）動物に対するノックダウンパーセントとして表した。

【0667】

ゲノムDNA単離

トランスフェクトされた細胞を、トランスフェクションの24時間後、48時間後、または72時間後に採取した。ゲノムDNAを、96ウェルプレートの各ウェルから、50 μ L/ウェルのBuccal Amp DNA Extraction溶液 (Epicerre、カタログQE09050) を使用して、製造業者のプロトコルに従って抽出した。すべてのDNA試料に対し、本明細書に記載されるように、PCRおよびその後のNGS分析を行った。

【0668】

次世代シーケンシング（「NGS」）分析

ゲノム中の標的位置における編集効率を定量的に決定するために、シーケンシングを使用して、遺伝子編集によって導入された挿入および欠失の存在を特定した。

【0669】

目的の遺伝子（例えば、TTR）内の標的部位周辺でプライマーを設計し、目的のゲノム領域を増幅させた。

【0670】

シーケンシングのために化学的性質を付加するために製造者のプロトコル (Illumina) に従って追加のPCRを実施した。アンプリコンをIllumina MiSeq装置でシーケンシングした。低品質スコアを有するリードを除去した後に、リードを、参照ゲノム（例えば、ヒト参照ゲノム (hg38)、カニクイザル参照ゲノム (mf5)、ラット参照ゲノム (rn6)、またはマウス参照ゲノム (mm10)）とアラインメントした。得られたリードを含むファイルを、参照ゲノム (BAMファイル) にマッピングし、目的の標的領域と重なり合うリードを選択し、挿入、置換、もしくは欠失を含むリードの数に対する、野生型リードの数を計算した。

【0671】

編集パーセンテージ（例えば「編集効率」または「編集パーセント」または「インデル頻度」）は、野生型を含む配列リードの総数に対する、挿入/欠失（「インデル」）または置換を有する配列リードの総数として定義される。

【0672】

ウェスタンブロットによる分泌型トランスサイレチン（「TTR」）タンパク質の分析

培地中のTTRタンパク質の分泌レベルを、ウェスタンブロット法を使用して決定した。HepG2細胞を、以前に記載されたように、表1からの選択されたガイドでトランスフェクトした。トランスフェクションの3日ごとに培地の交換を実施した。トランスフェクションから6日後、培地を除去し、細胞を、胎児ウシ血清（FBS）を含まない培地で1回洗浄した。血清を含まない培地を細胞に添加し、37℃でインキュベートした。4時間後、培地を除去し、任意の破片をペレット化するために遠心分離した。各ウェルの細胞数は、残存細胞についてのCTGアッセイから得られた値に基づき、プレート平均との比較に基づいて推定した。遠心分離後、培地を新しいプレートに移し、-20℃で保存した。培地中に分泌された任意のタンパク質を沈殿させるために、培地のアセトン沈殿を行った。4体積の氷冷アセトンを、1体積の培地に添加した。溶液を十分に混合し、-20℃で90分間維持した。アセトン：培地混合物を、15,000xg、4℃で15分間遠心分離した。上清を廃棄し、保持したペレットを空気乾燥して、残留アセトンを除去した。ペレットを、15μLのRIPA緩衝液（Boston Bio Products、カタログ番号BP-115）と、完全なプロテアーゼ阻害剤カクテル（Sigma、カタログ番号11697498001）、1mMのDTTからなる新しく添加したプロテアーゼ阻害剤混合物で再懸濁させた。溶解物をLaemmli緩衝液と混合し、95℃で10分間かけて変性させた。製造者のプロトコルに従って、12%のBis-Trisゲル（ThermoFisher）上でNuPage系を使用してウェスタンブロットを実行し、その後、0.45μmのニトロセルロース膜（Bio-Rad、カタログ番号1620115）上に濡れた状態で移した。ブロットを、室温で、ラボロッカー上で30分間、TBS中の5%のDry Milk使用してブロックした。ブロットをTBSTですすぎ、TBST中1:1000でウサギα-TTRモノクローナル抗体（Abcam、カタログ番号Ab75815）でプローブした。アルファ-1抗トリプシンを、ローディング対照（Sigma、カタログ番号HPA001292）として、TBST中1:1000で使用し、TTR一次抗体と同時にインキュベートした。ブロットを袋に密封し、ラボロッカー上で、4℃で一晩保持した。インキュベーション後、ブロットをTBST中で各5分間かけて3回すすぎ、ウサギに対する二次抗体（ThermoFisher、カタログ番号PI-SA535571）で、TBST中1:25,000で、室温で30分間プローブした。インキュベーション後、ブロットをTBST中で各5分間かけて3回、PBSで2回すすいだ。ブロットを可視化し、Licor Odysseyシステムを使用して分析した。

【0673】

ウェスタンブロットによる細胞内TTRの分析

肝細胞癌細胞株HUH7を、以前に記載されたように、表1からの選択されたガイドでトランスフェクトした。トランスフェクションから6日後、培地を除去し、細胞を、50μL/ウェルのRIPA緩衝液（Boston Bio Products、カタログ番号BP-115）と、完全なプロテアーゼ阻害剤カクテル（Sigma、カタログ番号11697498001）、1mMのDTT、および250U/mlのBenzonase（EMD Millipore、カタログ番号71206-3）からなる新しく添加したプロテアーゼ阻害剤混合物で溶解した。細胞を氷上で30分間維持し、そのときに、NaCl（1M最終濃度）を添加した。細胞溶解物を完全に混合し、氷上で30分間保持した。全細胞抽出物（「WCE」）をPCRプレートに移し、遠心分離してペレットデブリにした。Bradfordアッセイ（Bio-Rad、カタログ番号500-0001）を使用して、溶解物のタンパク質含有量を評価した。製造者のプロトコルに従って、Bradfordアッセイの手順を完了した。使用前に、抽出物を-20℃で保存した。ウェスタンブロットを実施して、細胞内TTRタンパク質レベルを評価した。溶解物をLaemmli緩衝液と混合し、95℃で10分間かけて変性させた。製造者のプロトコルに従って、12%のBis-Trisゲル（ThermoFisher）上でNuPage系を使用してウェスタンブロットを実行し、その後、0.45μmのニトロセルロース膜（B i

10

20

30

40

50

o-Rad、カタログ番号1620115)上に濡れた状態で移した。移した後、膜を水で完全にすすぎ、Ponceau S溶液(Boston Bio Products、カタログ番号ST-180)で染色し、完全に均一な移動を確認した。ブロットを、室温で、ラボロッカー上で30分間、TBS中の5%のDry Milk使用してブロックした。ブロットをTBSTですすぎ、TBST中1:1000でウサギ α -TTRモノクローナル抗体(Abcam、カタログ番号Ab75815)でプローブした。 β -アクチンをローディング対照(ThermoFisher、カタログ番号AM4302)として、TBST中1:2500で使用し、TTR一次抗体と同時にインキュベートした。ブロットを袋に密封し、ラボロッカー上で、4℃で一晩保持した。インキュベーション後、ブロットをTBST中で各5分間かけて3回すすぎ、マウスおよびウサギに対する二次抗体(ThermoFisher、カタログ番号PI35518およびPI535571)で、TBST中各々1:25,000で、室温で30分間プローブした。インキュベーション後、ブロットをTBST中で各5分間かけて3回、PBSで2回すすいだ。ブロットを可視化し、Licor Odysseyシステムを使用して分析した。

10

【0674】

実施例2. dgRNA配列のスクリーニング

複数の細胞型におけるTTR dgRNAの交差スクリーニング

【0675】

ヒトTTRを標的とするdgRNA形式中のガイドおよびカニクイザル適合配列を、実施例1に記載したように、HEK293_Cas9、HUH7およびHepG2細胞、ならびに初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞に送達した。各細胞型にわたって、各ガイド配列を含むcrRNAについて編集率を決定し、次いで、ガイド配列を最高編集%に基づいてランク付けした。5種類すべての細胞株において、表1のガイド配列のスクリーニングデータを以下に列挙する(表4~11)。

20

【0676】

表6は、Spy_Cas9タンパク質を構成的に過剰発現するヒト腎臓腺癌細胞株HEK293_Cas9において、TTR crRNAについての編集%、挿入(Ins)%、および欠失(Del)%についての平均および標準偏差を示す。

30

40

50

【表 8 - 1】

表6：d gRNAでトランスフェクトされたHeck Cas 9細胞におけるTTR編集データ

ガイドID	編集%の平均	編集%の標準偏差	挿入%の平均	挿入%の標準偏差	欠失%の平均	欠失%の標準偏差
CR003335	26.59	4.73	4.73	0.65	21.87	4.09
CR003336	29.09	4.57	3.31	0.24	25.78	4.32
CR003337	42.72	1.72	5.24	1.62	37.48	0.70
CR003338	52.42	3.28	4.76	0.03	47.66	3.30
CR003339	56.37	4.13	49.39	3.23	6.98	0.91
CR003340	42.38	8.43	27.88	4.31	14.50	4.13
CR003341	20.04	5.26	6.73	1.86	13.31	3.41
CR003342	36.57	5.80	1.19	0.22	35.38	5.59
CR003343	24.36	1.51	4.82	0.43	19.53	1.39
CR003344	33.87	2.93	4.32	0.58	29.54	2.37
CR003345	35.02	7.05	19.00	3.58	16.01	3.48
CR003346	48.33	5.81	33.03	3.12	15.30	2.72
CR003347	21.45	5.57	0.95	0.33	20.50	5.26
CR003348	35.53	5.81	22.32	3.79	13.21	2.03
CR003349	13.19	4.46	8.03	2.81	5.16	1.66

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

CR003350	22.3 1	4.2 5	5.5 4	0.7 4	16.7 7	3.51
CR003351	49.6 7	3.7 7	28. 42	1.6 9	21.2 4	2.22
CR003352	27.9 0	7.5 5	4.9 1	1.3 5	22.9 9	6.26
CR003353	25.0 3	5.1 6	3.7 1	0.7 5	21.3 2	4.42
CR003354	18.4 6	2.0 2	2.5 6	0.2 1	15.9 0	1.89
CR003355	30.6 0	2.5 3	6.9 9	0.8 0	23.6 1	1.75
CR003356	32.2 1	4.7 1	10. 03	1.3 9	22.1 9	3.36
CR003357	43.2 3	6.7 1	5.3 8	0.8 7	37.8 5	5.88
CR003358	5.44	0.8 6	1.2 9	0.1 6	4.14	0.84
CR003359	37.7 5	7.5 0	18. 35	3.7 3	19.4 0	3.78
CR003360	22.6 8	3.1 6	2.7 0	0.5 6	19.9 8	2.60
CR003361	34.4 5	8.9 7	8.6 6	1.6 6	25.7 8	7.32
CR003362	9.90	2.6 6	1.4 8	0.3 3	8.41	2.33
CR003363	31.0 3	10. 74	14. 77	4.2 1	16.2 6	6.54
CR003364	35.6 5	7.9 0	19. 17	4.2 4	16.4 8	3.76
CR003365	36.4 3	6.2 0	11. 83	1.8 8	24.6 1	4.45
CR003366	47.3 6	6.5 9	10. 10	1.2 8	37.2 6	5.32
CR003367	47.1 1	15. 43	28. 44	9.1 1	18.6 7	6.33

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

CR003368	40.35	10.13	3.73	0.96	36.61	9.17
CR003369	33.10	7.26	9.06	1.12	24.04	6.16
CR003370	34.22	5.69	4.49	0.67	29.73	5.06
CR003371	25.60	8.33	3.84	1.41	21.76	6.92
CR003372	15.24	7.92	3.25	1.61	11.99	6.31
CR003373	13.55	2.40	1.31	0.21	12.25	2.19
CR003374	10.91	0.88	0.81	0.10	10.10	0.81
CR003375	11.63	3.18	0.78	0.17	10.85	3.05
CR003376	28.16	4.49	1.35	0.18	26.81	4.52
CR003377	24.70	4.44	2.71	0.54	21.99	3.91
CR003378	20.97	2.67	4.49	0.49	16.48	2.18
CR003379	26.32	2.91	5.34	0.61	20.98	2.30
CR003380	47.64	5.74	3.64	0.24	44.00	5.52
CR003381	22.04	5.74	3.82	1.26	18.23	4.64
CR003382	29.95	3.13	4.46	0.45	25.49	2.73
CR003383	40.47	0.64	25.12	0.45	15.35	0.66
CR003384	17.45	1.32	1.45	0.23	16.00	1.42
CR003385	26.19	5.62	7.36	1.57	18.82	4.06

10

20

30

【表 8 - 4】

CR003386	33.12	10.65	2.94	0.63	30.18	10.03
CR003387	24.68	5.93	7.75	1.99	16.92	3.94
CR003388	19.23	4.41	1.41	0.39	17.82	4.07
CR003389	34.18	5.09	10.30	2.12	23.87	3.02
CR003390	28.02	3.77	4.31	0.25	23.71	3.61
CR003391	44.81	4.67	0.61	0.07	44.19	4.63
CR003392	21.67	7.52	0.85	0.26	20.82	7.27

40

【0677】

表 7 は、ヒト肝細胞癌細胞株 H U H 7 において、S p y C a s 9 m R N A（配列番号 2）と共トランスフェクトされた試験 T T R c r R N A についての編集 %、挿入（I n s）%、および欠失（D e l）% についての平均および標準偏差を示す。

50

【表 9 - 1】

表 7 : S p y C a s 9 m R N A および d g R N A で ト ラ ン ス フ ェ ク ト さ れ た H U H 7 細胞における T T R 編集データ

ガイド ID	編集平均%	編集標準偏差%	挿入%の平均	挿入%の標準偏差	欠失%の平均	欠失%の標準偏差
CR003335	31.95	4.50	4.62	0.83	27.57	4.08
CR003336	30.05	4.25	4.14	1.07	26.56	3.55
CR003337	55.72	3.12	8.34	0.93	48.95	2.24
CR003338	75.64	2.03	10.22	1.42	67.06	2.79
CR003339	79.97	4.73	60.55	3.94	20.13	1.02
CR003340	46.93	7.12	33.33	6.01	14.23	1.65
CR003341	20.58	5.98	7.78	1.64	13.20	4.44
CR003342	45.14	7.16	1.23	0.91	44.66	7.68
CR003343	76.13	7.04	9.58	3.49	66.97	6.10
CR003344	64.02	3.33	10.76	1.35	54.40	2.71
CR003345	72.43	2.17	41.33	0.96	32.18	1.37
CR003346	18.07	1.02	13.17	1.39	6.97	3.06
CR003347	32.16	5.50	1.64	0.42	30.79	5.11
CR003348	57.14	10.98	36.08	6.97	22.71	4.42
CR003349	14.14	4.99	9.73	3.26	4.82	1.91

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

CR0033 50	52. 91	7. 61	13. 4 3	2. 00	41. 6 4	6. 03
CR0033 51	63. 51	4. 61	36. 8 7	2. 49	27. 4 9	2. 14
CR0033 52	39. 68	9. 53	7. 62	7. 42	32. 7 9	7. 37
CR0033 53	69. 18	4. 59	7. 73	2. 46	62. 8 7	3. 13
CR0033 54	12. 27	3. 38	1. 25	0. 40	11. 4 6	3. 23
CR0033 55	38. 83	5. 31	9. 40	1. 81	30. 3 1	3. 56
CR0033 56	49. 63	5. 55	18. 9 8	2. 67	31. 3 1	3. 04
CR0033 57	36. 31	5. 72	6. 37	1. 17	30. 8 2	4. 68
CR0033 58	36. 50	6. 17	10. 5 3	1. 56	26. 6 0	4. 49
CR0033 59	66. 75	5. 84	21. 7 3	2. 30	45. 9 7	3. 93
CR0033 60	58. 62	8. 73	5. 01	0. 60	55. 1 3	8. 19
CR0033 61	28. 68	6. 52	6. 84	1. 26	22. 4 4	5. 31
CR0033 62	26. 43	0. 83	3. 43	0. 32	23. 7 6	0. 85
CR0033 63	41. 01	7. 16	17. 8 3	3. 32	23. 7 8	3. 97
CR0033 64	47. 13	10. 6 1	24. 6 8	5. 15	23. 0 3	5. 74
CR0033 65	60. 68	5. 25	17. 7 7	1. 57	43. 8 2	3. 73
CR0033 66	69. 98	8. 84	20. 7 7	3. 10	50. 3 2	5. 69
CR0033 67	66. 29	4. 48	33. 6 2	4. 14	33. 4 8	0. 51

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

CR0033 68	31. 57	11. 7 3	3. 08	0. 92	29. 6 9	11. 32
CR0033 69	24. 19	6. 89	7. 12	2. 27	17. 3 8	4. 76
CR0033 70	39. 16	11. 5 9	4. 83	1. 79	35. 5 5	10. 35
CR0033 71	40. 47	7. 68	6. 07	0. 89	35. 6 5	7. 01
CR0033 72	21. 52	6. 02	4. 89	1. 66	17. 2 5	4. 58
CR0033 73	27. 29	4. 45	3. 31	0. 66	25. 1 2	4. 12
CR0033 74	3. 1 0	0. 68	0. 45	0. 24	2. 87	0. 54
CR0033 75	2. 3 8	0. 22	0. 26	0. 14	2. 25	0. 12
CR0033 76	19. 42	5. 60	1. 37	0. 45	18. 5 5	5. 28
CR0033 77	34. 93	5. 47	5. 59	0. 88	29. 8 9	4. 71
CR0033 78	40. 73	4. 63	9. 73	1. 85	32. 2 7	2. 91
CR0033 79	19. 18	5. 17	3. 38	0. 77	16. 4 8	4. 32
CR0033 80	31. 76	5. 81	3. 29	0. 57	29. 2 9	5. 42
CR0033 81	99. 70	0. 17	1. 92	0. 20	99. 7 0	0. 17
CR0033 82	34. 47	5. 71	0. 14	0. 16	34. 4 7	5. 71
CR0033 83	42. 89	10. 1 4	2. 14	0. 56	41. 1 9	9. 67
CR0033 84	17. 03	1. 95	0. 84	0. 30	16. 2 9	1. 84
CR0033 86	69. 40	19. 4 1	0. 53	0. 23	69. 3 4	19. 32

10

20

30

【表 9 - 4】

CR0033 87	25. 64	3. 69	0. 23	0. 07	25. 5 5	3. 62
CR0033 88	59. 48	4. 29	3. 88	0. 68	56. 4 5	4. 45
CR0033 89	62. 32	1. 97	13. 1 9	1. 18	50. 9 0	1. 02
CR0033 90	18. 97	4. 82	3. 31	0. 91	16. 4 9	3. 98
CR0033 91	61. 31	13. 2 1	2. 10	0. 51	59. 7 0	12. 76
CR0033 92	28. 37	8. 58	1. 93	0. 73	26. 9 8	7. 94

40

【0678】

表 8 は、ヒト肝細胞癌細胞株 Hep G 2 において、Spy Cas 9 mRNA（配列番号 2）と共トランスフェクトされた試験 TTR および対照 crRNA についての編集%、挿入（Ins）%、および欠失（Del）% についての平均および標準偏差を示す。

【表 10-1】

表 8 : Spy Cas 9 mRNA および dgRNA でトランスフェクトされた Hep G 2 細胞における TTR 編集データ

ガイド ID	編集平均 %	編集標準偏差 %	挿入 % の平均	挿入 % の標準偏差	欠失 % の平均	欠失 % の標準偏差
CR001261 (対照)	49.16	7.45	16.46	3.46	32.71	4.06
CR001262 (対照)	63.33	5.66	59.88	4.92	3.45	0.86
CR001263 (対照)	39.19	6.98	37.59	8.01	1.60	1.92
CR001264 (対照)	57.09	12.14	47.47	9.25	9.61	2.89
CR003335	37.19	2.12	32.96	1.67	4.23	0.59
CR003336	31.31	5.47	30.48	5.10	0.83	0.75
CR003337	61.93	2.68	59.28	2.11	2.65	1.39
CR003338	68.00	6.09	65.40	6.78	2.60	1.17
CR003339	68.21	7.67	12.37	1.47	55.84	6.31
CR003340	37.76	6.01	6.12	1.95	31.65	4.07
CR003341	15.60	5.49	9.94	3.38	5.66	2.13
CR003342	11.06	6.71	10.78	6.69	0.28	0.03
CR003343	45.41	15.20	40.05	10.79	5.36	5.20
CR003344	33.43	6.11	29.81	5.09	3.62	1.13
CR003345	10.58	9.25	6.12	5.38	4.45	3.87

10

20

30

40

50

【表 10-2】

CR00334 6	0. 1 3	0. 0 5	0. 07 8	0. 0 2	0. 05 1	0. 03 0
CR00334 7	22. 57	10. 94	21. 0 8	11. 19	1. 49 0	0. 90 0
CR00334 8	38. 44	10. 45	17. 0 4	5. 0 4	21. 4 0	5. 89 0
CR00334 9	8. 3 6	2. 1 9	4. 46 5	1. 7 5	3. 91 0	0. 76 0
CR00335 0	29. 60	5. 1 7	25. 1 6	4. 5 6	4. 44 0	0. 67 0
CR00335 1	57. 54	5. 6 7	31. 9 8	2. 6 3	25. 5 7	3. 08 0
CR00335 2	44. 28	8. 7 1	39. 5 1	7. 1 0	4. 77 0	1. 79 0
CR00335 3	60. 40	11. 37	56. 7 1	9. 9 5	3. 68 0	1. 45 0
CR00335 4	5. 3 6	3. 9 4	4. 84 1	3. 4 1	0. 53 0	0. 71 0
CR00335 5	15. 80	5. 3 8	12. 3 6	4. 2 3	3. 44 0	1. 16 0
CR00335 6	9. 3 9	1. 8 2	5. 67 3	1. 0 3	3. 72 0	0. 92 0
CR00335 7	45. 83	10. 66	42. 3 7	8. 4 7	3. 46 0	2. 28 0
CR00335 8	35. 93	7. 3 4	28. 6 6	7. 7 6	7. 27 0	1. 77 0
CR00335 9	64. 44	14. 90	48. 7 9	14. 32	15. 6 5	1. 94 0
CR00336 0	41. 31	12. 23	38. 9 4	10. 60	2. 38 0	1. 78 0
CR00336 1	14. 05	4. 7 9	11. 4 7	4. 3 5	2. 58 0	0. 43 0
CR00336 2	17. 44	4. 3 4	16. 5 0	4. 8 6	0. 94 0	0. 52 0
CR00336 3	42. 65	9. 9 0	28. 5 8	6. 9 5	14. 0 7	3. 01 0

10

20

30

40

50

【表 10-3】

CR00336 4	51. 88	7. 6 7	31. 0 3	2. 6 7	20. 8 5	5. 03
CR00336 5	46. 88	15. 78	35. 7 7	13. 49	11. 1 1	2. 30
CR00336 6	54. 69	9. 1 0	46. 2 0	8. 9 8	8. 49	1. 11
CR00336 7	45. 55	8. 1 9	24. 2 8	6. 5 7	21. 2 7	1. 62
CR00336 8	51. 55	8. 6 0	48. 3 4	9. 8 7	3. 22	1. 36
CR00336 9	22. 62	4. 0 1	17. 1 1	4. 4 7	5. 51	2. 52
CR00337 0	28. 51	6. 9 4	24. 8 8	6. 1 7	3. 62	1. 45
CR00337 1	15. 91	4. 1 7	14. 0 7	4. 0 2	1. 84	0. 22
CR00337 2	14. 57	2. 4 7	12. 1 4	2. 0 8	2. 42	0. 40
CR00337 3	17. 69	8. 4 1	15. 9 2	6. 4 4	1. 77	1. 97
CR00337 4	5. 4 3	0. 5 3	5. 12	0. 6 2	0. 31	0. 36
CR00337 5	2. 0 6	0. 0 4	1. 96	0. 0 6	0. 10	0. 03
CR00337 6	14. 41	3. 0 1	14. 1 6	2. 9 3	0. 24	0. 10
CR00337 7	16. 30	2. 8 5	15. 2 9	2. 5 9	1. 02	0. 59
CR00337 8	8. 1 6	3. 8 3	6. 82	3. 4 3	1. 34	0. 61
CR00337 9	19. 74	4. 2 4	17. 7 0	4. 3 0	2. 04	0. 33
CR00338 0	17. 08	2. 4 8	14. 7 8	1. 1 8	2. 30	1. 36
CR00338 1	6. 8 1	3. 4 8	6. 18	3. 8 2	0. 63	0. 44

10

20

30

40

50

【表 10-4】

CR00338 2	1. 7 3	0. 1 4		0. 1 2		
CR00338 3	6. 3 5	1. 6 7	1. 58 6. 19	1. 6 8	0. 15 0. 16	0. 03 0. 04
CR00338 4	3. 3 7	0. 8 8		0. 9 4		
CR00338 5	53. 94	9. 4 1	46. 3 2	10. 66		
CR00338 6	2. 7 1	0. 7 6		0. 7 7		
CR00338 7	1. 3 9	0. 1 5		0. 1 7		
CR00338 8	9. 3 3	4. 4 7		4. 5 6		
CR00338 9	31. 84	6. 0 9	27. 2 7	5. 9 6		
CR00339 0	24. 88	4. 9 6	22. 4 4	3. 4 1		
CR00339 1	48. 78	14. 41	48. 2 8	14. 44		
CR00339 2	14. 64	5. 2 5	14. 3 2	4. 9 5		
CR00529 8	42. 65	10. 94	21. 2 9	8. 1 6	21. 3 6	
CR00529 9	38. 61	5. 5 7	36. 3 2	3. 9 9		
CR00530 0	64. 34	9. 5 5	53. 2 0	6. 5 9	11. 1 5	
CR00530 1	37. 04	5. 3 2	33. 3 9	3. 8 5		
CR00530 2	33. 21	2. 1 9	30. 9 3	2. 4 3		
CR00530 3	21. 63	6. 0 5	20. 5 5	5. 8 0		
CR00530 4	62. 82	3. 2 8		1. 2 2	54. 7 5	

10

20

30

【表 10-5】

CR00530 5	13. 51	3. 5 8	12. 3 0	3. 4 9		
CR00530 6	24. 07	5. 2 4	21. 2 0	5. 0 3		
CR00530 7	22. 03	3. 8 6		1. 3 5	14. 3 3	

40

【0679】

表9は、初代ヒト肝細胞において、Spy Cas9タンパク質（RNP）を用いてエレクトロポレーションされた試験TTR dgRNAについての編集%、挿入（Ins）%、および欠失（Del）%についての平均および標準偏差を示す。

50

【表 11-1】

表9：dgRNAをロードしたSpy Cas9タンパク質を用いてエレクトロポレーションされた初代ヒト肝細胞におけるTTR編集データ

ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%	挿入%の平均	挿入%の標準偏差	欠失%の平均	欠失%の標準偏差
CR003335	72.20	4.53	69.70	4.36	2.50	0.30
CR003336	39.17	3.04	38.43	3.20	0.70	0.17
CR003337	54.27	2.70	53.23	3.05	1.30	0.26
CR003338	83.03	4.84	80.87	4.63	2.13	0.25
CR003339	43.00	2.66	8.93	1.86	34.07	1.72
CR003340	12.03	1.55	5.60	1.32	6.50	0.53
CR003341	11.43	0.71	7.03	0.50	4.40	1.21
CR003342	32.77	3.63	31.87	3.28	0.90	0.35
CR003343	77.10	2.21	75.63	2.01	1.50	0.36
CR003344	39.40	3.86	33.30	2.52	6.10	1.31
CR003345	48.07	6.24	34.53	2.95	13.57	3.74
CR003346	35.67	1.80	20.83	1.65	14.83	1.66
CR003347	82.30	5.93	81.97	5.98	0.43	0.15
CR003348	28.53	1.79	11.30	2.46	17.27	0.86
CR003349	4.10	0.17	2.33	0.46	1.87	0.25

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

CR00335 0	28. 1 3	3. 5 0	22. 40	2. 41	5. 73	1. 22
CR00335 1	51. 7 7	5. 1 1	30. 83	3. 32	20. 9 7	2. 43
CR00335 2	29. 8 3	4. 1 8	25. 63	3. 67	4. 30	0. 56
CR00335 3	84. 8 3	4. 6 8	82. 23	4. 05	2. 63	0. 74
CR00335 4	2. 50	0. 3 6	2. 4 3	0. 32	0. 03	0. 06
CR00335 5	12. 5 3	1. 5 4	10. 60	2. 36	1. 97	1. 17
CR00335 6	9. 97	2. 6 8	7. 8 0	2. 01	2. 23	0. 85
CR00335 7	36. 2 3	4. 0 2	35. 47	4. 11	0. 77	0. 61
CR00335 8	5. 70	1. 4 2	4. 9 3	1. 36	0. 80	0. 26
CR00335 9	63. 7 7	7. 0 7	56. 33	5. 81	7. 50	1. 35
CR00336 0	32. 2 3	3. 0 9	31. 67	2. 97	0. 63	0. 31
CR00336 1	4. 10	0. 3 6	3. 7 3	0. 42	0. 37	0. 06
CR00336 2	7. 03	1. 3 0	6. 8 7	1. 20	0. 20	0. 20
CR00336 3	9. 43	8. 2 2	7. 8 0	6. 86	1. 63	1. 44
CR00336 4	23. 3 0	5. 2 0	16. 93	4. 96	6. 53	0. 55
CR00336 5	42. 3 7	3. 8 8	35. 57	1. 88	6. 83	2. 00
CR00336 6	34. 7 0	3. 2 6	31. 63	2. 98	3. 10	1. 15
CR00336 7	39. 2 0	5. 3 1	22. 93	4. 14	16. 3 7	1. 46

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 3】

CR00336 8	28. 4 7	3. 2 9	27. 63	2. 90	0. 80	0. 66
CR00336 9	3. 67	1. 1 6	3. 3 0	1. 06	0. 40	0. 20
CR00337 0	15. 2 7	1. 7 5	14. 43	1. 72	0. 90	0. 20
CR00337 1	16. 2 0	2. 1 3	14. 47	2. 37	1. 87	0. 81
CR00337 2	12. 1 7	2. 6 9	10. 47	2. 63	1. 77	0. 12
CR00337 3	0. 87	0. 2 1	0. 8 3	0. 25	0. 07	0. 12
CR00337 4	0. 80	0. 1 7	0. 7 0	0. 26	0. 10	0. 10
CR00337 5	1. 33	1. 1 0	1. 2 7	1. 08	0. 07	0. 06
CR00337 6	1. 90	1. 0 6	1. 8 7	1. 00	0. 03	0. 06
CR00337 7	10. 2 3	1. 5 3	10. 13	1. 51	0. 10	0. 10
CR00337 8	4. 60	1. 9 2	3. 8 7	1. 19	0. 73	0. 67
CR00337 9	6. 57	1. 0 0	6. 3 0	0. 70	0. 27	0. 31
CR00338 0	5. 37	2. 5 7	5. 2 7	2. 54	0. 10	0. 10
CR00338 1	6. 20	2. 7 4	5. 8 3	2. 61	0. 50	0. 10
CR00338 2	8. 40	2. 0 7	8. 1 0	1. 87	0. 43	0. 21
CR00338 3	8. 57	0. 7 5	3. 3 7	0. 67	5. 27	0. 46
CR00338 4	1. 87	0. 6 7	1. 7 3	0. 57	0. 23	0. 12
CR00338 5	40. 8 7	6. 8 6	38. 43	6. 41	2. 53	0. 45

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 4】

CR00338 6	4.90	1.2 0	4.4 7	1.14	0.47	0.25
CR00338 7	1.87	0.2 5	1.7 0	0.26	0.20	0.10
CR00338 8	5.70	0.4 0	5.4 7	0.40	0.27	0.12
CR00338 9	27.6 7	2.7 6	27. 20	2.88	0.50	0.36
CR00339 0	15.9 7	3.8 6	15. 80	3.99	0.23	0.15
CR00339 1	29.7 7	3.8 5	29. 57	3.85	0.27	0.06
CR00339 2	4.13	1.2 1	4.0 0	1.15	0.17	0.06
CR00529 8	39.9 0	2.9 2	22. 37	3.04	17.5 7	0.42
CR00529 9	8.65	0.7 8	8.3 0	0.99	0.35	0.21
CR00530 0	57.4 7	1.6 9	53. 47	1.86	4.10	0.92
CR00530 1	25.3 7	1.6 5	24. 00	2.26	1.60	0.82
CR00530 2	61.1 0	5.2 0	60. 10	4.77	1.00	0.46
CR00530 3	53.5 7	8.5 2	53. 07	8.36	0.53	0.47
CR00530 4	67.0 0	5.8 0	5.5 3	1.37	61.6 3	6.98
CR00530 5	3.83	0.7 8	3.5 3	0.61	0.40	0.17
CR00530 6	9.43	1.6 3	8.0 7	2.17	1.37	0.72
CR00530 7	8.17	1.2 0	5.2 0	0.87	3.00	0.82

10

20

30

【0 6 8 0】

表 1 0 は、初代ヒト肝細胞において、S p y C a s 9 タンパク質（R N P）でトランスフェクトされた試験 T T R および対照 d g R N A についての編集 %、挿入（I n s）%、および欠失（D e l）% についての平均および標準偏差を示す。

40

50

【表 12-1】

表10：dgRNAをロードしたSpy Cas9でトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞におけるTTR編集データ

ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%	挿入%の平均	挿入%の標準偏差	欠失%の平均	欠失%の標準偏差
CR001261	32.51	1.00	12.50	0.47	20.01	0.59
CR001262	50.09	1.48	45.25	1.69	4.83	0.31
CR001263	15.25	2.41	14.83	2.37	0.42	0.10
CR001264	45.30	3.48	23.87	2.09	21.43	1.68
CR003335	51.14	4.27	49.51	4.04	1.63	0.25
CR003336	30.70	2.41	30.11	2.48	0.58	0.11
CR003337	49.43	4.75	47.54	4.49	1.88	0.47
CR003338	61.34	3.55	59.13	3.44	2.22	0.11
CR003339	45.06	9.83	8.85	1.65	36.21	8.34
CR003340	10.44	2.44	5.94	1.34	4.50	1.16
CR003341	19.66	3.67	14.64	3.31	5.02	0.37
CR003342	20.66	2.55	19.85	2.54	0.81	0.15
CR003343	43.25	4.47	41.61	4.26	1.63	0.33
CR003344	35.45	13.12	30.97	11.72	4.48	1.51
CR003345	28.90	6.33	21.00	5.23	7.91	1.81

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

CR00334 6	4. 1 1	1. 36	2. 2 7	0. 53	1. 84	0. 85
CR00334 7	66. 35	4. 48	66. 11	4. 51	0. 24	0. 08
CR00334 8	23. 18	2. 16	13. 74	1. 17	9. 44	0. 99
CR00334 9	10. 83	1. 57	9. 0 0	1. 41	1. 83	0. 32
CR00335 0	24. 84	2. 74	19. 77	1. 91	5. 07	0. 89
CR00335 1	40. 28	1. 31	23. 92	0. 70	16. 3 6	0. 78
CR00335 2	30. 48	1. 93	27. 27	2. 31	3. 21	0. 38
CR00335 3	61. 54	4. 13	59. 38	4. 04	2. 16	0. 11
CR00335 4	10. 31	1. 47	10. 07	1. 50	0. 23	0. 11
CR00335 5	19. 11	0. 92	17. 69	0. 79	1. 42	0. 44
CR00335 6	7. 5 3	1. 78	6. 2 4	1. 51	1. 29	0. 32
CR00335 7	49. 35	2. 53	48. 45	2. 54	0. 90	0. 13
CR00335 8	31. 62	5. 97	25. 95	5. 03	5. 67	1. 04
CR00335 9	59. 47	6. 05	50. 96	5. 69	8. 51	0. 54
CR00336 0	31. 47	4. 12	30. 27	4. 21	1. 19	0. 22
CR00336 1	13. 08	1. 48	12. 52	1. 45	0. 56	0. 18
CR00336 2	11. 65	1. 24	11. 10	1. 06	0. 56	0. 36
CR00336 3	27. 65	2. 84	21. 47	2. 39	6. 18	0. 61

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 3】

CR00336 4	35. 29	3. 50	23. 93	2. 63	11. 3 6	1. 16
CR00336 5	47. 78	3. 67	40. 24	3. 12	7. 54	0. 72
CR00336 6	42. 74	3. 41	37. 95	2. 88	4. 79	0. 60
CR00336 7	31. 19	4. 60	16. 06	2. 66	15. 1 3	1. 94
CR00336 8	34. 83	5. 05	33. 83	5. 09	1. 00	0. 10
CR00336 9	12. 98	0. 26	11. 67	0. 21	1. 31	0. 11
CR00337 0	20. 06	1. 79	18. 80	1. 65	1. 26	0. 28
CR00337 1	18. 80	2. 73	17. 23	2. 34	1. 57	0. 43
CR00337 2	17. 56	2. 26	15. 74	2. 16	1. 81	0. 10
CR00337 3	3. 6 4	0. 29	3. 4 4	0. 30	0. 19	0. 07
CR00337 4	2. 6 5	0. 33	2. 5 2	0. 33	0. 14	0. 02
CR00337 5	5. 0 4	0. 66	4. 9 3	0. 66	0. 11	0. 01
CR00337 6	5. 0 0	1. 10	4. 8 6	1. 10	0. 14	0. 03
CR00337 7	12. 77	2. 00	12. 45	1. 84	0. 31	0. 18
CR00337 8	8. 6 6	1. 90	8. 2 4	1. 74	0. 42	0. 19
CR00337 9	16. 86	2. 62	16. 51	2. 62	0. 34	0. 08
CR00338 0	8. 1 7	1. 42	7. 7 1	1. 47	0. 46	0. 10
CR00338 1	7. 1 5	0. 73	6. 8 8	0. 67	0. 27	0. 07

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 4】

CR00338 2	2. 4 4	0. 06	2. 2 8	0. 05	0. 15	0. 03
CR00338 3	4. 7 6	0. 40	4. 5 2	0. 42	0. 24	0. 09
CR00338 4	3. 5 6	0. 26	3. 3 9	0. 26	0. 17	0. 01
CR00338 5	41. 15	6. 06	38. 15	5. 59	3. 00	0. 48
CR00338 6	3. 2 2	0. 25	2. 9 7	0. 27	0. 25	0. 02
CR00338 7	1. 7 9	0. 11	1. 6 8	0. 09	0. 11	0. 04
CR00338 8	5. 4 3	1. 03	4. 3 8	1. 00	1. 05	0. 25
CR00338 9	19. 87	4. 39	19. 19	4. 52	0. 68	0. 24
CR00339 0	16. 09	2. 84	15. 85	2. 91	0. 24	0. 09
CR00339 1	34. 72	8. 29	34. 46	8. 35	0. 26	0. 06
CR00339 2	10. 07	1. 06	9. 9 3	1. 02	0. 14	0. 04
CR00529 8	32. 07	1. 02	21. 12	1. 02	10. 9 5	0. 15
CR00529 9	19. 37	0. 61	18. 79	0. 51	0. 58	0. 13
CR00530 0	57. 23	6. 24	53. 62	5. 44	3. 61	0. 87
CR00530 1	31. 37	3. 02	29. 53	2. 88	1. 84	0. 15
CR00530 2	48. 29	5. 22	47. 32	5. 32	0. 97	0. 14
CR00530 3	36. 45	4. 83	36. 06	4. 72	0. 39	0. 12
CR00530 4	49. 45	6. 85	4. 3 2	0. 31	45. 1 3	6. 74

10

20

30

【表 1 2 - 5】

CR00530 5	7. 0 7	1. 43	6. 7 3	1. 30	0. 34	0. 17
CR00530 6	18. 81	1. 82	16. 24	1. 57	2. 57	0. 35
CR00530 7	18. 73	1. 68	10. 18	0. 92	8. 55	0. 88

40

【0 6 8 1】

表 1 1 は、初代ヒト肝細胞において、S p y C a s 9 mRNA（配列番号 2）と共トランスフェクトされた試験 T T R および対照 d g RNA についての編集 %、挿入（I n s）%、および欠失（D e l）% についての平均および標準偏差を示す。

50

【表 13-1】

表11: Spy Cas9 mRNAおよびdgRNAでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞におけるTTR編集データ

ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%	挿入%の平均	挿入%の標準偏差	欠失%の平均	欠失%の標準偏差
CR001261	32.33	4.95	5.83	1.63	26.47	3.30
CR001262	41.50	4.71	34.43	3.31	7.13	1.42
CR001263	10.23	3.61	9.40	3.20	0.90	0.44
CR001264	42.80	0.50	11.90	1.32	30.90	1.80
CR003335	36.43	2.98	33.03	2.31	3.40	0.70
CR003336	16.93	3.78	16.20	3.41	0.80	0.44
CR003337	19.30	1.57	18.10	1.44	1.23	0.15
CR003338	36.30	9.55	33.73	9.27	2.73	0.49
CR003339	36.43	1.21	2.27	0.15	34.23	1.31
CR003340	24.97	2.78	1.83	0.23	23.17	2.66
CR003341	15.83	1.38	6.80	0.53	9.07	0.81
CR003342	22.10	1.27	20.60	0.57	1.50	0.71
CR003343	55.03	0.38	52.40	0.53	2.60	0.44
CR003344	31.50	1.30	22.40	1.31	9.20	0.10
CR003345	50.65	2.90	32.30	1.56	18.45	1.20

10

20

30

40

50

【表 13-2】

CR00334 6	19. 97	1.9 4	5.63	0.55	14.3 3	1.72
CR00334 7	41. 47	3.5 9	41.3 3	3.63	0.17	0.06
CR00334 8	18. 00	0.8 7	2.30	0.66	15.8 0	0.61
CR00334 9	2.5 7	0.8 1	0.90	0.35	1.70	0.46
CR00335 0	26. 63	4.2 5	16.3 3	2.45	10.3 3	1.75
CR00335 1	26. 50	1.6 1	10.2 0	0.92	16.3 7	0.97
CR00335 2	16. 80	5.0 3	11.7 3	3.86	5.07	1.14
CR00335 3	53. 73	6.0 1	49.5 0	5.82	4.43	0.75
CR00335 4	2.9 7	0.9 5	2.87	0.85	0.13	0.12
CR00335 5	12. 07	2.6 1	10.4 7	2.08	1.63	0.59
CR00335 6	7.2 7	0.7 2	4.70	0.53	2.67	0.21
CR00335 7	25. 93	4.5 5	25.3 0	4.22	0.63	0.35
CR00335 8	3.9 0	0.7 9	2.73	0.45	1.17	0.51
CR00335 9	32. 93	4.3 4	25.6 7	3.25	7.33	1.24
CR00336 0	14. 90	4.8 5	14.1 3	4.66	0.90	0.52
CR00336 1	3.5 3	0.6 0	2.73	0.55	0.87	0.15
CR00336 2	6.6 0	1.4 7	6.17	1.45	0.47	0.21
CR00336 3	16. 70	1.0 8	11.8 0	0.79	4.93	0.60

10

20

30

40

50

【表 13-3】

CR00336 4	15. 63	2.4 5	6.73	0.81	8.93	1.70
CR00336 5	26. 90	3.0 5	20.2 3	2.02	6.67	1.16
CR00336 6	24. 53	1.2 6	20.4 7	1.45	4.07	0.23
CR00336 7	37. 33	1.4 0	14.0 3	0.40	23.3 7	1.25
CR00336 8	11. 10	1.9 1	10.5 3	1.90	0.60	0.10
CR00336 9	1.6 0	0.4 6	0.90	0.20	0.70	0.36
CR00337 0	2.8 3	0.5 7	2.33	0.40	0.50	0.17
CR00337 1	3.4 0	0.8 0	2.67	0.75	0.73	0.15
CR00337 2	1.7 7	0.7 5	1.13	0.57	0.63	0.23
CR00337 3	1.4 0	0.3 6	1.00	0.35	0.37	0.12
CR00337 4	0.2 7	0.2 1	0.27	0.21	0.03	0.06
CR00337 5	1.2 7	0.6 4	1.23	0.58	0.03	0.06
CR00337 6	2.8 3	0.8 1	2.73	0.81	0.13	0.06
CR00337 7	17. 53	6.3 5	16.9 7	6.11	0.57	0.25
CR00337 8	9.8 0	1.3 7	8.50	1.21	1.37	0.15
CR00337 9	13. 20	1.1 8	12.0 0	1.05	1.27	0.15
CR00338 0	2.9 3	0.5 8	2.47	0.57	0.47	0.15
CR00338 1	4.0 7	1.2 1	3.33	0.96	0.73	0.25

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 4】

CR00338 2	0.9 7	0.2 5				
CR00338 3	15. 70	3.2 2	0.97 2	0.25 0	0.00 0	0.00 2.82
CR00338 4	1.7 0	0.6 2	1.50 3	0.56 0	0.20 3.60	0.10 0.26
CR00338 5	36. 77	0.7 0	33.2 3	0.74 0	0.13 0	0.06 0.06
CR00338 6	8.2 7	1.6 3	8.20 7	1.57 0	0.13 0	0.06 0.06
CR00338 7	7.8 7	1.5 8	7.80 7	1.64 0	0.03 0	0.06 0.25
CR00338 8	12. 97	1.3 0	11.8 7	1.21 0	1.17 0	0.25 0.15
CR00338 9	44. 27	1.7 2	41.4 7	1.59 0	2.83 0	0.15 0.17
CR00339 0	20. 23	2.0 8	18.7 3	1.92 0	1.60 0	0.17 0.10
CR00339 1	15. 47	5.8 7	15.2 0	5.72 0	0.30 0	0.10 0.06
CR00339 2	2.4 3	0.5 5	2.37 7	0.59 0	0.07 0	0.06 0.00
CR00529 8	15. 70	2.7 9	4.13 0	0.87 0	11.6 0	2.00 0.00
CR00529 9	9.4 3	0.6 8	8.93 0	0.68 0	0.60 0	0.00 0.76
CR00530 0	31. 53	3.4 4	27.6 0	2.77 0	3.97 0	0.76 0.61
CR00530 1	6.7 7	1.4 4	5.47 0	0.96 0	1.40 0	0.61 0.21
CR00530 2	34. 80	7.1 7	33.6 7	7.01 0	1.13 0	0.21 0.10
CR00530 3	35. 50	5.9 0	35.0 0	5.81 0	0.50 0	0.10 0.10
CR00530 4	45. 27	4.7 1	0.83 0	0.15 0	44.4 7	4.57 0.00

10

20

30

【表 1 3 - 5】

CR00530 5	7.5 3	1.0 6				
CR00530 6	9.9 7	0.3 8	5.93 7	1.10 0	1.60 2.87	0.10 0.12
CR00530 7	12. 90	2.4 3	3.67 0	0.61 0	9.30 1.80	

40

【0 6 8 2】

表 1 2 は、初代カニクイザル肝細胞において、S p y C a s 9 タンパク質 (R N P) を用いてエレクトロポレーションされた試験 T T R d g R N A についての編集 %、挿入 (I n s) %、および欠失 (D e l) % についての平均および標準偏差を示す。

50

【表 14-1】

表12：Spy Cas9タンパク質およびd gRNAを用いてエレクトロポレーションされた初代カニクイザル肝細胞におけるTTR編集データ

ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%	挿入%の平均	挿入%の標準偏差	欠失%の平均	欠失%の標準偏差
CR003336	8.18	1.93	8.10	1.94	0.07	0.01
CR003337	24.94	5.80	24.10	4.71	0.84	1.10
CR003338	44.94	9.99	44.89	9.97	0.05	0.01
CR003339	8.95	0.89	4.93	0.64	4.02	0.25
CR003340	12.53	2.22	7.72	0.13	4.80	2.09
CR003341	8.43	10.53	7.66	9.91	0.77	0.63
CR003344	35.72	4.67	33.81	5.29	1.91	0.61
CR003345	52.92	3.26	30.74	0.78	22.19	2.48
CR003346	1.91	0.86	1.82	0.82	0.09	0.04
CR003347	72.41	0.38	72.15	0.73	0.25	0.34
CR003352	1.25	0.20	1.16	0.21	0.09	0.01
CR003353	4.75	0.43	4.67	0.47	0.08	0.04
CR003358	20.47	0.30	19.01	0.51	1.46	0.21
CR003359	46.17	1.14	40.66	2.00	5.51	0.86
CR003360	29.47	0.63	29.05	1.00	0.42	0.37

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

CR0033 61	4. 5 3	0. 14	4. 46	0. 18	0. 08	0. 04
CR0033 62	4. 5 9	0. 80	4. 36	0. 77	0. 22	0. 03
CR0033 63	15. 64	1. 92	13. 2 4	2. 65	2. 39	0. 73
CR0033 64	19. 62	2. 54	14. 2 7	2. 72	5. 35	0. 17
CR0033 65	10. 31	1. 81	9. 33	1. 80	0. 97	0. 01
CR0033 66	18. 52	0. 71	17. 6 2	0. 33	0. 90	0. 39
CR0033 68	18. 56	3. 89	18. 3 0	3. 77	0. 26	0. 11
CR0033 69	1. 5 3	0. 25	1. 28	0. 40	0. 25	0. 15
CR0033 70	2. 5 2	0. 64	2. 40	0. 63	0. 12	0. 01
CR0033 71	1. 8 3	0. 38	1. 69	0. 41	0. 14	0. 03
CR0033 72	2. 1 5	0. 30	1. 83	0. 33	0. 32	0. 04
CR0033 82	10. 86	2. 04	8. 54	1. 93	2. 33	0. 11
CR0033 83	8. 8 6	2. 30	4. 31	0. 69	4. 55	1. 61
CR0033 84	3. 7 5	0. 35	2. 50	0. 37	1. 25	0. 02
CR0033 85	30. 96	1. 61	26. 8 4	2. 20	4. 12	0. 59
CR0033 86	5. 5 4	1. 42	3. 51	1. 26	2. 03	0. 15
CR0033 87	4. 7 2	0. 03	4. 55	0. 08	0. 17	0. 11
CR0033 88	6. 8 1	0. 17	6. 59	0. 28	0. 22	0. 11

10

20

30

【表 1 4 - 3】

CR0033 89	18. 83	4. 99	18. 0 5	4. 92	0. 78	0. 07
CR0033 90	16. 87	3. 88	16. 4 9	3. 48	0. 39	0. 39
CR0033 91	36. 44	1. 09	35. 7 3	1. 37	0. 71	0. 28
CR0033 92	7. 0 2	0. 97	6. 63	0. 59	0. 38	0. 37
CR0052 99	13. 48	2. 96	13. 2 3	2. 74	0. 26	0. 22
CR0053 01	46. 76	1. 75	46. 3 4	2. 19	0. 42	0. 44
CR0053 02	1. 3 4	0. 19	1. 26	0. 19	0. 08	0. 00
CR0053 03	59. 28	1. 05	58. 7 2	1. 06	0. 56	0. 00
CR0053 05	11. 28	0. 39	11. 1 3	0. 39	0. 15	0. 00
CR0053 07	4. 5 6	0. 71	2. 01	0. 49	2. 55	0. 21

40

50

【0683】

表13は、初代カニクイザル肝細胞において、Spy Cas9タンパク質（RNP）を用いてエレクトロポレーションされた試験カニクイザル特異的TTR dgRNAについての編集%、挿入（Ins）%、および欠失（Del）%についての平均および標準偏差を示す。

【表15】

表13：Spy Cas9タンパク質およびカニクイザル特異的dgRNAを用いてエレクトロポレーションされた初代カニクイザル肝細胞におけるTTR編集データ

ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%	挿入%の平均	挿入%の標準偏差	欠失%の平均	欠失%の標準偏差
CR000689	24.41	1.67	18.11	2.41	6.30	0.93
CR005364	27.70	0.74	0.58	0.29	27.11	0.60
CR005365	64.94	2.03	0.10	0.04	64.85	2.05
CR005366	77.00	1.17	0.33	0.27	76.67	0.99
CR005367	50.79	0.53	0.53	0.25	50.26	0.36
CR005368	27.60	2.07	0.33	0.45	27.27	2.32
CR005369	42.01	0.33	8.09	0.55	33.92	0.31
CR005370	63.52	3.21	0.59	0.33	62.93	2.88
CR005371	8.42	0.69	0.31	0.12	8.10	0.57
CR005372	17.98	1.39	0.83	0.77	17.16	0.71

【0684】

実施例3．sgRNA配列のスクリーニング

複数の細胞型におけるTTR sgRNAの交差スクリーニング

ヒトおよび／またはカニクイザルTTRを標的とする修飾sgRNA形式のガイドを、実施例1に記載されるように初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞に送達した。各細胞型にわたって、各ガイド配列を含むcrRNAについて編集率を決定し、次いで、ガイド配列を最高編集%に基づいてランク付けした。すべての細胞株において、表2のガイド配列のスクリーニングデータを以下に列挙する（表14～16）。

【0685】

表14は、初代ヒト肝細胞において、Spy Cas9タンパク質（RNP）でトランスフェクトされた試験TTR sgRNAについての編集%、挿入（Ins）%、および欠失（Del）%についての平均および標準偏差を示す。

10

20

30

40

50

【表 16-1】

表14: Spy Cas9タンパク質およびsgRNAでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞におけるTTR編集データ

ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%	挿入%の平均	挿入%の標準偏差	欠失%の平均	欠失%の標準偏差
G000480	81.80	1.98	77.15	2.19	4.70	0.28
G000481	46.90	1.71	27.77	3.88	19.43	4.76
G000482	66.67	2.35	56.57	4.14	10.10	1.85
G000483	47.90	6.56	19.57	3.37	28.50	3.25
G000484	62.97	0.90	29.23	0.21	33.83	0.95
G000485	56.07	3.37	53.07	2.84	3.13	0.60
G000486	69.73	6.86	9.83	1.93	59.93	5.63
G000487	67.30	2.75	65.27	3.41	2.07	1.06
G000488	61.27	1.95	26.30	1.55	35.00	1.30
G000489	60.17	2.75	51.07	3.18	9.43	0.45
G000490	55.90	7.88	46.13	7.55	9.80	0.69
G000491	74.30	1.55	70.27	2.37	4.33	0.72
G000492	60.97	5.81	57.90	4.64	3.13	1.35
G000493	41.40	3.08	38.90	3.29	2.67	0.35
G000494	62.23	3.30	61.47	3.25	0.77	0.31

【表 16-2】

G000495	50.80	1.85	45.80	1.25	5.37	0.64
G000496	72.33	1.63	44.73	2.14	27.67	1.46
G000497	59.67	1.40	51.10	1.14	8.73	0.71
G000498	72.80	3.75	60.17	3.12	12.70	0.72
G000499	66.40	3.55	65.23	3.72	1.17	0.38
G000500	65.53	1.21	62.00	1.11	3.83	0.40
G000501	60.93	1.91	55.13	1.43	6.00	0.56

【0686】

表15は、初代ヒト肝細胞において、Spy Cas9 mRNA（配列番号2）と共トランスフェクトされた試験TTR sgRNAについての編集%、挿入（Ins）%、および欠失（Del）%についての12.5nMでの平均および標準偏差を示す。

10

20

30

40

50

【表 17-1】

表15: Spy Cas9 mRNAおよびsgRNAでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞におけるTTR編集データ

ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%	挿入%の平均	挿入%の標準偏差	欠失%の平均	欠失%の標準偏差
G000480	73. 28	0.61	59. 85	0.13	13.4 7	0.51
G000481	34. 30	5.26	14. 62	2.59	19.7 7	2.72
G000482	40. 93	3.95	27. 70	2.92	13.2 5	0.97
G000483	27. 82	2.93	4.0 5	0.51	23.8 5	2.43
G000484	43. 37	6.79	13. 98	2.61	29.4 8	4.15
G000485	30. 82	5.76	28. 87	5.50	1.97	0.28
G000486	59. 13	5.62	2.8 2	0.86	56.3 7	4.92
G000487	49. 57	0.99	47. 38	0.89	2.27	0.24
G000488	49. 40	5.05	11. 98	1.40	37.4 8	3.68
G000489	24. 25	2.82	14. 17	2.01	10.2 8	1.38
G000490	24. 72	2.35	19. 38	2.04	5.38	0.41
G000491	45. 93	1.22	42. 42	1.06	3.60	0.33
G000492	34. 65	2.21	32. 45	2.01	2.22	0.25
G000493	11. 55	1.35	10. 65	1.58	0.97	0.30
G000494	26. 22	4.03	25. 17	3.89	1.07	0.15

10

20

30

40

50

【表 17-2】

G0000495	47. 77	1.88	43. 40	1.91	4.45	0.17
G0000496	63. 30	2.60	11. 08	2.10	52.2 5	0.67
G0000497	40. 33	3.32	34. 48	2.71	5.85	0.61
G0000498	60. 02	5.42	45. 20	4.34	14.9 0	1.08
G0000499	39. 30	6.04	38. 58	5.86	0.77	0.12
G0000500	35. 50	0.61	32. 47	0.49	3.10	0.18
G0000501	40. 32	1.50	33. 82	2.04	6.62	0.55
G0000567	27. 28	7.59	17. 35	4.72	10.0 2	2.94
G0000568	43. 75	5.83	43. 00	5.81	0.80	0.18
G0000570	68. 42	3.64	68. 08	3.61	0.35	0.00
G0000571	20. 47	3.41	14. 47	2.72	6.13	0.78
G0000572	55. 42	8.13	41. 62	6.48	13.8 5	1.60

10

20

【0687】

表 16 は、初代カニクイザル肝細胞において、S p y C a s 9 タンパク質（RNP）を用いてエレクトロポレーションされた試験 T T R s g R N A についての編集%、挿入（I n s）%、および欠失（D e l）%についての平均および標準偏差を示す。なお、ガイド G 0 0 0 4 8 0 および G 0 0 0 4 8 8 は、カニクイザル細胞に 1 つのミスマッチを有し、カニクイザル細胞における編集効率を損なう可能性がある。

30

40

50

【表 18】

表 16 : S p y C a s 9 タンパク質および s g R N A を用いてエレクトロポレーションされた初代カニクイザル肝細胞における T T R 編集データ

ガイド ID	編集平均%	編集標準偏差%	挿入%の平均	挿入%の標準偏差	欠失%の平均	欠失%の標準偏差
G 0 0 0 4 8 0	10.20	0.56	9.83	0.81	0.37	0.25
G 0 0 0 4 8 1	69.13	8.62	33.73	2.67	35.50	11.23
G 0 0 0 4 8 2	75.17	2.34	55.23	2.00	20.03	0.85
G 0 0 0 4 8 5	22.93	0.95	22.00	0.82	1.07	0.21
G 0 0 0 4 8 6	79.90	0.79	11.90	0.85	68.07	0.35
G 0 0 0 4 8 8	9.63	0.50	5.37	0.38	4.27	0.35
G 0 0 0 4 8 9	67.53	1.15	53.53	1.56	14.17	0.64
G 0 0 0 4 9 0	61.67	0.72	54.47	1.10	7.27	1.23
G 0 0 0 4 9 1	66.20	1.11	64.37	0.47	1.90	0.70
G 0 0 0 4 9 3	50.13	0.74	48.07	1.69	2.10	0.98
G 0 0 0 4 9 4	81.53	0.71	79.57	0.49	2.07	0.67
G 0 0 0 4 9 8	91.37	1.48	68.50	1.64	22.87	1.50
G 0 0 0 4 9 9	83.40	0.36	82.00	0.20	1.43	0.55
G 0 0 0 5 0 0	45.20	3.66	42.60	3.80	2.63	0.25

【0688】

表 17 は、初代カニクイザル肝細胞において、S p y C a s 9 タンパク質（R N P）を用いてエレクトロポレーションされた試験カニクイザル特異的 T T R s g R N A についての編集%、挿入（I n s）%、および欠失（D e l）%についての平均および標準偏差を示す。

10

20

30

40

50

【表 19】

表17: Spy Cas9タンパク質およびカニクイザル特異的sgRNA（例えば、類似のヒトsgRNAを有するもの、表3を参照されたい）を用いてエレクトロポレーションされた初代カニクイザル肝細胞におけるTTR編集データ

ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%	挿入%の平均	挿入%の標準偏差	欠失%の平均	欠失%の標準偏差
G000502	95.10	0.96	13.97	1.69	81.27	2.60
G000503	58.53	2.40	52.07	1.68	6.50	2.46
G000504	77.17	0.96	69.73	1.29	7.53	0.57
G000505	95.53	1.06	95.50	1.01	0.10	0.10
G000506	89.43	1.36	86.90	1.64	3.07	0.42
G000507	71.17	3.22	67.03	2.39	4.60	1.65
G000508	45.63	3.01	41.57	2.95	4.17	0.91
G000509	93.03	0.81	43.60	1.30	49.73	1.76
G000510	90.80	0.53	89.13	0.40	1.77	0.12
G000511	62.77	1.63	60.87	1.55	2.00	0.35

10

20

【0689】

実施例4. Spy Cas9 mRNAおよびsgRNAを含有する脂質ナノ粒子（LNP）製剤のスクリーニング

初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞における、Spy Cas9 mRNAを有するLNP製剤化TTR sgRNAの交差スクリーニング。

【0690】

用量応答曲線において、初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞に対して、ヒトTTRを標的とする修飾sgRNAおよびカニクイザル適合sgRNA配列の脂質ナノ粒子製剤を試験した。初代ヒトおよびカニクイザル肝細胞を、実施例1に記載されるようにプレATINGした。LNPで処理する前に、両方の細胞株を37℃、5%CO₂で24時間インキュベートした。表18～21に詳述される実験で使用されるLNPは、それぞれが脂質を有する指定されたsgRNAおよびCas9 mRNA（配列番号2）を含有するNanoassembler（商標）手順を使用して調製した。LNPは、それぞれ、の脂質A、コレステロール、DSPC、およびPEG2k-DMGを45:44:9:2のモル比で含有し、N:P比は4.5であった。LNPを、6%カニクイザル血清を含有する肝細胞維持培地中、37℃で5分間インキュベートした。インキュベーション後、LNPを、100ngのmRNAで始まる8点の2倍用量応答曲線において、初代ヒトまたはカニクイザル肝細胞に添加した。細胞を、実施例1に記載されるようにNGS分析のために処理後72時間かけて溶解させた。各細胞型にわたって、各ガイド配列を含むcrRNAについて編集率を決定し、次いで、ガイド配列を、12.5ngのmRNAインプットおよび3.9nMのガイド濃度で最高編集%に基づいてランク付けした。両方の細胞株におけるガイド配列の用量応答曲線データを図4～図7に示す。12.5ngのmRNAインプットおよび3.9nMのガイド濃度での編集%を以下に列挙する（表16～18）。

30

40

【0691】

表18は、用量応答曲線として初代ヒト肝細胞に対して、Spy Cas9 mRNAを含む脂質ナノ粒子において製剤化された試験TTR sgRNAについての編集%、挿入（Ins）%、および欠失（Del）%についての12.5ngのcas9 mRNAで

50

の平均および標準偏差を示す。G 0 0 0 5 7 0 は、実験のアーチファクトである可能性がある他の s g R N A と比較して、特徴的ではない用量応答曲線を示した。データを図 4 にグラフによって示す。

【表 2 0】

表 1 8 : L N P 製剤化 S p y C a s 9 m R N A (配列番号 2) および s g R N A で処理された初代ヒト肝細胞における T T R 編集データ

ガイド ID	1 2 . 5 n g の mRNA、3 . 9 n M の s g R N A 編集%の平均	編集%の標準偏差
G 0 0 0 4 8 0	5 9 . 3 3	0 . 7 3
G 0 0 0 4 8 1	2 4 . 3 7	0 . 3 7
G 0 0 0 4 8 2	1 9 . 1 0	2 . 6 4
G 0 0 0 4 8 3	7 . 3 7	0 . 6 7
G 0 0 0 4 8 4	1 6 . 6 7	1 . 2 3
G 0 0 0 4 8 5	1 4 . 2 3	2 . 3 6
G 0 0 0 4 8 6	6 1 . 3 3	2 . 5 9
G 0 0 0 4 8 7	1 7 . 3 7	0 . 9 5
G 0 0 0 4 8 8	4 4 . 8 0	3 . 0 0
G 0 0 0 4 8 9	1 6 . 8 5	0 . 0 6
G 0 0 0 4 9 0	1 0 . 5 3	1 . 9 0
G 0 0 0 4 9 1	3 1 . 6 0	2 . 3 3
G 0 0 0 4 9 2	1 5 . 8 7	0 . 4 4
G 0 0 0 4 9 3	7 . 3 3	0 . 7 3
G 0 0 0 4 9 4	6 . 3 7	1 . 0 7
G 0 0 0 4 9 5	2 3 . 9 7	1 . 6 6
G 0 0 0 4 9 6	3 0 . 7 3	3 . 7 6
G 0 0 0 4 9 7	1 5 . 1 0	3 . 3 0
G 0 0 0 4 9 8	2 4 . 4 3	1 . 3 0
G 0 0 0 4 9 9	1 6 . 0 7	1 . 6 7
G 0 0 0 5 0 0	2 3 . 5 7	2 . 4 4
G 0 0 0 5 0 1	3 2 . 3 0	2 . 4 9
G 0 0 0 5 6 7	4 8 . 9 5	1 . 0 6
G 0 0 0 5 6 8	5 4 . 6 0	3 . 6 8
G 0 0 0 5 7 0	8 8 . 3 0	1 . 8 4
G 0 0 0 5 7 2	5 5 . 4 5	1 . 2 0

【0 6 9 2】

表 1 9 は、用量応答曲線として初代カニクイザル肝細胞に対して、S p y C a s 9 m R N A を含む脂質ナノ粒子において製剤化された試験 T T R s g R N A についての編集%、挿入 (I n s) %、および欠失 (D e l) % についての 1 2 . 5 n g の mRNA および 3 . 9 n M のガイド濃度での平均および標準偏差を示す。データを図 5 にグラフによって示す。

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表19：LNP製剤化Spy Cas9 mRNA（配列番号2）およびsgRNAで処理された初代カニクイザル肝細胞におけるTTR編集データ

ガイドID	12.5 ngのmRNA、3.9 nMのsgRNA、編集%の平均	編集%の標準偏差
G000480	0.73	0.15
G000481	49.20	1.39
G000482	26.13	5.33
G000483	0.73	0.60
G000484	0.10	0.00
G000485	1.43	1.02
G000489	31.87	2.40
G000490	15.23	1.08
G000491	6.37	0.38
G000492	0.70	0.28
G000493	7.63	1.14
G000494	14.30	1.06
G000495	0.73	0.06
G000497	0.23	0.06
G000498	37.90	1.42
G000499	14.63	0.70
G000500	10.47	0.32
G000501	1.37	0.31
G000567	0.10	0.00
G000568	9.25	0.21
G000570	17.30	0.85
G000571	20.20	2.26
G000572	30.60	0.42

10

20

【0693】

表20は、用量応答曲線として初代カニクイザル肝細胞に対して、Spy Cas9 mRNAを含む脂質ナノ粒子において製剤化された試験カニクイザル特異的TTR sgRNAについての編集%、挿入（Ins）%、および欠失（Del）%についての12.5 ngのmRNAおよび3.9 nMのガイド濃度での平均および標準偏差を示す。データを図6にグラフによって示す。

30

【表 2 2】

表20：LNP製剤化Spy Cas9 mRNA（配列番号2）およびカニクイザル適合sgRNAで処理された初代カニクイザル肝細胞におけるTTR編集データ

ガイドID	12.5 ngのmRNA、3.9 nMのsgRNA 編集%	編集%の標準偏差
G000502	80.70	0.14
G000506	60.13	0.70
G000509	74.47	7.28
G000510	61.87	2.54

40

【0694】

初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞における、Spy Cas9 mRNAを有するLNP製剤化TTR sgRNAの交差スクリーニング

用量応答曲線において、初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞に対して、ヒト

50

T T Rを標的とする修飾 s g R N Aおよびカニクイザル適合 s g R N A配列の脂質ナノ粒子製剤を試験した。初代ヒトおよびカニクイザル肝細胞を、実施例 1 に記載されるようにプレートイングした。L N Pで処理する前に、両方の細胞株を 3 7℃、5 % C O₂ で 2 4 時間インキュベートした。表 2 0～2 2 に詳述される実験で使用する L N Pを、上述のクロスフロー手順を使用して調製したが、P D-1 0 カラム (G E H e a l t h c a r e L i f e S c i e n c e s) を使用して精製し、それぞれが特定の s g R N Aおよび C a s 9 m R N A (配列番号 1) を含有する A m i c o n 遠心フィルタユニット (M i l l i p o r e S i g m a) を使用して濃縮した。L N Pは、それぞれ、脂質 A、コレステロール、D S P C、および P E G 2 k-D M G を 5 0 : 3 8 : 9 : 3 のモル比で含有し、N : P 比は 6 . 0 であった。L N Pを、6 % カニクイザル血清を含有する肝細胞維持培地中、3 7℃、5 % C O₂ で 5 分間インキュベートした。インキュベーション後、L N Pを、3 0 0 n g の m R N A で始まる 8 点の 3 倍用量応答曲線において、初代ヒトまたはカニクイザル肝細胞に添加した。細胞を、実施例 1 に記載されるように N G S 分析のために処理後 7 2 時間かけて溶解させた。各細胞型にわたって、各ガイド配列を含む c r R N A について編集率を決定し、次いで、ガイド配列を E C 5 0 値および最高編集 % に基づいてランク付けした。両方の細胞株におけるガイド配列の用量応答曲線データを図 4～図 7 に示す。E C 5 0 値および最大編集パーセントを以下に列挙する (表 1 9～2 2) 。

【 0 6 9 5 】

表 2 1 は、用量応答曲線として初代ヒト肝細胞に対して、U 枯渴した S p y C a s 9 m R N A を含む脂質ナノ粒子において製剤化された試験ヒト特異的 T T R s g R N A の E C 5 0 および最大編集を示す。データを図 4 にグラフによって示す。

【表 2 3】

表 2 1 : L N P 製剤化 S p y C a s 9 m R N A およびヒト特異的 s g R N A で処理された初代ヒト肝細胞における T T R 編集データ

ガイド ID	E C 5 0	最大編集
G 0 0 0 4 8 0	0 . 1 0	9 8 . 6 9
G 0 0 0 4 8 1	1 . 4 3	8 7 . 0 5
G 0 0 0 4 8 2	0 . 6 5	9 7 . 0 2
G 0 0 0 4 8 3	1 . 8 8	7 7 . 3 9
G 0 0 0 4 8 4	0 . 9 5	9 4 . 1 4
G 0 0 0 4 8 8	0 . 7 2	9 5 . 8 3
G 0 0 0 4 8 9	1 . 3 8	8 6 . 3 3
G 0 0 0 4 9 0	1 . 5 2	9 4 . 1 6
G 0 0 0 4 9 3	2 . 4 2	6 3 . 9 5
G 0 0 0 4 9 4	1 . 2 8	7 5 . 7 0
G 0 0 0 4 9 9	0 . 6 3	9 6 . 3 1
G 0 0 0 5 0 0	0 . 3 9	8 8 . 7 0
G 0 0 0 5 6 8	0 . 7 8	9 5 . 7 2
G 0 0 0 5 7 0	0 . 2 3	9 8 . 2 2
G 0 0 0 5 7 1	2 . 2 1	7 1 . 2 8
G 0 0 0 5 7 2	0 . 4 2	9 7 . 9 4

【 0 6 9 6 】

表 2 2 は、用量応答曲線として初代カニクイザル肝細胞に対して、U 枯渴した S p y C a s 9 m R N A を含む脂質ナノ粒子において製剤化された試験ヒト特異的 T T R s g R N A の E C 5 0 および最大編集を示す。データを図 1 6 にグラフによって示す。

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 2 2 : LNP 製剤化 S p y C a s 9 mRNA および ヒト 特異的 s g R N A で 処理 された 初代 カニクイザル 肝細胞 における T T R 編集 データ

ガイド ID	EC 5 0	最大編集
G 0 0 0 4 8 0	5. 2 8	2 0. 3 2
G 0 0 0 4 8 1	0. 9 3	9 5. 0 7
G 0 0 0 4 8 2	0. 8 9	9 7. 4 7
G 0 0 0 4 8 3	4. 4 0	5 6. 5 2
G 0 0 0 4 8 4	3. 4 7	0. 2 2
G 0 0 0 4 8 8	1 1. 5 6	2 1. 6 3
G 0 0 0 4 8 9	1. 7 9	8 9. 2 1
G 0 0 0 4 9 0	3. 0 9	9 0. 7 6
G 0 0 0 4 9 3	4. 9 7	6 1. 1 5
G 0 0 0 4 9 4	2. 7 7	6 0. 8 4
G 0 0 0 4 9 9	2. 0 0	7 4. 9 4
G 0 0 0 5 0 0	4. 4 2	5 8. 0 4
G 0 0 0 5 6 7	1. 7 6	9 7. 0 6
G 0 0 0 5 6 8	1. 8 7	8 7. 9 3
G 0 0 0 5 7 0	2. 0 0	9 6. 7 3
G 0 0 0 5 7 1	1. 5 5	9 7. 0 3
G 0 0 0 5 7 2	0. 7 9	1 0 0. 3 1

10

【 0 6 9 7】

表 2 3 は、用量 応答 曲線 として 初代 ヒト 肝細胞 に対して、U 枯 渴 した S p y C a s 9 mRNA を 含む 脂質 ナノ 粒子 において 製剤 化 された 試験 カニクイザル 適合 T T R s g R N A の EC 5 0 および 最大 編集 を 示す。データを 図 1 7 に グラフ によって 示す。

【表 2 5】

表 2 3 : LNP 製剤 化 S p y C a s 9 mRNA および カニクイザル 特異的 s g R N A で 処理 された 初代 ヒト 肝細胞 における T T R 編集 データ

ガイド ID	EC 5 0	最大編集
G 0 0 0 5 0 2	0. 7 0	9 1. 5 0
G 0 0 0 5 0 4	5. 1 6	7. 1 6
G 0 0 0 5 0 5	3. 5 7	1 3. 4 8
G 0 0 0 5 0 6	1. 2 6	8 9. 4 9

30

【 0 6 9 8】

表 2 4 は、用量 応答 曲線 として 初代 カニクイザル 肝細胞 に対して、U 枯 渴 した S p y C a s 9 mRNA を 含む 脂質 ナノ 粒子 において 製剤 化 された 試験 カニクイザル 適合 T T R s g R N A の EC 5 0 および 最大 編集 を 示す。データを 図 1 8 に グラフ によって 示す。

【表 2 6】

表 2 4 : LNP 製剤 化 S p y C a s 9 mRNA および カニクイザル 特異的 s g R N A で 処理 された 初代 カニクイザル 肝細胞 における T T R 編集 データ

ガイド ID	EC 5 0	最大編集
G 0 0 0 5 0 2	0. 2 6	1 0 0. 0 5
G 0 0 0 5 0 3	2. 2 6	8 3. 4 1
G 0 0 0 5 0 4	1. 4 2	9 8. 0 4
G 0 0 0 5 0 5	1. 1 0	9 9. 9 7
G 0 0 0 5 0 6	0. 6 6	9 9. 1 8

40

【 0 6 9 9】

実施例 5 . T T R d g R N A および s g R N A の オフ ター ゲット 分析

50

TTRガイドのオフターゲット分析

オリゴ挿入に基づくアッセイ（例えば、Tsai et al., Nature Biotechnology. 33、187–197、2015を参照）を使用して、TTRを標的とするCas9によって切断される潜在的なオフターゲットゲノム部位を決定した。表1の45種類のdgRNA（および既知のオフターゲットプロファイルを有する2種類の対照ガイド）を、HEK293_Cas9細胞においてスクリーニングした。SpyCas9を構成的に発現するヒト胚性腎臓腺癌細胞株HEK293（「HEK293_Cas9」）を、10%のウシ胎児血清および500 µg/mlのG418を追加したDMEM培地中で培養した。細胞を、30,000細胞/ウェルの密度で、96ウェルプレート中、24時間プレATINGした後、トランスフェクションを行った。製造元のプロトコルに従って、細胞を、Lipofectamine RNAiMAX（ThermoFisher、カタログ番号13778150）でトランスフェクトした。細胞を、個々のcrRNA（15 nM）、trRNA（15 nM）、およびLipofectamine RNAiMAX（0.3 µL/ウェル）を含むドナーオリゴ（10 nM）、およびOptiMemを含むリポプレックスによってトランスフェクトした。細胞をトランスフェクションの24時間後に溶解し、ゲノムDNAを、製造者の推奨プロトコルに従って、ZymoのQuick gDNA 96 Extractionキット（カタログ番号D3012）を使用して抽出した。gDNAを、Qubit High Sensitivity dsDNAキット（Life Technologies）を使用して定量化した。ライブラリーは、わずかな修正を加えつつ、Tsai et al., 2015に既に記載されている方法に従って調製した。IlluminaのMiSeq and HiSeq 2500でシーケンシングを実施した。このアッセイは、図2にプロットされるcrRNAのいくつかについての潜在的なオフターゲット部位を特定した。

【0700】

表25は、二本鎖DNAオリゴドナー配列とともにTTR dgRNAでトランスフェクトされたHeK Cas9細胞において検出されたオフターゲット組み込み部位の数を示す。

10

20

30

40

50

【表 2 7 - 1】

表 2 5 : オリゴ挿入に基づくアッセイを介して T T R d g R N A について検出されたオ
フターゲット組み込み部位の数

ガイド I D	部位数
C R 0 0 3 3 3 5	0
C R 0 0 3 3 3 6	2
C R 0 0 3 3 3 7	1 0
C R 0 0 3 3 3 8	2
C R 0 0 3 3 3 9	3
C R 0 0 3 3 4 0	0
C R 0 0 3 3 4 2	0
C R 0 0 3 3 4 3	2
C R 0 0 3 3 4 4	0
C R 0 0 3 3 4 5	0
C R 0 0 3 3 4 6	0
C R 0 0 3 3 4 7	1
C R 0 0 3 3 4 8	3
C R 0 0 3 3 5 1	1
C R 0 0 3 3 5 2	2

10

20

30

40

50

【表 2 7 - 2】

CR00 3353	2
CR00 3355	1
CR00 3356	4
CR00 3357	3
CR00 3359	6
CR00 3360	0
CR00 3363	4
CR00 3365	3
CR00 3366	1
CR00 3367	1
CR00 3368	2
CR00 3369	2
CR00 3377	0
CR00 3380	0
CR00 3382	34
CR00 3383	1
CR00 3385	3
CR00 3386	1

10

20

30

40

50

【表 2 7 - 3】

CR00 3387	6
CR00 3388	2
CR00 3389	2
CR00 3390	1
CR00 3391	0
CR00 3392	0
CR00 5298	0
CR00 5300	0
CR00 5301	0
CR00 5302	1
CR00 5303	1
CR00 5304	0

10

20

【0701】

さらに、ガイドのサブセットを、上述のオリゴに基づく挿入方法を介して、He k _ C a s 9細胞における修飾 s g R N Aとしてのオフターゲット電位について評価した。オフターゲットの結果を図4にプロットした。

【0702】

表26は、二本鎖DNAオリゴドナー配列とともにT T R s g R N AでトランスフェクトされたHe k C a s 9細胞において検出されたオフターゲット組み込み部位の数を示す。

30

40

50

【表 28-1】

表 26：挿入検出法を介して TTR sgRNA について検出されたオフターゲット組み込み部位の数

ガイド 1 D	部位数
G000 480	11
G000 481	3
G000 482	13
G000 483	5
G000 484	7
G000 485	22
G000 486	12
G000 487	14
G000 488	0
G000 489	19
G000 490	12
G000 491	28
G000 492	97
G000 493	7
G000 494	4

10

20

30

40

50

【表 28-2】

G 0 0 0 4 9 5	1 3
G 0 0 0 4 9 6	1
G 0 0 0 4 9 7	2 6
G 0 0 0 4 9 8	8 2
G 0 0 0 4 9 9	4
G 0 0 0 5 0 0	4 6
G 0 0 0 5 0 1	4
G 0 0 0 5 6 7	9
G 0 0 0 5 6 8	9 3 7
G 0 0 0 5 7 0	1 9
G 0 0 0 5 7 1	1 6
G 0 0 0 5 7 2	1 5

10

20

【0703】

実施例 6．潜在的なオフターゲット部位を検証するための標的シーケンシング

潜在的なオフターゲットを検出するために実施例 5 で使用される H E K 2 9 3 __ C a s 9 細胞は、C a s 9 を構成的に過剰発現し、様々な細胞型における一過性送達パラダイムと比較して、より多くの潜在的なオフターゲット「ヒット」をもたらす。さらに、s g R N A を送達する場合（d g R N A とは対照的に）、s g R N A 分子が d g R N A よりも安定であるため（特に化学修飾された場合）、潜在的なオフターゲットヒットの数は、さらにふくらみ得る。したがって、実施例 5 で使用されるオリゴ挿入法によって特定された潜在的なオフターゲット部位は、特定された潜在的なオフターゲット部位の標的シーケンシングを使用して検証され得る。

30

【0704】

1 つのアプローチでは、初代肝細胞を、C a s 9 mRNA および目的の s g R N A （例えば、評価のための潜在的なオフターゲット部位を有する s g R N A ）を含む L N P で処理する。次いで、初代肝細胞を溶解し、潜在的なオフターゲット部位に隣接するプライマーを使用して N G S 分析のためのアンプリコンを生成する。特定のレベルでのインデルの特定は、潜在的なオフターゲット部位を検証し得るが、潜在的なオフターゲット部位で見出されるインデルの欠如は、H E K 2 9 3 __ C a s 9 細胞アッセイにおいて偽陽性を示す場合がある。

40

【0705】

実施例 7．表現型分析

分泌 T T R のウェスタンブロット分析

肝細胞癌細胞株 H e p G 2 を、実施例 1 に記載されたように、表 1 からの選択されたガイドで 3 回に分けてトランスフェクトした。トランスフェクションの 2 日後、ゲノム D N A のために 1 つの複製物を採取し、編集効率のために N G S シーケンシングによる分析を実施した。トランスフェクションの 5 日後、血清を含まない培地を 1 つの複製物で交換した。4 時間後、前述のように、W B によって分泌された T T R の分析のために培地を採取した。各ガイドの編集 % および細胞外 T T R の減少のデータを図 7 に提供する。

【0706】

50

細胞内 T T R のウェスタンブロット分析

肝細胞癌細胞株 H U H 7 を、実施例 1 に記載されたように、表 1 からのガイドを含む c r R N A を用い、実施例 1 に記載されるようにトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞プールを組織培養物中に保持し、さらなる分析のために継代した。トランスフェクションの 7 日後、細胞を収穫し、全細胞抽出物 (W C E) を調製し、前述のようにウェスタンブロットによる分析を行った。

【 0 7 0 7 】

W C E を、T T R タンパク質の減少についてウェスタンブロットによって分析した。全長 T T R タンパク質は、予測分子量が約 1 6 k D である。この分子量でのバンドは、ウェスタンブロットにおいて、対照レーンにおいて観察された。

【 0 7 0 8 】

T T R タンパク質の減少率は、L i c o r O d y s s e y I m a g e S t u d i o V e r 5 . 2 ソフトウェアを使用して計算した。ローディング対照として G A P D H を使用し、T T R と同時にプローブした。T T R バンドを包含する全領域と比較して、各試料内の G A P D H の密度測定値について比率を計算した。この比率を陰性対照レーンに対して正規化した後、T T R タンパク質の減少率を決定した。結果を図 8 に示す。

【 0 7 0 9 】

実施例 8 . ヒト化 T T R マウスおよび w t (マウス) T T R を有するマウスへの L N P 送達

T T R 遺伝子に関してヒト化したマウスに、表 2 7 に示されるガイドを含む L N P 製剤 7 0 1 ~ 7 0 4 を投与した (製剤当たり 5 匹のマウス) 。これらのヒト化 T T R マウスは、内因性マウス T T R 遺伝子座の領域が欠失し、遺伝子座がヒト T T R タンパク質をコードするようにオーソログヒト T T R 配列と置き換わるように操作された。比較のために、マウス T T R を有する 6 匹のマウスに、マウス T T R を標的とするガイド (G 0 0 0 2 8 2) を含有する L N P 7 0 0 を投与した。表 2 7 の製剤番号 1 ~ 5 を有する L N P は、上述のように N a n o a s s e m b l e r (商標) 手順を使用して調製され、一方、製剤番号 6 ~ 1 6 を有する L N P は、上述のクロスフロー手順を使用して調製されたが、P D - 1 0 カラム (G E H e a l t h c a r e L i f e S c i e n c e s) を使用して精製され、A m i c o n 遠心フィルタユニット (M i l l i p o r e S i g m a) を使用して濃縮された。陰性対照として、対応する遺伝子型のマウスにビヒクル単独 (T r i s - 生理食塩水 - スクロース緩衝液 (T S S)) を投与した。表 2 7 の製剤番号 2 ~ 5 を有する L N P を投与されたヒト化 T T R マウスのバックグラウンドは、5 0 % 1 2 9 S 6 / S v E v T a c 5 0 % C 5 7 B L / 6 N T a c であった。表 2 5 の製剤番号 6 ~ 1 6 を有する L N P を投与されたヒト化 T T R マウスおよびマウス T T R を投与された (L N P 7 0 0 、製剤番号 1 を投与された) マウスのバックグラウンドは、7 5 % C 5 7 B L / 6 N T a c 2 5 % 1 2 9 S 6 / S v E v T a c であった。

10

20

30

40

50

【表 29-1】

表 27. ヒト化TTRマウスの投薬のためのLNP製剤

製剤 番号	LNP	ガイド	RNA濃度 (mg/in 1)	N:P 比	モル比(それぞれ、 脂質A、コレステロ ール、DSPC、お よびPEG2k-D MG)
1	LNP7 00	G000282	0.53	4.5	45:44:9:2
2	LNP7 01	G000481	0.46	4.5	45:44:9:2
3	LNP7 02	G000489	0.61	4.5	45:44:9:2
4	LNP7 03	G000494	0.57	4.5	45:44:9:2
5	LNP7 04	G000499	0.59	4.5	45:44:9:2
6	LNP1 148	G000481	0.73	4.5	45:44:9:2
7	LNP1 152	G000499	0.45	6.0	50:38:9:3
8	LNP1 153	G000482	0.53	6.0	50:38:9:3
9	LNP1 155	G000571	0.70	6.0	50:38:9:3
10	LNP1 156	G000572	0.58	6.0	50:38:9:3
11	LNP1 157	G000480	0.84	6.0	50:38:9:3
12	LNP1 159	G000488	0.79	6.0	50:38:9:3
13	LNP1 160	G000493	0.71	6.0	50:38:9:3
14	LNP1 161	G000500	0.66	6.0	50:38:9:3

【表 29-2】

15	LNP1 162	G000567	0.69	6.0	50:38:9:3
16	LNP1 163	G000570	0.66	6.0	50:38:9:3

【0710】

製剤番号1～5を有するLNPは、配列番号2のCas9 mRNAを含有し、製剤番号6～16を有するLNPは、配列番号1のCas9 mRNAを含有し、すべてガイドに対して1:1の重量比であった。LNPは、それぞれ表27に列挙されるモル比で、脂質A、コレステロール、DSPC、およびPEG2k-DMGを含有していた。製剤番号1～5を有するLNPの投与は、2mg/kg(総RNA含有量)であり、製剤番号6～16を有するLNPの投与は、1mg/kg(総RNA含有量)であった。肝臓編集結果を、NGS分析のために目的の領域を増幅するように設計されたプライマーを使用して決定した。製剤番号1～5の肝臓編集結果を図9に示し、4つのガイドの各々を35%を超える編集レベル(平均値)で試験したヒトTTR配列の編集を示し、G000494およびG000499は、60%近い値を提供する。製剤番号6～8、10～13、および15～16の肝臓編集結果を、図13および表28に示し、このことは、試験した各配合物を用いたヒトTTR配列の効率的な編集を示す。すべての製剤について38%を超える編集がみられ、いくつかの製剤は、60%を超える編集値を与えた。PCRアンプリコンの

設計および結果として生じる少ない数のシーケンシングリードに起因して、製剤 9 および 14 は示されない。

【0711】

血清中のヒト TTR のレベルをマウスにおいて測定し、製剤番号 6～8、10～13、および 15～16 を提供した。図 14B を参照されたい。図 14A は、比較目的で提供される、図 13 の繰り返しである。試験した各製剤について血清ヒト TTR のノックダウンを検出し、これは、肝臓において検出された編集の量と相関していた（図 14A 対図 14B、表 28 を参照されたい）。

【表 30】

表 28

ガイド ID	編集%	血清 TTR (%TSS)
TSS (ビシクル)	0.06	100
G481	61.28	10.52
G499	65.66	8.39
G482	70.86	4.65
G572	73.52	2.11
G480	77.34	3.48
G488	59.125	27.78
G493	38.55	49.73
G567	47.525	44.24
G570	45.5	41.73
G571	33.88	11.39
G500	44.44	34.28

【0712】

別のセットの実験において、ヒト化 TTR マウスに、ガイド G000480、G000488、G000489 および G000502 を用いて、様々な用量にわたって LNP 製剤を投与した。製剤は、ガイドに対して 1：1 の重量比で Cas9 mRNA（配列番号 1）を含有していた。LNP は、それぞれ、脂質 A、コレステロール、DSPC、および PEG2k-DMG を 50：38：9：3 のモル比で含有し、N：P 比は 6 であった。投薬量は、1、0.3、0.1、または 0.03 mg/kg（n=5/群）であった。上述のクロスフロー手順を使用して LNP を調製し、それぞれ PD-10 カラムおよび Amicon 遠心フィルタユニットを使用して精製し、濃縮した。肝臓編集結果を、NGS 分析のために目的の領域を増幅するように設計されたプライマーを使用して決定し、血清ヒト TTR レベルを上述のように測定した。肝臓編集の結果を図 26A に示し、血清ヒト TTR レベルを図 26B～図 26C に示す。編集および血清 TTR レベルの両方について、用量応答が明らかであった。

【0713】

別のセットの実験において、ヒト化 TTR マウスに、ガイド G000481、G000482、G000486 および G000499 を用いて、様々な用量にわたって LNP 製剤を投与した。製剤は、ガイドに対して 1：1 の重量比で Cas9 mRNA（配列番号

1) を含有していた。LNPは、それぞれ、脂質A、コレステロール、DSPC、およびPEG2k-DMGを50:38:9:3のモル比で含有し、N:P比は6であった。投薬量は、1、0.3、または0.1mg/kg (n=5/群)であった。上述のクロスフロー手順を使用してLNPを調製し、それぞれPD-10カラムおよびAmicon遠心フィルタユニットを使用して精製し、濃縮した。肝臓編集結果を、NGS分析のために目的の領域を増幅するように設計されたプライマーを使用して決定し、血清ヒトTTRレベルを上述のように測定した。肝臓編集の結果を図27Aに示し、血清ヒトTTRレベルを図27B～図27Cに示す。編集および血清TTRレベルの両方について、用量応答が明らかであった。

【0714】

別のセットの実験において、ヒト化TTRマウスに、ガイドG000480、G000481、G000486、G000499およびG000502を用いて、様々な用量にわたってLNP製剤を投与した。製剤は、ガイドに対して1:2の重量比でCas9 mRNA (配列番号1) を含有していた。LNPは、それぞれ、脂質A、コレステロール、DSPC、およびPEG2k-DMGを50:38:9:3のモル比で含有し、N:P比は6であった。投薬量は、1、0.3、または0.1mg/kg (n=5/群)であった。上述のクロスフロー手順を使用してLNPを調製し、それぞれPD-10カラムおよびAmicon遠心フィルタユニットを使用して精製し、濃縮した。肝臓編集結果を、NGS分析のために目的の領域を増幅するように設計されたプライマーを使用して決定し、血清ヒトTTRレベルを上述のように測定した。肝臓編集の結果を図28Aに示し、血清ヒトTTRレベルを図28B～図28Cに示す。編集および血清TTRレベルの両方について、用量応答が明らかであった。

【0715】

野生型CD-1マウスを用いた別個の実験において、マウスとカニクイザルとの間で交差相同であるガイドG000502を含むLNP製剤を、用量応答研究において試験した。製剤は、ガイドに対して1:1の重量比でCas9 mRNA (配列番号1) を含有していた。LNPは、それぞれ、脂質A、コレステロール、DSPC、およびPEG2k-DMGを45:44:9:2のモル比で含有し、N:P比は6であった。投薬量は、1、0.3、0.1、0.03、または0.01mg/kg (n=5/群)であった。肝臓編集結果を、NGS分析のために目的の領域を増幅するように設計されたプライマーを使用して決定した。肝臓編集の結果を図15Aに示し、血清マウスTTRレベルを図15Bに示す。編集および血清TTRレベルの両方について、用量応答が明らかであった。

【0716】

実施例9．複数回投与でのマウスへのLNP送達

マウス (Charles River Laboratoryからの雌、およそ6～7週齢) に、G000282 (「G282」) およびCas9 mRNA (配列番号2) を重量比1:1で含有し、総RNA濃度が0.5mg/mlである、上述のクロスフローおよびTFF手順を使用して調製されたLNP製剤LNP705を投与した。LNPは、N:P比が4.5であり、それぞれ、脂質A、コレステロール、DSPC、およびPEG2k-DMGを45:44:9:2のモル比で含有していた。群には、週に1回、最大1週間、2週間、3週間、または4週間に1回 (QW x 1～4)、または月に1回、最大2ヶ月または3ヶ月に1回 (QM x 2～3) のいずれかで投与した。用量は、0.5mg/kg または1mg/kg (総RNA含有量) であった。対照群は、1日目に、0.5、1、または2mg/kgの単回用量を摂取した。各群は、5匹のマウスを含有していた。血清TTRをELISAによって分析し、肝臓、脾臓および筋肉における剖検をそれぞれNGS編集分析のために収集した。群を表29に示す。X = 安楽死および剖検MPK = mg/kg

10

20

30

40

50

【表 3 1】

表 2 9. 研究グループ

グループ	期間／ 用量レジ メン	用量 (M PK)	所与の 総用量 (MP K)	用量	用量	用量	用量	NX	用量	NX
				1 日 H	8 日 H	1 5 日 H	2 2 日 H	2 8 日 H	4 3 日 H	4 9 日 H
1	4 週間の 複数回用 量 QW x 4	0 (TS S 対照)	0	X	X	X	X	X		
2	2 ヶ月間 の複数回	1	3	X			X		X	X
3	用量／ QM x 3	0. 5	1. 5	X			X		X	X
4	1 ヶ月間 の複数回	1	2	X			X	X		
5	用量／ QM x 2	0. 5	1	X			X	X		
6	4 週間の 複数回用	1	4	X	X	X	X	X		
7	量 QW x 4	0. 5	2	X	X	X	X	X		
8	3 週間の 複数回用	1	3		X	X	X	X		
9	量 QW x 3	0. 5	1. 5		X	X	X	X		
1 0	2 週間の 複数回用	1	2			X	X	X		
1 1	量 QW x 2	0. 5	1			X	X	X		
1 2	単回用量 ／ QW x 1	1	1				X	X		
1 3		0. 5	0. 5				X	X		
1 4		2	2				2 6 日 H	3 2 日 H		

10

20

30

【0 7 1 7】

表 3 0 および図 1 0 A ～図 1 1 B は、血清 T T R レベルの結果 (% K D = % ノックダウン) を示す。表 3 0 および図 1 2 A ～図 1 2 C は、肝臓編集の結果を示す。

40

50

【表 3 2】

表 3 0、血清 T T R 結果

時間レジメン	用量	血清 T T R (μ g / m L)	血清 T T R (% K D)
Q W x 4	T S S	1 1 9 0 . 7	—
Q M x 3	0 . 5	2 4 5 . 0 1	7 9 . 4 2
Q M x 2	0 . 5	7 7 6 . 7 3	3 4 . 7 7
Q W x 4	0 . 5	3 4 7 . 4 3	7 0 . 8 2
Q W x 3	0 . 5	4 0 5 . 7 0	6 5 . 9 3
Q W x 2	0 . 5	4 3 2 . 2 5	6 3 . 7 0
Q W x 1	0 . 5	8 0 4 . 0 6	3 2 . 4 7
Q M x 3	1	9 1 . 9 5	9 2 . 2 8
Q M x 2	1	1 7 6 . 8 1	8 5 . 1 5
Q W x 4	1	1 1 9 . 5 2	8 9 . 9 6
Q W x 3	1	1 6 7 . 1 5	8 5 . 9 6
Q W x 2	1	1 3 0 . 9 8	8 9 . 0 0
Q W x 1	1	5 7 3 . 0 2	5 1 . 8 8
Q W x 1	2	2 1 9 . 0 7	8 1 . 6 0

10

【表 3 3】

表 3 1、肝臓編集結果

時間レジメン	用量	肝臓編集 (%)
Q W x 4	T S S	0 . 3 8
Q M x 3	0 . 5	4 8 . 1 8
Q M x 2	0 . 5	3 6 . 6 6
Q W x 4	0 . 5	5 6 . 0 3
Q W x 3	0 . 5	5 1 . 3 5
Q W x 2	0 . 5	3 4 . 7 7
Q W x 1	0 . 5	2 4 . 1 6
Q M x 3	1	6 3 . 4 0
Q M x 2	1	5 7 . 3 7
Q W x 4	1	6 2 . 8 9
Q W x 3	1	5 9 . 2 2
Q W x 2	1	6 0 . 1 2
Q W x 1	1	3 5 . 1 6
Q W x 1	2	6 0 . 5 7

20

30

【 0 7 1 8 】

この結果は、週または月による間隔を含め、経時的に複数回投与での累積用量および効果を蓄積して、T T R の編集レベルおよび K D % の増加を達成することが可能であることを示す。

40

【 0 7 1 9 】

実施例 1 0 . R N A カーゴ：様々な m R N A および g R N A の比

この研究は、m R N A に対する g R N A の様々な比率で、マウスにおけるインビボでの有効性を評価した。配列番号 4 の O R F、H S D 5 ' U T R、ヒトアルブミン 3 ' U T R、K o z a k 配列、およびポリ A テールを有する、C l e a n C a p (商標) キャップされた C a s 9 m R N A を、実施例 1 に示されるように、ウリジン三リン酸の代わりに N 1 -メチルシュードウリジン三リン酸を用いた I V T 合成によって作製した。

【 0 7 2 0 】

記載の m R N A および実施例 1 に記載の G 2 8 2 (配列番号 1 2 4) から、脂質 A、コレステロール、D S P C、および P E G 2 k - D M G を 5 0 : 3 8 : 9 : 3 のモル比含み

50

、かつN：P比が6であるLNP製剤を調製した。製剤のgRNA：Cas9 mRNAの重量比は、図19Aおよび図19Bに示される通りであった。

【0721】

インビボでの特性決定のために、LNPを、1kg当たり0.1mgの総RNA（mgガイドRNA+mg mRNA）（1群当たりn=5）でマウスに投与した。投与後7～9日目に、動物を安楽死させ、血液および肝臓を採取し、血清TTRおよび肝臓編集を、実施例1に記載した通りに測定した。血清TTRおよび肝臓編集結果を図19Aおよび図19Bに示す。陰性対照マウスに、TSSビヒクルを投与した。

【0722】

加えて、上のLNPを、gRNA用量を1kg当たり0.06mg～1kg当たり0.4mgに変化させつつ、1kg当たり0.05mgの一定mRNA用量でマウスに投与した（1群当たりn=5）。投与後7～9日目に、動物を安楽死させ、血液および肝臓を採取し、血清TTRおよび肝臓編集を測定した。血清TTRおよび肝臓編集結果を図19Cおよび図19Dに示す。陰性対照マウスに、TSSビヒクルを投与した。

【0723】

実施例11．初代ヒト肝細胞におけるTTR sgRNAのオフターゲット分析

TTRを標的とするsgRNAのオフターゲット分析を、実施例5に記載のように、以下の修飾を用い、初代ヒト肝細胞（PHH）において行った。PHHを、実施例1に記載されるように、コラーゲンでコーティングした96ウェルプレート上で、ウェル当たり33,000個の細胞の密度でプレーティングした。プレーティングから24時間後、細胞を培地で洗浄し、実施例1に記載されるように、Lipofectamine RNAi MAX（ThermoFisher、カタログ13778150）を使用してトランスフェクトした。細胞を、100ngのCas9 mRNAを含むリポプレックスでトランスフェクトし、直後に、25nMのsgRNAおよび12.5nMのドナーオリゴ（0.3μL／ウェル）を含有する別のリポプレックスを添加した。細胞を、トランスフェクションの48時間後に溶解し、gDNAを抽出し、実施例5にさらに記載されるように分析した。データを図20にグラフによって表す。

【0724】

表32は、PHHで検出されたオフターゲット組み込み部位の数を示し、実施例5で使用したHeK293細胞において検出された部位の数と比較している。HeK293細胞株と比較して、試験した各ガイドについて、PHHにおいて検出された部位は少なく、PHH単独では、固有の部位は検出されなかった。

10

20

30

40

50

【表 3 4】

表 3 2. オリゴ挿入に基づくアッセイを介して、PHHにおけるTTR mRNAについて検出されたオフターゲット組み込み部位の数

ガイドID	PHH中の部位の数	HecCas9細胞内の部位の数（実施例5）
G000480	2	11
G000481	0	3
G000482	2	13
G000483	0	5
G000484	0	7
G000485	3	22
G000486	0	12
G000487	0	14
G000488	0	0
G000489	2	19
G000490	0	12
G000491	7	28
G000492	5	97
G000493	1	7
G000494	0	4
G000495	1	13
G000496	0	1
G000497	3	26
G000498	19	82
G000499	1	4
G000500	12	46
G000501	0	4
G000567	0	9
G000568	11	936
G000570	1	19
G000571	1	16
G000572	2	15

10

20

【0725】

オリゴ挿入アッセイを介するPHHにおける潜在的なオフターゲット部位の特定に続いて、特定の潜在的な部位を、例えば、実施例6に記載されるように、標的化されたアンプリコンシークエンシングによってさらに評価した。オリゴ挿入戦略によって特定された潜在的なオフターゲット部位に加えて、インシリコ予測によって特定されたさらなる潜在的なオフターゲット部位が、分析に含まれた。

30

【0726】

この目的のために、実施例4に記載されるように、100ngのCas9 mRNA（配列番号1）および目的のgRNAを14.68nM（重量比で1：1）で含むLNPでPHHを処理した。上述のクロスフロー手順を使用してLNPを調製し、それぞれPD-10カラムおよびAmicon遠心フィルタユニットを使用して精製し、濃縮した。LNPを、6.0のN：P比で製剤化し、LNPは、それぞれ、脂質A、コレステロール、DSPC、およびPEG2k-DMGを50：38：9：2のモル比で含有していた。LNP治療後、単離されたゲノムDNAを、NGSによって（例えば、実施例1および6に記載されるように）分析して、潜在的なオフターゲット部位でインデルが検出され得るかどうかを決定し、このことは、Cas9媒介性切断事象の指標となるだろう。表33および34は、gRNA G000480およびG000486についてそれぞれ評価した潜在的なオフターゲット部位を示す。

40

【0727】

図21A～図21Bおよび図22A～図22Bならびに以下の表35に示されるように、G000480についてのオリゴ挿入アッセイによって特定された潜在的なオフターゲット

50

ット部位のうちの2つのみについて、また、G 0 0 0 4 8 6について1つのみについて、インデルを低レベルで検出した。どちらのガイドについても、インシリコ予測された部位のいずれにおいてもインデルは検出されなかった。さらに、G 0 0 0 4 8 0およびG 0 0 0 4 8 6のオンターゲット部位で観察されたインデル率は、それぞれ約97%および約91%であったため、インデルは、ほぼ飽和用量のLNPを使用して、これらの部位でしか検出されなかった(表35を参照のこと)。これらの部位のゲノム座標も、表33および34に報告されており、それぞれ、任意のタンパク質をコードしない配列に対応する。

【0728】

次いで、オフターゲットが検出されなかったLNPの最高用量を決定するために、用量応答アッセイを実行した。実施例4に記載されるように、G 0 0 0 4 8 0またはG 0 0 0 4 8 6のいずれかを含みLNPでPHHを処理した。用量は、gRNA濃度に関して11点にわたる範囲であった(0.001nM、0.002nM、0.007nM、0.02nM、0.06nM、0.19nM、0.57nM、1.72nM、5.17nM、15.51nM、および46.55nM)。図21A～図21Bおよび図22A～図22Bの破線の垂直線によって表されるように、G 0 0 0 4 8 0およびG 0 0 0 4 8 6について潜在的なオフターゲット部位がもはや検出されなかった最高濃度(gRNAの濃度に関する)は、それぞれ0.57nMおよび15.51nMであり、それぞれ、84.60%および89.50%のオンターゲットインデル率が得られた。

【表35-1】

表33. 挿入検出を介して特定された潜在的なオフターゲット部位および標的化アンプリコンシークエンシングを介して評価されるG 0 0 0 4 8 0についてのインシリコ予測

ガイドID	オフターゲット(OT)部位ID	使用されたアッセイ	染色体座標(hg38)	鎖
G 0 0 0 4 8 0	INS-OT. 1	挿入検出	chr7:94767406-94767426	+
G 0 0 0 4 8 0	INS-OT. 2	挿入検出	chr2:192658562-192658582	+
G 0 0 0 4 8 0	INS-OT. 3	挿入検出	chr7:4834390-4834410	+
G 0 0 0 4 8 0	INS-OT. 4	挿入検出	chr20:9216118-9216138	-
G 0 0 0 4 8 0	INS-OT. 5	挿入検出	chr10:12547071-12547091	+
G 0 0 0 4 8 0	INS-OT. 6	挿入検出	chr6:168377978-168377998	-
G 0 0 0 4 8 0	INS-OT. 7	挿入検出	chr12:114144669-114144689	-
G 0 0 0 4 8 0	INS-OT. 8	挿入検出	chr10:7376755-7376775	+
G 0 0 0 4 8 0	INS-OT. 9	挿入検出	chr2:52950299-52950319	+
G 0 0 0 4 8 0	INS-OT. 0	挿入検出	chr8:56579165-56579185	-
G 0 0 0 4 8 0	INS-OT. 1	挿入検出	chr1:189992255-189992275	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 1	インシリコ予測	chr10:12547071-12547091	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 2	インシリコ予測	chrX:119702782-119702802	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 3	インシリコ予測	chr1:116544586-116544606	+

10

20

30

40

50

【表 3 5 - 2】

G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 4	インシリコ予 測	chr 6 : 8 8 2 8 2 8 8 4 - 8 8 2 8 2 9 0 4	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 6	インシリコ予 測	chr 5 : 1 2 1 8 9 1 8 6 8 - 1 2 1 8 9 1 8 8 8	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 7	インシリコ予 測	chr 3 : 5 2 5 4 4 9 4 5 - 5 2 5 4 4 9 6 5	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 8	インシリコ予 測	chr 1 5 : 3 6 9 4 9 6 3 9 - 3 6 9 4 9 6 5 9	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 9	インシリコ予 測	chr 5 : 3 3 8 6 6 4 8 6 - 3 3 8 6 6 5 0 6	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 1 0	インシリコ予 測	chr 5 : 1 5 9 7 5 5 7 5 4 - 1 5 9 7 5 5 7 7 4	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 1 1	インシリコ予 測	chr 5 : 3 1 3 4 9 8 5 9 - 3 1 3 4 9 8 7 9	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 1 2	インシリコ予 測	chr 1 1 : 7 9 4 8 5 6 5 2 - 7 9 4 8 5 6 7 2	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 1 3	インシリコ予 測	chr 1 5 : 2 9 4 4 8 8 6 4 - 2 9 4 4 8 8 8 4	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 1 4	インシリコ予 測	chr 5 : 1 7 1 1 5 3 5 6 5 - 1 7 1 1 5 3 5 8 5	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 1 5	インシリコ予 測	chr 9 : 8 4 8 5 5 2 7 3 - 8 4 8 5 5 2 9 3	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 1 6	インシリコ予 測	chr 6 : 1 5 9 9 5 3 0 6 0 - 1 5 9 9 5 3 0 8 0	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 1 7	インシリコ予 測	chr 1 6 : 5 1 8 4 9 0 2 4 - 5 1 8 4 9 0 4 4	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 1 8	インシリコ予 測	chr 3 : 2 4 1 0 8 8 0 9 - 2 4 1 0 8 8 2 9	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 1 9	インシリコ予 測	chr 1 8 : 4 1 1 1 8 3 1 0 - 4 1 1 1 8 3 3 0	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 2 0	インシリコ予 測	chr 1 0 : 1 0 8 9 7 5 2 4 1 - 1 0 8 9 7 5 2 6 1	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 2 1	インシリコ予 測	chr 1 : 4 4 6 8 3 6 3 3 - 4 4 6 8 3 6 5 3	+

10

20

30

【表 3 5 - 3】

G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 2 2	インシリコ予 測	chr 2 : 1 9 6 2 1 4 8 4 9 - 1 9 6 2 1 4 8 6 9	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 2 3	インシリコ予 測	chr 9 : 1 1 7 3 5 3 5 4 4 - 1 1 7 3 5 3 5 6 4	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 2 4	インシリコ予 測	chr 1 : 5 5 5 8 3 3 2 2 - 5 5 5 8 3 3 4 2	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 2 5	インシリコ予 測	chr 1 2 : 2 8 2 4 6 8 2 7 - 2 8 2 4 6 8 4 7	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 2 6	インシリコ予 測	chr 4 : 5 4 5 4 5 3 6 1 - 5 4 5 4 5 3 8 1	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 2 7	インシリコ予 測	chr 1 3 : 2 2 3 6 4 8 3 6 - 2 2 3 6 4 8 5 6	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 2 8	インシリコ予 測	chr 1 3 : 8 0 8 1 6 0 4 9 - 8 0 8 1 6 0 6 9	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 2 9	インシリコ予 測	chr 7 : 3 9 0 7 8 6 2 2 - 3 9 0 7 8 6 4 2	+
G 0 0 0 4 8 0	PRED-OT. 3 0	インシリコ予 測	chr 2 : 5 9 9 4 4 3 8 6 - 5 9 9 4 4 4 0 6	+

40

【0 7 2 9】

「INS-OT.N」は、オリゴ挿入によって検出されるオフターゲット部位IDを指

50

し、Nは、上で指定される整数であり、「PRED-OT.N」は、インシリコによって予測されるオフターゲット部位IDを指し、Nは、上で指定される整数である。

【表 36-1】

表 34、挿入検出を介して特定された潜在的なオフターゲット部位および標的化アンプリコンシークエンシングを介して評価される G000486 についてのインシリコ予測

ガイド ID	オフターゲット (OT) 部位 ID	使用されたアッセイ	染色体座標 (hg38)	鎖
G000486	INS-OT. 1	挿入検出	chr14:77332157-77332177	+
G000486	INS-OT. 2	挿入検出	chr14:54672059-54672079	-
G000486	INS-OT. 3	挿入検出	chr4:108513169-108513189	-
G000486	INS-OT. 4	挿入検出	chr5:91397023-91397043	-
G000486	INS-OT. 5	挿入検出	chr9:116626135-116626155	-
G000486	INS-OT. 6	挿入検出	chr6:73201226-73201246	+
G000486	INS-OT. 7	挿入検出	chr16:89368352-89368372	-
G000486	INS-OT. 8	挿入検出	chr7:56308371-56308391	-
G000486	INS-OT. 9	挿入検出	chr21:43605667-43605687	+
G000486	INS-OT. 10	挿入検出	chr5:26758030-26758050	+
G000486	INS-OT. 11	挿入検出	chr17:30656428-30656448	+
G000486	INS-OT. 12	挿入検出	chr8:130486452-A130486472	+
G000486	PRED-OT. 1	インシリコ予測	chr11:44707064-44707084	+
G000486	PRED-OT. 2	インシリコ予測	chr5:50775396-50775416	+

10

20

30

40

50

【表 3 6 - 2】

G000 486	PRED- OT. 3	インシリコ予測	chr4:141623949 -141623969	+
G000 486	PRED- OT. 4	インシリコ予測	chr1:223481186 -223481206	+
G000 486	PRED- OT. 5	インシリコ予測	chr6:39951487- 39951507	+
G000 486	PRED- OT. 6	インシリコ予測	chrY:5456047-5 456067	+
G000 486	PRED- OT. 8	インシリコ予測	chr6:129868719 -129868739	+
G000 486	PRED- OT. 9	インシリコ予測	chrX:80450312- 80450332	+
G000 486	PRED- OT. 10	インシリコ予測	chr7:27256771- 27256791	+
G000 486	PRED- OT. 11	インシリコ予測	chr3:181416528 -181416548	+
G000 486	PRED- OT. 12	インシリコ予測	chr7:146425020 -146425040	+
G000 486	PRED- OT. 13	インシリコ予測	chr3:16980977- 16980997	+
G000 486	PRED- OT. 14	インシリコ予測	chr7:118161002 -118161022	+
G000 486	PRED- OT. 15	インシリコ予測	chr6:102220539 -102220559	+
G000 486	PRED- OT. 16	インシリコ予測	chr12:12727899 1-127279011	+
G000 486	PRED- OT. 17	インシリコ予測	chr2:67686631- 67686651	+
G000 486	PRED- OT. 18	インシリコ予測	chr1:114467665 -114467685	+
G000 486	PRED- OT. 19	インシリコ予測	chr3:194514436 -194514456	+
G000 486	PRED- OT. 20	インシリコ予測	chr14:31767581 -31767601	+
G000 486	PRED- OT. 21	インシリコ予測	chr16:28706209 -28706229	+

10

20

30

【表 3 6 - 3】

G000 486	PRED- OT. 22	インシリコ予測	chr8:110526279 -110526299	+
G000 486	PRED- OT. 23	インシリコ予測	chr19:2899814- 2899834	+
G000 486	PRED- OT. 25	インシリコ予測	chr3:130760261 -A130760281	+
G000 486	PRED- OT. 26	インシリコ予測	chr11:2506046- 2506066	+
G000 486	PRED- OT. 27	インシリコ予測	chr2:153918318 -153918338	+
G000 486	PRED- OT. 28	インシリコ予測	chr14:40590226 -40590246	+
G000 486	PRED- OT. 29	インシリコ予測	chr18:806650-8 06670	+
G000 486	PRED- OT. 30	インシリコ予測	chr2:117707480 -117707500	+

40

【0730】

「INS-OT. N」は、オリゴ挿入によって検出されるオフターゲット部位IDを指

50

し、Nは、上で指定される整数であり、「PRED-OT.N」は、インシリコによって予測されるオフターゲット部位IDを指し、Nは、指定される整数である。

【表 37】

表 35. 100 ng の mRNA および 31.03 nM の gRNA を含有する LNP で処理された PHH における検出されたオフターゲット部位.

ガイド ID	オフターゲット (OT) 部位 ID	部位の種類	インデル頻度 (100 ng の Cas9 mRNA および 14.68 nM の gRNA を有する LNP を使用する)	インデル頻度の標準偏差
G000480	n/a	オンターゲット	97.33%	1.10%
G000480	INS-OT.2	オフターゲット	1.43%	0.40%
G000480	INS-OT.4	オフターゲット	0.97%	0.25%
G000486	n/a	オンターゲット	91.33%	1.97%
G000486	INS-OT.4	オフターゲット	0.47%	0.06%

10

【0731】

実施例 12. ATTR のヒト化マウスモデルへの LNP 送達

20

この実施例では、ヒト TTR タンパク質の V30M 病原性変異体形態を発現する遺伝性 ATTR アミロイドーシスの十分に確立されたヒト化トランスジェニックマウスモデルを使用した。このマウスモデルは、末梢神経系および消化管 (GI) 内を含む、ATTR 患者において観察される組織における TTR 沈着表現型を再現するものである (Santos et al., Neurobiol Aging. 2010 Feb; 31(2): 280-9 を参照のこと)。

【0732】

実施例 1 に記載のクロスフローおよび TFF 手順を使用して調製した LNP 製剤を、マウス (およそ 4~5 ヶ月齢) に投与した。LNP を、6.0 の N:P 比で製剤化し、LNP は、それぞれ、脂質 A、コレステロール、DSPC、および PEG2k-DMG を 50:38:9:2 のモル比で含有していた。LNP は、gRNA:mRNA の重量比 1:1 で、Cas9 mRNA (配列番号 1) と、G000481 (「G481」) または非標的化対照ガイド G000395 (「G395」、配列番号 273) のいずれかと含有していた。

30

【0733】

マウスに、n=10/群を有する LNP の単回 1mg/kg (総 RNA 含有量) 用量を、実施例 1 に記載されるように、側尾静脈を介して注射した。治療から 8 週間後、マウスを試料収集のために安楽死させた。Butler et al., Amyloid. 2016 Jun; 23(2): 109-18 に既に記載されているように、ヒト TTR タンパク質レベルを、ELISA によって血清および脳脊髄液 (CSF) において測定した。肝臓組織を、実施例 1 に記載されるように、編集レベルについてアッセイした。他の組織 (胃、結腸、坐骨神経、背根神経節 (DRG)) を収集し、Goncalves et al., Amyloid. 2014 Sep; 21(3): 175-184 によって既に記載されているような半定量的免疫組織化学のために処理した。免疫組織化学データの統計分析は、p 値が 0.0001 未満のマン・ホイットニー検定を用いて実施した。

40

【0734】

図 23A~図 23B に示されるように、TTR の強固な編集 (49.4%) は、G481 を含む LNP の単回投与後のヒト化マウスの肝臓において観察され、対照群において編集は検出されなかった。編集事象の分析は、96.8% の事象が挿入であり、残りが欠失であることを示していた。

50

【0735】

図24A～図24Bに示されるように、TTRタンパク質レベルは、治療されたマウス由来の血漿中では低下したが、CSF中では低下せず、TTR血漿レベルの99%を超えるノックダウンが観察された ($p < 0.001$)。

【0736】

治療された動物の血漿において観察されたTTRのほぼ完全なノックダウンは、アッセイされた組織におけるTTRタンパク質アミロイド沈着のクリアランスと相関していた。図25に示されるように、対照マウスは、ATTRを有するヒト対象において観察される病態生理学が似た組織においてアミロイド染色を示した。HuTTR V30M遺伝子座の編集による循環TTRの低減は、組織におけるアミロイド沈着の劇的な低減を引き起こした。TTR染色のおよそ85%以上の低減が、治療から8週間後に、治療された組織全体で観察された (図25)。

【0737】

実施例13. 初代ヒト肝細胞 (PHH) におけるTTR mRNAノックダウン

一実験において、PHHを培養し、実施例4に記載されるように、Cas9 mRNA (配列番号1) および目的のgRNA (図29、表36を参照されたい) を含むLNPで治療した。上述のクロスフロー手順を使用してLNPを調製し、それぞれPD-10カラムおよびAmicon遠心フィルタユニットを使用して精製し、濃縮した。LNPを、6.0のN:P比で製剤化し、LNPは、それぞれ、脂質A、コレステロール、DSPC、およびPEG2k-DMGを50:38:9:2のモル比で含有していた。LNPは、gRNA:mRNA比が1:2であり、細胞を300ngの用量で (送達されたmRNAカーゴの量に関する) 治療された。

【0738】

LNP治療 (各条件について生物学的三重反復を用いる) の96時間後、Dynabeads mRNA DIRECT Kit (ThermoFisher Scientific) を使用して、製造者のプロトコルに従って、mRNAをPHH細胞から精製した。逆転写 (RT) を、Maxima逆転写酵素 (ThermoFisher Scientific) およびポリdTプライマーを用いて行った。得られたcDNAをAmpure XPビーズ (Agencourt) で精製した。定量的PCRについて、2%の精製されたcDNAを、Taqman Fast Advanced Mastermixおよび3つのTaqmanプローブセット、TTR (アッセイID: Hs00174914_m1)、GAPDH (アッセイID: Hs02786624_g1)、およびPPIB (アッセイID: Hs00168719_m1) を使用して増幅した。製造者 (Life Technologies) の指示に従って、QuantStudio 7 Flex Real Time PCR Systemでアッセイを実施した。TTR mRNAの相対的な発現を、個々に内因性対照 (GAPDHおよびPPIB) に対して正規化することによって計算し、次いで平均化した。

【0739】

図29に示され、以下の表36に数値的に再現されるように、試験したLNP製剤の各々は、陰性 (未治療) 対照と比較して、TTR mRNAのノックダウンを引き起こした。図29および表36の群は、各LNP調製物において使用されるgRNA IDによって特定される。TTR mRNAの相対的な発現を図29にプロットし、一方、TTR mRNAのノックダウンパーセントを表36に提供する。

10

20

30

40

50

【表 3 8】

表 3 6.

ガイドID	ノックダウン%の平均	標準偏差
G000480	95.19	1.68
G000481	91.39	2.39
G000482	82.31	4.51
G000483	68.78	13.45
G000484	75.22	9.05
G000488	92.77	3.76
G000489	91.85	2.77
G000490	78.34	5.76
G000493	87.53	4.54
G000494	91.15	3.63
G000499	91.38	1.71
G000500	92.90	3.15
G000567	90.89	5.39
G000568	53.44	20.20
G000570	93.38	2.66
G000571	96.17	2.07
G000572	55.92	24.53

10

【0740】

別の実験において、G000480、G000486、およびG000502を含むLNPで治療した後、TTR mRNAノックダウンを評価した。LNPを製剤化し、PHHを培養し、細胞を100 ngの用量で（送達されるmRNAカーゴの量に関する）治療したことを除き、この実施例の上の実験で各々記載されるように、LNPで治療した。

20

【0741】

LNP治療（各条件について1回の治療）の96時間後、Dynabeads mRNA DIRECT Kit（ThermoFisher Scientific）を使用して、製造者のプロトコルに従って、mRNAをPHH細胞から精製した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（ThermoFisher Scientific）を使用して、製造者の指示に従って、逆転写（RT）を実施した。定量的PCRについて、2%のcDNAを、Taqman Fast Advanced Mastermixおよび3つのTaqmanプローブセット、TTR（アッセイID：Hs00174914__m1）、GAPDH（アッセイID：Hs02786624__g1）、およびPPIB（アッセイID：Hs00168719__m1）を使用して増幅した。製造者（Life Technologies）の指示に従って、QuantStudio 7 Flex Real Time PCR Systemでアッセイを実施した。TTR mRNAの相対的な発現を、個々に内因性対照（GAPDHおよびPPIB）に対して正規化することによって計算し、次いで平均化した。

30

【0742】

図30に示され、以下の表37に数値的に再現されるように、試験したLNP製剤の各々は、陰性（未治療）対照と比較して、TTR mRNAのノックダウンを引き起こした。図30および表37の群は、各LNP調製物において使用されるgRNA IDによって特定される。TTR mRNAの相対的な発現を図30にプロットし、一方、TTR mRNAのノックダウンパーセントを表37に提供する。

40

【表 3 9】

表 3 7.

ガイドID	ノックダウン%の平均	標準偏差
G000480	95.61	0.92
G000486	97.36	0.63
G000502	90.94	2.63

50

【0743】

実施例14．非ヒト霊長類へのコルチコステロイド前治療およびLNP送達

n = 3のコホートの雄カニクイザルを、NHP当たり1mg/kg、3mg/kg、または6mg/kg（RNA）を与えるように、デキサメタゾンおよび様々な用量のLNPで治療した。各製剤は、重量比1：2のgRNA：mRNA比で、Cas9 mRNA 000042（配列番号377）およびガイドRNA（gRNA）G000502（配列番号114）を含有していた。ビヒクル対照で治療した動物を除き、すべての動物は、LNP投与の1～2時間前に、静脈内ボラス注射によって2mg/kgでデキサメタゾン（Dex）前治療を受けた。用量のLNP（単位mg/kg、全RNA含有量）は、30分間の静脈内注入によって投与した。

10

【0744】

投与後15日目に、16ゲージのSuperCore生検ニードルを使用して、肝臓の右葉／側面を標的とする単一の超音波ガイド下経皮生検により、肝臓検体を収集した。動物ごとに、最小で1.5cm³の全肝生検試料を収集した。各生検検体を液体窒素中でフラッシュ凍結させ、-86～-60℃で保存した。前述のように、肝臓検体の編集分析をNGSシーケンシングによって行った。肝臓編集の結果、最大約70%の編集が実証され、すべての用量が十分に許容性であった。記載されたLNP治療に伴うコルチコステロイドの前治療は、十分に許容された。

【0745】

実施例14についての材料および方法。mRNAを、線状プラスミドDNAテンプレートおよびT7 RNAポリメラーゼを使用したインビトロ転写（IVT）によって合成した。転写は、一般に、T7プロモーター（配列番号231）、配列番号377（配列番号311のRNA ORFをコードする）などの本明細書に開示される転写配列、およびプラスミドにコードされるポリAテール（配列番号263）を含む構築物から行われた。

20

【0746】

すべての方法について、転写産物濃度を、260nm（Nanodrop）での光吸光度を測定することによって決定し、転写産物をBioanalyzer（Agilent）によるキャピラリー電気泳動によって分析した。

【0747】

LNP製剤化

脂質成分を、以下に記載される脂質構成要素モル比で100%エタノールに溶解した。化学修飾したsgRNAおよびCas9 mRNAを組み合わせ、25mMのクエン酸塩、100mMのNaCl、pH5.0に溶解し、およそ1.5mg/mLの全RNAカーゴ濃度を得た。LNPを、約6のN/P比で、以下に記載されるように、1：2 w/w比での化学修飾したsgRNA：Cas9 mRNAの比で、製剤化した。LNPを、50%の脂質A、9%のDSPC、38%のコレステロール、および3%のPEG2k-DMGで製剤化し、LNPを、実施例1に記載のクロスフロー技術によって形成した。混合中、差圧式流量を使用して、水性溶媒と有機溶媒の2：1の比を維持した。希釈したLNPを、タンジェンシャルフロー濾過を使用して濃縮し、次いで、濾過および貯蔵の前に、透析濾過により緩衝液を交換した。

30

【0748】

Cas9 mRNAおよびgRNAカーゴ

キャップされたポリアデニル化Cas9 mRNAを、実施例1に記載の方法を使用して、線状プラスミドDNAテンプレートおよびT7 RNAポリメラーゼを使用したインビトロ転写によって生成した。

【0749】

ゲノムDNA単離

ゲノムDNAを、肝臓試料から、50μL／ウェルのBuccalAmp DNA Extraction溶液（Epicentre、カタログQE09050）を使用して、製造業者のプロトコルに従って抽出した。すべてのDNA試料に対し、本明細書に記載され

40

50

るように、PCRおよびその後のNGS分析を行った。

【0750】

NGSシーケンシング

簡単に述べると、ゲノム中の標的位置での編集効率を定量的に決定するために、ゲノムDNAが単離され、ディープシーケンシングを利用して、遺伝子編集によって導入された挿入および欠失の存在を特定した。

【0751】

標的部位（例えば、TTR）の周りのPCRプライマーを設計し、目的のゲノム領域を増幅した。プライマー配列を以下に提供する。シーケンシングのために必要な化学的性質を付加するために製造業者（Illumina）のプロトコルに従って追加のPCRを行った。アンプリコンをIllumina MiSeq装置でシーケンシングした。低品質スコアを有するものを除外した後に、リードをカニクイザル参照ゲノム（例えばmacFas5）とアラインメントした。得られたリードを含むファイルを、参照ゲノム（BAMファイル）にマッピングし、目的の標的領域と重なり合うリードを選択し、挿入、置換、もしくは欠失を含むリードの数に対する、野生型リードの数を計算した。

【0752】

編集パーセンテージ（例えば、「編集効率」および「編集パーセント」）は、野生型を含む配列リードの総数に対する、挿入もしくは欠失を有する配列リードの総数として定義される。

【0753】

実施例15：カニクイザルにおける30分間および2時間の静脈内注入を介して投与した複数回用量LNP研究

n = 3のコホートの雄のカニクイザルに、LNPまたはビヒクル対照投与の少なくとも1時間前に、2mg/kgの静脈内ボラス注射を介してデキサメタゾン（Dex）を投与した。各コホートは、NHP当たり3mg/kgまたは6mg/kg（RNA）を提供するために、様々な用量のLNPを摂取した。投薬群を表38に示す。2つのコホートは、注入時間を比較するために、3mg/kgのLNP用量を摂取した。Cas9 mRNAおよびガイドRNAを含有する製剤を、以下および実施例14で説明するように調製した。LNP製剤を、以下および実施例14に記載されるように調製した。3mg/kgのLNP用量（全RNA含有量）を摂取したコホートに、30分間または120分間の静脈内注入によって投与した。様々な用量のLNP（単位mg/kg、全RNA含有量）を有する他のコホートはすべて、120分間の静脈内注入によって投与した。

【表40】

表38：注人試験投薬群

群番号	試験材料	用量レベル (mg/kg)	注人時間 (分)	動物の数
1	TSS対照	0	120	3
2	LNP	3.0	120	3
3	LNP	3.0	30	3
4	LNP	6.0	120	3

【表41】

表39：編集%および血清TTR

群番号	肝臓編集 (%)	TTR%低減
1	0.0 (0.0, -	-28 (-34, -
2	63.3 (50.	85 (66, 95,
3	63.3 (65.	88 (90, 89,
4	74.5 (75.	96 (97, 96,

10

20

30

40

50

【0754】

投与後29日目に、ケタミン／キシラジンの筋肉内注射下で、16ゲージのSuper Core生検ニードルを使用して、肝臓の右葉／側面を標的とする単一の超音波ガイド下経皮生検により、肝臓検体を収集した。動物ごとに、 $1.0\text{ cm}^3 \sim 1.5\text{ cm}^3$ の全肝生検試料を収集した。各生検検体を液体窒素中でフラッシュ凍結させ、 -80°C で保存した。前述のように、肝臓検体の編集分析をNGSシーケンシングによって行い、図31Bに示す。肝臓編集の結果、最大約70%の編集が実証された。血清TTRレベルを図31Aに示す。記載されたLNP治療に伴うコルチコステロイドの前治療は、十分に許容された。

【表42】

表40：アラニントランスアミナーゼ（ALT）レベル

群	出血前		6時間		24時間		48時間		7日H		29日H	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
群1：TS S	49.0	1.1	17.6	3.2	17.3	2.1	15.6	2.7	7.0	4.5	4.9	8.8
群2：3m pk 2時間注入	40.3	9.0	7.6	1.8	7.0	1.3	5.0	1.6	4.0	7.5	3.7	7.0
群3：3m pk 30分間の注入	50.3	7.5	14.9	1.3	28.3	3.5	23.6	2.9	8.8	8.1	3.5	6.3
群4：6m pk 2時間注入	30.6	1.2	10.8	4.8	16.0	8.7	20.9	1.7	6.5	3.2	2.7	7.5

【0755】

試料を、それぞれ表39および図31A～図31Bならびに表40および図31Cに示されるように、編集パーセントデータ、血清TTRデータ、およびアラニントランスアミナーゼ（ALT）レベルについて分析した。肝臓編集および血清TTRデータの結果は、30分間の注入時間による3mg/kg用量と、120分間の注入時間による3mg/kg用量との間に効力に有意差がないことを実証する。しかしながら、30分間より長い注入時間の投与は、肝臓損傷バイオマーカーであるALTのレベル減少を示す。ALTレベルは、3mg/kg用量において、30分間の注入時間の方が高いことが観察され、これは、潜在的な肝臓ストレスを示している。

【0756】

実施例4についての材料および方法

mRNAを、線状プラスミドDNAテンプレートおよびT7 RNAポリメラーゼを使

用したインビトロ転写（I V T）によって合成した。転写は、一般に、T 7プロモーター（配列番号231）、配列番号377（配列番号311のRNA ORFをコードする）などの本明細書に開示される転写配列、およびプラスミドにコードされるポリAテール（配列番号263）を含む構築物から行われた。

【0757】

すべての方法について、転写産物濃度を、260nm（Nanodrop）での光吸光度を測定することによって決定し、転写産物をBioanalyzer（Agilent）によるキャピラリー電気泳動によって分析した。

【0758】

LNP製剤化

脂質成分を、以下に記載される脂質構成要素モル比で100%エタノールに溶解した。化学修飾したsgRNAおよびCas9 mRNAを組み合わせ、25mMのクエン酸塩、100mMのNaCl、pH5.0に溶解し、およそ1.5mg/mLの全RNAカーゴ濃度を得た。LNPを、約6のN/P比で、以下に記載されるように、1:2 w/w比での化学修飾したsgRNA:Cas9 mRNAの比で、製剤化した。LNPを、50%の脂質A、9%のDSPC、38%のコレステロール、および3%のPEG2k-DMGで製剤化し、LNPを、実施例1に記載のクロスフロー技術によって形成した。混合中、差圧式流量を使用して、水性溶媒と有機溶媒の2:1の比を維持した。希釈したLNPを、タンジェンシャルフロー濾過を使用して濃縮し、次いで、濾過および貯蔵の前に、透析濾過により緩衝液を交換した。

【0759】

Cas9 mRNAおよびgRNAカーゴ

キャップされたポリアデニル化Cas9 mRNAを、実施例1に記載の方法を使用して、線状プラスミドDNAテンプレートおよびT7 RNAポリメラーゼを使用したインビトロ転写によって生成した。

【0760】

ゲノムDNA単離

ゲノムDNAを、肝臓試料から、50μL/ウェルのBuccalAmp DNA Extraction溶液（Epicentre、カタログQE09050）を使用して、製造業者のプロトコルに従って抽出した。すべてのDNA試料に対し、本明細書に記載されるように、PCRおよびその後のNGS分析を行った。

【0761】

NGSシーケンシング

簡単に述べると、ゲノム中の標的位置での編集効率を定量的に決定するために、ゲノムDNAが単離され、ディープシーケンシングを利用して、遺伝子編集によって導入された挿入および欠失の存在を特定した。

【0762】

標的部位（例えば、TTR）の周りのPCRプライマーを設計し、目的のゲノム領域を増幅した。プライマー配列を以下に提供する。シーケンシングのために必要な化学的性質を付加するために製造業者（Illumina）のプロトコルに従って追加のPCRを行った。アンプリコンをIllumina MiSeq装置でシーケンシングした。低品質スコアを有するものを除外した後に、リードをカニクイザル参照ゲノム（例えばmacFa5）とアラインメントした。得られたリードを含むファイルを、参照ゲノム（BAMファイル）にマッピングし、目的の標的領域と重なり合うリードを選択し、挿入、置換、もしくは欠失を含むリードの数に対する、野生型リードの数を計算した。

【0763】

編集パーセンテージ（例えば、「編集効率」および「編集パーセント」）は、野生型を含む配列リードの総数に対する、挿入もしくは欠失を有する配列リードの総数として定義される。

【0764】

実施例 16：追加の番号付けされた実施形態

以下の追加の実施形態が提供される。

【0765】

実施形態 A 1 は、組成物であって、

(i) RNA ガイド DNA 結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸であって、

a. オープンリーディングフレームが、配列番号 311 と少なくとも 93% の同一性を有する配列を含み、かつ／あるいは

b. オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の 50、200、250、もしくは 300 個のヌクレオチドにわたって配列番号 311 と少なくとも 93% の同一性を有するか、または少なくともその最初の 30、50、70、100、150、200、250、もしくは 300 個のヌクレオチドにわたって配列番号 311 と少なくとも 95% の同一性を有し、かつ／あるいは

c. オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくは 100% が表 4 に列挙されるコドン、表 5 の低 A セット、または表 5 の低 A / U セットであるコドンのセットからなり、かつ／あるいは

d. オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の 123% の範囲であり、かつ／あるいは

e. オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の 150% の範囲である、核酸と、

(ii) ガイド RNA もしくはガイド RNA をコードするベクターであって、ガイド RNA が、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択されるガイド配列を含む、ガイド RNA もしくはガイド RNA をコードするベクターと、を含む、組成物である。

【0766】

実施形態 A 2 は、TTR 遺伝子を修飾し、かつ／または TTR 遺伝子内で二本鎖切断 (DSB) を誘導する方法であって、組成物を細胞に送達することを含み、組成物が、

(i) RNA ガイド DNA 結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸であって、

a. オープンリーディングフレームが、配列番号 311 と少なくとも 93% の同一性を有する配列を含み、かつ／あるいは

b. オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の 50、200、250、もしくは 300 個のヌクレオチドにわたって配列番号 311 と少なくとも 93% の同一性を有するか、または少なくともその最初の 30、50、70、100、150、200、250、もしくは 300 個のヌクレオチドにわたって配列番号 311 と少なくとも 95% の同一性を有し、かつ／あるいは

c. オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくは 100% が表 4 に列挙されるコドン、表 5 の低 A セット、または表 5 の低 A / U セットであるコドンのセットからなり、かつ／あるいは

d. オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の 123% の範囲であり、かつ／あるいは

e. オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の 150% の範囲である、核酸と、

(ii) ガイド RNA もしくはガイド RNA をコードするベクターであって、ガイド RNA が、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択されるガイド配列を含む、ガイド RNA もしくはガイド RNA をコードするベクターと、を含む、方法である。

【0767】

実施形態 A 3 は、対象において TTR 血清濃度を低減し、TTR に関連するアミロイドーシス (ATTR) を治療し、かつ／または TTR を含むアミロイドもしくはアミロイド

10

20

30

40

50

原線維の蓄積を低減もしくは予防する方法であって、それを必要とする対象に組成物を投与することを含み、組成物が、

(i) RNAガイドDNA結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸であって、

a. オープンリーディングフレームが、配列番号311と少なくとも95%の同一性を有する配列を含み、かつ／あるいは

b. オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の30、50、70、100、150、200、250、もしくは300個のヌクレオチドにわたって配列番号311と少なくとも95%の同一性を有し、かつ／あるいは

c. オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくは100%が表4に列挙されるコドン、表5の低Aセット、または表5の低A/Uセットであるコドンのセットからなり、かつ／あるいは

d. オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の150%の範囲であり、かつ／あるいは

e. オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の150%の範囲である、核酸と、

(ii) ガイドRNAもしくはガイドRNAをコードするベクターであって、ガイドRNAが、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択されるガイド配列を含む、ガイドRNAもしくはガイドRNAをコードするベクターと、を含み、それによって、対象においてTTR血清濃度を低減し、TTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を治療し、かつ／またはTTRを含むアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する、方法である。

【0768】

実施形態A4は、ガイドRNAが、配列番号5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、17、22、23、27、29、30、35、36、37、38、55、61、63、65、66、68、または69から選択されるガイド配列を含む、先行実施形態のいずれか1つの組成物または方法である。

【0769】

実施形態A5は、細胞または対象においてTTR遺伝子内の二本鎖切断(DSB)を誘導する際に使用するための、実施形態A1またはA4の組成物である。

【0770】

実施形態A6は、細胞または対象においてTTR遺伝子を修飾する際に使用するための、実施形態A1、A4、またはA5の組成物である。

【0771】

実施形態A7は、対象においてTTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を治療する際に使用するための、実施形態A1、A4、A5、またはA6の組成物である。

【0772】

実施形態A8は、対象においてTTR血清濃度を低減する際に使用するための、実施形態A1、A4、A5、A6、またはA7の組成物である。

【0773】

実施形態A9は、対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する際に使用するための、実施形態A1、A4、A5、A6、A7、またはA8の組成物である。

【0774】

実施形態A10は、本方法が、30分間より長い注入によって組成物を投与することを含む、実施形態A2～A9のいずれか1つの使用のための組成物または方法である。

【0775】

実施形態A11は、組成物が、約45～75分間、75～105分間、105～135分間、135～165分間、165～195分間、195～225分間、225～255

10

20

30

40

50

分間、255～285分間、285～315分間、315～345分間、または345～375分間の注入によって投与される、実施形態A10の方法または使用のための組成物である。

【0776】

実施形態A12は、組成物が、約1.5～6時間の注入によって投与される、実施形態A10または11の方法または使用のための組成物である。

【0777】

実施形態A13は、組成物が、約60分間、約90分間、約120分間、約150分間、約180分間、または約240分間の注入によって投与される、実施形態A10の方法または使用のための組成物である。

【0778】

実施形態A14は、組成物が、約120分間の注入によって投与される、実施形態A10の方法または使用のための組成物である。

【0779】

実施形態A15は、組成物が、血清TTRレベルを低減する、実施形態A2～A14のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0780】

実施形態A16は、組成物の投与前の血清TTRレベルと比較して、血清TTRレベルが少なくとも50%低減される、実施形態A15の方法または使用のための組成物である。

【0781】

実施形態A17は、組成物の投与前の血清TTRレベルと比較して、50～60%、60～70%、70～80%、80～90%、90～95%、95～98%、98～99%、もしくは99～100%、血清TTRレベルを低減する、実施形態A151の方法または使用のための組成物である。

【0782】

実施形態A18は、組成物がTTR遺伝子の編集を引き起こす、実施形態A2～17のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0783】

実施形態A19は、編集が、編集される集合体のパーセンテージ（編集パーセント）として計算される、実施形態A18の方法または使用のための組成物である。

【0784】

実施形態A20は、編集パーセントが、集合体の30～99%である、実施形態A19の方法または使用のための組成物である。

【0785】

実施形態A21は、編集パーセントが、集合体の30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または95～99%である、実施形態A19の方法または使用のための組成物である。

【0786】

実施形態A22は、組成物が、少なくとも1つの組織におけるアミロイド沈着を低減する、実施形態A2～A21のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0787】

実施形態A23は、少なくとも1つの組織が、胃、結腸、坐骨神経、または後根神経節のうちの1つ以上を含む、実施形態A22の方法または使用のための組成物である。

【0788】

実施形態A24は、アミロイド沈着が、組成物の投与の8週間後に測定される、実施形態A22または23の方法または使用のための組成物である。

【0789】

実施形態A25は、アミロイド沈着が、陰性対照、または組成物の投与前に測定されるレベルと比較される、実施形態A22～A24のいずれか1つの方法または使用のための

10

20

30

40

50

組成物である。

【0790】

実施形態A26は、アミロイド沈着が、生検試料において、および／または免疫染色によって測定される、実施形態A22～A25のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0791】

実施形態A27は、アミロイド沈着が、陰性対照においてみられるアミロイド沈着の30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または95～99%低減する、実施形態A22～A26のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

10

【0792】

実施形態A28は、アミロイド沈着が、組成物の投与前にみられるアミロイド沈着の30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または95～99%低減する、実施形態A22～A27のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0793】

実施形態A29は、組成物が、少なくとも2回投与または送達される、実施形態A2～A28のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

20

【0794】

実施形態A30は、組成物が、少なくとも3回投与または送達される、実施形態A29の方法または使用のための組成物である。

【0795】

実施形態A31は、組成物が、少なくとも4回投与または送達される、実施形態A29の方法または使用のための組成物である。

【0796】

実施形態A32は、組成物が、最大5回、6回、7回、8回、9回、または10回投与または送達される、実施形態A29の方法または使用のための組成物である。

【0797】

実施形態A33は、投与または送達が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15日間の間隔で行われる、実施形態A29～A32のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

30

【0798】

実施形態A34は、投与または送達が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15週間の間隔で行われる、実施形態A29～A32のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0799】

実施形態A35は、投与または送達が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヶ月間の間隔で行われる、実施形態A29～A32のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

40

【0800】

実施形態A36は、ガイドRNAが、ガイド配列を含み、かつ配列番号126のヌクレオチド配列をさらに含むcrRNAを含み、配列番号126のヌクレオチドが、ガイド配列にその3'末端で続く、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0801】

実施形態A37は、ガイドRNAが、デュアルガイド(dgRNA)である、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0802】

実施形態A38は、デュアルガイドRNAが、配列番号126のヌクレオチド配列を含

50

み、配列番号126のヌクレオチドがガイド配列にその3'末端で続くcrRNAと、trRNAと、を含む、実施形態A37の方法または組成物である。

【0803】

実施形態A39は、ガイドRNAが、シングルガイド(sgRNA)である、実施形態A1~A36のいずれか1つの方法または組成物である。

【0804】

実施形態A40は、sgRNAが、配列番号3のパターンを有するガイド配列を含む、実施形態A39の方法または組成物である。

【0805】

実施形態A41は、sgRNAが、配列番号3の配列を含む、実施形態A39の方法または組成物である。

10

【0806】

実施形態A42は、sgRNAが、配列番号5~72、74~78、および80~82のガイド配列、ならびに配列番号126のヌクレオチドのうちのいずれか1つを含む、実施形態A39~A41のいずれか1つの方法または組成物である。

【0807】

実施形態A43は、sgRNAが、配列番号87~113、115~120、および122~124から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一である配列を含む、実施形態A39~A42のいずれか1つの方法または組成物である。

20

【0808】

実施形態A44は、sgRNAが、配列番号87~113、115~120、および122~124から選択される配列を含む、実施形態A39の方法または組成物である。

【0809】

実施形態A45は、ガイドRNAが、少なくとも1つの修飾を含む、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0810】

実施形態A46は、少なくとも1つの修飾が、2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチドを含む、実施形態A45の方法または組成物である。

【0811】

実施形態A47は、少なくとも1つの修飾が、ヌクレオチド間ホスホロチオエート(PS)結合を含む、実施形態A45または46の方法または組成物である。

30

【0812】

実施形態A48は、少なくとも1つの修飾が、2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチドを含む、実施形態A45~A47のいずれか1つの方法または組成物である。

【0813】

実施形態A49は、少なくとも1つの修飾が、5'末端における最初の5個のヌクレオチドのうちの1つ以上における修飾を含む、実施形態A45~A48のいずれか1つの方法または組成物である。

【0814】

実施形態A50は、少なくとも1つの修飾が、3'末端における最後の5個のヌクレオチドのうちの1つ以上における修飾を含む、実施形態A45~A49のいずれか1つの方法または組成物である。

40

【0815】

実施形態A51は、少なくとも1つの修飾が、最初の4個のヌクレオチド間のPS結合を含む、実施形態A45~A50のいずれか1つの方法または組成物である。

【0816】

実施形態A52は、少なくとも1つの修飾が、最後の4個のヌクレオチド間のPS結合を含む、実施形態A45~A51のいずれか1つの方法または組成物である。

【0817】

50

実施形態 A 5 3 は、少なくとも 1 つの修飾が、5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドに 2'-O-Me 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 A 4 5 ~ A 5 2 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0818】

実施形態 A 5 4 は、少なくとも 1 つの修飾が、3' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドに 2'-O-Me 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 A 4 5 ~ A 5 3 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0819】

実施形態 A 5 5 は、ガイド RNA が、配列番号 3 の修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 A 4 5 ~ A 5 4 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0820】

実施形態 A 5 6 は、組成物が、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、実施形態 A 1 ~ A 5 5 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0821】

実施形態 A 5 7 は、ガイド RNA および RNA ガイド DNA 結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸が、脂質ナノ粒子 (LNP) と会合している、実施形態 A 1 ~ A 5 6 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0822】

実施形態 A 5 8 は、LNP が、CCD 脂質を含む、実施形態 A 5 7 の方法または組成物である。

【0823】

実施形態 A 5 9 は、CCD 脂質が、脂質 A または脂質 B であり、任意選択で、CCD 脂質が、脂質 A である、実施形態 A 5 8 の方法または組成物である。

【0824】

実施形態 A 6 0 は、LNP が、ヘルパー脂質を含む、実施形態 A 5 7 ~ A 5 9 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0825】

実施形態 A 6 1 は、ヘルパー脂質が、コレステロールである、実施形態 A 6 0 の方法または組成物である。

【0826】

実施形態 A 6 2 は、LNP が、ステルス脂質 (例えば、PEG 脂質) を含む、実施形態 A 5 7 ~ A 6 1 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0827】

実施形態 A 6 3 は、ステルス脂質が、PEG 2 k-DMG である、実施形態 A 6 2 の方法または組成物である。

【0828】

実施形態 A 6 4 は、

(i) LNP が、脂質成分を含み、脂質成分が、約 50 ~ 60 mol % の脂質 A などのアミン脂質と、約 8 ~ 10 mol % の中性脂質と、約 2.5 ~ 4 mol % のステルス脂質 (例えば、PEG 脂質) とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP 組成物の N/P 比が、約 6 であり、

(ii) LNP が、約 50 ~ 60 mol % の脂質 A などのアミン脂質と、約 27 ~ 39.5 mol % のヘルパー脂質と、約 8 ~ 10 mol % の中性脂質と、約 2.5 ~ 4 mol % のステルス脂質 (例えば、PEG 脂質) とを含み、LNP 組成物の N/P 比が、約 5 ~ 7 (例えば、約 6) であり、

(iii) LNP が、脂質成分を含み、脂質成分が、約 50 ~ 60 mol % の脂質 A などのアミン脂質と、約 5 ~ 15 mol % の中性脂質と、約 2.5 ~ 4 mol % のステルス脂質 (例えば、PEG 脂質) とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP 組成物の N/P 比が約 3 ~ 10 であり、

(iv) LNP が、脂質成分を含み、脂質成分が、約 40 ~ 60 mol % の脂質 A などの

10

20

30

40

50

アミン脂質と、約5～15mol%の中性脂質と、約2.5～4mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約6であり、

(v) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約50～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約5～15mol%の中性脂質と、約1.5～10mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約6であり、

(vi) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約40～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約0～10mol%の中性脂質と、約1.5～10mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約3～10であり、

(vii) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約40～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約1mol%未満の中性脂質と、約1.5～10mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が約3～10であり、

(viii) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約40～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約1.5～10mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が約3～10であり、LNP組成物が、中性リン脂質を本質的に含まないか、または含まず、あるいは

(ix) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約50～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約8～10mol%の中性脂質と、約2.5～4mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が約3～7である、実施形態A57～A63のいずれか1つの方法または組成物である。

【0829】

実施形態A64aは、PEG脂質のmol%が、約3である、実施形態A64の方法または組成物である。

【0830】

実施形態A64bは、アミン脂質のmol%が、約50である、実施形態A64またはA64aの方法または組成物である。

【0831】

実施形態A64cは、アミン脂質のmol%が、約55である、実施形態A64～A64bのいずれか1つの方法または組成物である。

【0832】

実施形態A64dは、アミン脂質のmol%が、±3mol%である、実施形態A64～A64cのいずれか1つの方法または組成物である。

【0833】

実施形態A64eは、アミン脂質のmol%が、±2mol%である、実施形態A64～A64dのいずれか1つの方法または組成物である。

【0834】

実施形態A64fは、アミン脂質のmol%が、47～53mol%である、実施形態A64～A64eのいずれか1つの方法または組成物である。

【0835】

実施形態A64gは、アミン脂質のmol%が、48～53mol%である、実施形態A64～A64fのいずれか1つの方法または組成物である。

【0836】

実施形態A64hは、アミン脂質のmol%が、53～57mol%である、実施形態A64～A64gのいずれか1つの方法または組成物である。

【0837】

実施形態A64iは、N/P比が、6±1である、実施形態A64～A64hのいずれ

10

20

30

40

50

か1つの方法または組成物である。

【0838】

実施形態A64jは、N/P比が、 6 ± 0.5 である、実施形態A64～A64iのいずれか1つの方法または組成物である。

【0839】

実施形態A64kは、アミン脂質が、脂質Aである、実施形態A64～A64jのいずれか1つの方法または組成物である。

【0840】

実施形態A64lは、アミン脂質が、脂質Aの類似体である、実施形態A64～A64lのいずれか1つの方法または組成物である。

【0841】

実施形態A64mは、類似体が、アセタール類似体である、実施形態A64lの方法または組成物である。

【0842】

実施形態A64nは、アセタール類似体が、C4～C12アセタール類似体である、実施形態A64mの方法または組成物である。

【0843】

実施形態A64oは、アセタール類似体が、C5～C12アセタール類似体である、実施形態A64mの方法または組成物である。

【0844】

実施形態A64pは、アセタール類似体が、C5～C10アセタール類似体である、実施形態A64mの方法または組成物である。

【0845】

実施形態A64qは、アセタール類似体が、C4、C5、C6、C7、C9、C10、C11、およびC12類似体から選択される、実施形態A64mの方法または組成物である。

【0846】

実施形態A64rは、ヘルパー脂質が、コレステロールである、実施形態A64～A64qのいずれか1つの方法または組成物である。

【0847】

実施形態A64sは、中性脂質が、DSPCである、実施形態A64～A64rのいずれか1つの方法または組成物である。

【0848】

実施形態A64tは、中性脂質が、DPPCである、実施形態A64～A64sのいずれか1つの方法または組成物である。

【0849】

実施形態A64uは、PEG脂質が、ジミリストイルグリセロール(DMG)を含む、実施形態A64～A64tのいずれか1つの方法または組成物である。

【0850】

実施形態A64vは、PEG脂質が、PEG-2kを含む、実施形態A64～A64uのいずれか1つの方法または組成物である。

【0851】

実施形態A64wは、PEG脂質が、PEG-DMGである、実施形態A64～A64vのいずれか1つの方法または組成物である。

【0852】

実施形態A64xは、PEG-DMGが、PEG2k-DMGである、実施形態A64wの方法または組成物である。

【0853】

実施形態A64yは、LNP組成物が、中性脂質を本質的に含まない、実施形態A64～A64xのいずれか1つの方法または組成物である。

10

20

30

40

50

【0854】

実施形態A64zは、中性脂質が、リン脂質である、実施形態A64yの方法または組成物である。

【0855】

実施形態A65は、LNPが、中性脂質を含み、任意選択で、中性脂質が、DSPCである、実施形態A57～A64zのいずれか1つの方法または組成物である。

【0856】

実施形態A66は、アミン脂質が、約50mol%で存在する、実施形態A64またはA65の方法または組成物である。

【0857】

実施形態A67は、中性脂質が、約9mol%で存在する、実施形態A64～A66のいずれか1つの方法または組成物である。

【0858】

実施形態A68は、ステルス脂質が、約3mol%で存在する、実施形態A62～A67のいずれか1つの方法または組成物である。

【0859】

実施形態A69は、ヘルパー脂質が、約38mol%で存在する、実施形態A60～A68のいずれか1つの方法または組成物である。

【0860】

実施形態A70は、LNPが、約6のN/P比を有する、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0861】

実施形態A71は、LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約50mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約9mol%のDSPCなどの中性脂質と、約3mol%のPEG脂質などのステルス脂質（例えば、PEG2k-DMG）とを含み、脂質成分の残りが、コレステロールなどのヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約6である、実施形態A70の方法または組成物である。

【0862】

実施形態A72は、アミン脂質が、脂質Aである、実施形態A64～A71のいずれか1つの方法または組成物である。

【0863】

実施形態A73は、中性脂質が、DSPCである、実施形態A64～A72のいずれか1つの方法または組成物である。

【0864】

実施形態A74は、ステルス脂質が、PEG2k-DMGである、実施形態A62～A73のいずれか1つの方法または組成物である。

【0865】

実施形態A75は、ヘルパー脂質が、コレステロールである、実施形態A60～A74のいずれか1つの方法または組成物である。

【0866】

実施形態A76は、LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約50mol%の脂質Aと、約9mol%のDSPCと、約3mol%のPEG2k-DMGとを含み、脂質成分の残りが、コレステロールであり、LNP組成物のN/P比が、約6である、実施形態A70のいずれか1つの方法または組成物である。

【0867】

実施形態A77は、RNAガイドDNA結合剤が、Casクリパーゼである、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0868】

実施形態A78は、RNAガイドDNA結合剤が、Cas9である、実施形態A77の方法または組成物である。

10

20

30

40

50

【0869】

実施形態A79は、RNAガイドDNA結合剤が修飾されている、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0870】

実施形態A80は、修飾RNAガイドDNA結合剤が、核局在化シグナル(NLS)を含む、実施形態A79の方法または組成物である。

【0871】

実施形態A81は、RNAガイドDNA結合剤が、II型CRISPR/Cas系由来のCasである、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0872】

実施形態A82は、組成物が、薬学的製剤であり、薬学的に許容される担体をさらに含む、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0873】

実施形態A83は、組成物が、TTRを含むアミロイドまたはアミロイド原線維を低減または予防する、実施形態A2～A82のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0874】

実施形態A84は、アミロイドまたはアミロイド原線維が、神経、心臓、または消化管内のものである、実施形態A83の方法または使用のための組成物である。

【0875】

実施形態A85は、非相同性末端結合(NHEJ)が、TTR遺伝子におけるDSBの修復中に変異を引き起こす、実施形態A2～A84のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0876】

実施形態A86は、NHEJが、TTR遺伝子におけるDSBの修復中にヌクレオチドの欠失または挿入を引き起こす、実施形態A85の方法または使用のための組成物である。

【0877】

実施形態A87は、ヌクレオチド変異の欠失または挿入が、TTR遺伝子においてフレームシフトまたはナンセンスを誘導する、実施形態A86の方法または使用のための組成物である。

【0878】

実施形態A88は、フレームシフトまたはナンセンス変異が、肝臓細胞の少なくとも50%のTTR遺伝子において誘導される、実施形態A86の方法または使用のための組成物である。

【0879】

実施形態A89は、フレームシフトまたはナンセンス変異が、肝臓細胞の50%～60%、60%～70%、70%または80%、80%～90%、90～95%、95%～99%、または99%～100%のTTR遺伝子において誘導される、実施形態A88の方法または使用のための組成物である。

【0880】

実施形態A90は、ヌクレオチドの欠失または挿入が、TTR遺伝子において、オフターゲット部位におけるよりも少なくとも50倍以上生じる、実施形態A86～A89のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0881】

実施形態A91は、ヌクレオチドの欠失または挿入が、TTR遺伝子において、オフターゲット部位におけるよりも50倍～150倍、150倍～500倍、500倍～1500倍、1500倍～5000倍、5000倍～15000倍、15000倍～30000倍、または30000倍～60000倍多く生じる、実施形態A90の方法または使用のための組成物である。

【0882】

10

20

30

40

50

実施形態 A 9 2 は、ヌクレオチドの欠失または挿入が、初代ヒト肝細胞において 3 個以下、2 個以下、1 個以下、または 0 個のオフターゲット部位で生じ、任意選択で、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域では生じない、実施形態 A 8 6 ~ A 9 1 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0883】

実施形態 A 9 3 は、ヌクレオチドの欠失または挿入が、Cas9 を過剰発現する細胞においてヌクレオチドの欠失または挿入が生じるオフターゲット部位の数より少ない数の初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位で生じ、任意選択で、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域内で発生しない、実施形態 A 9 2 の方法または使用のための組成物である。

【0884】

実施形態 A 9 4 は、Cas9 を過剰発現する細胞が、Cas9 を安定して発現する HEK293 細胞である、実施形態 A 9 3 の方法または使用のための組成物である。

【0885】

実施形態 A 9 5 は、初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位の数が、Cas9 mRNA およびガイド RNA でインビトロでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞由来のゲノム DNA を分析することによって決定され、任意選択で、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域内で発生しない、実施形態 A 9 2 ~ A 9 4 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0886】

実施形態 A 9 6 は、初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位の数が、Cas9 mRNA、ガイド RNA およびドナーオリゴヌクレオチドでインビトロでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞由来のゲノム DNA を分析することを含むオリゴヌクレオチド挿入アッセイによって決定され、任意選択で、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域内で発生しない、実施形態 A 9 2 ~ A 9 4 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0887】

実施形態 A 9 7 は、ガイド RNA の配列が、

a) 配列番号 9 2 もしくは 1 0 4、

b) 配列番号 8 7、8 9、9 6、もしくは 1 1 3、

c) 配列番号 1 0 0、1 0 2、1 0 6、1 1 1、もしくは 1 1 2、または

d) 配列番号 8 8、9 0、9 1、9 3、9 4、9 5、9 7、1 0 1、1 0 3、1 0 8、もしくは 1 0 9 である、実施形態 A 1 ~ A 3 6 または A 3 9 ~ A 9 6 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0888】

実施形態 A 9 8 は、ガイド RNA が、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域内で発生するオフターゲット部位でインデルを生成しない、実施形態 A 9 7 の方法または組成物である。

【0889】

実施形態 A 9 9 は、組成物を投与することで、対象における TTR のレベルを低減する、実施形態 A 2 ~ 9 8 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0890】

実施形態 A 1 0 0 は、TTR のレベルが、少なくとも 5 0 % 低減する、実施形態 A 9 9 の方法または使用のための組成物である。

【0891】

実施形態 A 1 0 1 は、TTR のレベルが、5 0 % ~ 6 0 %、6 0 % ~ 7 0 %、7 0 % または 8 0 %、8 0 % ~ 9 0 %、9 0 ~ 9 5 %、9 5 % ~ 9 9 %、または 9 9 % ~ 1 0 0 % 低減する、実施形態 A 1 0 0 の方法または使用のための組成物である。

【0892】

実施形態 A 1 0 2 は、TTR のレベルが、血清、血漿、血液、脳脊髄液、または喀痰に

10

20

30

40

50

において測定される、実施形態 A 1 0 0 または A 1 0 1 の方法または使用のための組成物である。

【0893】

実施形態 A 1 0 3 は、T T R のレベルが、肝臓、脈絡叢、および／または網膜において測定される、実施形態 A 1 0 0 または A 1 0 1 の方法または使用のための組成物である。

【0894】

実施形態 A 1 0 4 は、T T R のレベルが、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) を介して測定される、実施形態 A 9 9 ～ A 1 0 3 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0895】

実施形態 A 1 0 5 は、対象が、A T T R を有する、実施形態 A 2 ～ A 1 0 4 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0896】

実施形態 A 1 0 6 は、対象が、ヒトである、実施形態 A 2 ～ A 1 0 5 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0897】

実施形態 A 1 0 7 は、対象が、A T T R w t を有する、実施形態 A 1 0 5 または 1 0 6 の方法または使用のための組成物である。

【0898】

実施形態 A 1 0 8 は、対象が、遺伝性 A T T R を有する、実施形態 A 1 0 5 または 1 0 6 の方法または使用のための組成物である。

【0899】

実施形態 A 1 0 9 は、対象が、A T T R の家族歴を有する、実施形態 A 2 ～ A 1 0 6 または A 1 0 8 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0900】

実施形態 A 1 1 0 は、対象が、家族性アミロイドポリニューロパチーを有する、実施形態 A 2 ～ A 1 0 6 または A 1 0 8 ～ A 1 0 9 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0901】

実施形態 A 1 1 1 は、対象が、A T T R の神経症状のみ、または主に A T T R の神経症状を有する、実施形態 A 2 ～ A 1 1 0 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0902】

実施形態 A 1 1 2 は、対象が、家族性アミロイド心筋症を有する、実施形態 A 2 ～ A 1 1 1 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0903】

実施形態 A 1 1 3 は、対象が、A T T R の心臓症状のみ、または主に A T T R の心臓症状を有する、実施形態 A 2 ～ A 1 1 0 または 1 1 2 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0904】

実施形態 A 1 1 4 は、対象が、V 3 0 変異を有する T T R を発現する、実施形態 A 2 ～ A 1 1 3 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0905】

実施形態 A 1 1 5 は、V 3 0 変異が、V 3 0 A、V 3 0 G、V 3 0 L、または V 3 0 M である、実施形態 A 1 1 4 の方法または使用のための組成物である。

【0906】

実施形態 A 1 1 6 は、対象が、T 6 0 変異を有する T T R を発現する、実施形態 A 2 ～ A 1 1 3 のいずれか 1 つの方法または使用のための組成物である。

【0907】

実施形態 A 1 1 7 は、T 6 0 変異が、T 6 0 A である、実施形態 A 1 1 6 の方法または

10

20

30

40

50

使用のための組成物である。

【0908】

実施形態A118は、対象が、V122変異を有するTTRを発現する、実施形態A2～A113のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0909】

実施形態A119は、V122変異が、V122A、V122I、またはV122（－）である、実施形態A118の方法または使用のための組成物である。

【0910】

実施形態A120は、対象が、野生型TTRを発現する、実施形態A2～A113のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0911】

実施形態A121は、対象が、V30、T60、またはV122変異を有するTTRを発現しない、実施形態A2～A107、またはA120のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0912】

実施形態A122は、対象が、病的な変異を有するTTRを発現しない、実施形態A2～A107、またはA120～A121のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0913】

実施形態A123は、対象が、野生型TTRについてホモ接合である、実施形態A122の方法または使用のための組成物である。

【0914】

実施形態A124は、対象が、投与後に、感覚運動ニューロパチーの症状が改善し、安定化し、または変化が遅くなる、実施形態A2～A123のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0915】

実施形態A125は、感覚運動ニューロパチーが改善し、安定化し、または変化が遅くなることが、筋電図、神経伝導検査、または患者が報告する転帰を使用して測定される、実施形態A124の方法または使用のための組成物である。

【0916】

実施形態A126は、対象が、うっ血性心不全の症状が改善し、安定化し、または変化が遅くなる、実施形態A2～A125のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0917】

実施形態A127は、うっ血性心不全が改善し、安定化し、または変化が遅くなることが、心臓バイオマーカー検査、肺機能検査、胸部x線、または心電図法を使用して測定される、実施形態A126の方法または使用のための組成物である。

【0918】

実施形態A128は、組成物または薬学的製剤が、ウイルスベクターを介して投与される、実施形態A2～A127のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0919】

実施形態A129は、組成物または薬学的製剤が、脂質ナノ粒子を介して投与される、実施形態A2～A127のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0920】

実施形態A130は、対象が、組成物または製剤を投与する前に、TTR遺伝子内の特定の変異について試験される、実施形態A2～A129のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0921】

実施形態A131は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号5、6、9、13、14、15、16、17、22、23、27、3

10

20

30

40

50

【 0 9 2 2 】

50

50

30

50

1つの方法または組成物である。実施形態A200は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号74である、実施形態A1～A130のいずれか1つの方法または組成物である。実施形態A201は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号75である、実施形態A1～A130のいずれか1つの方法または組成物である。実施形態A202は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号76である、実施形態A1～A130のいずれか1つの方法または組成物である。実施形態A203は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号77である、実施形態A1～A130のいずれか1つの方法または組成物である。実施形態A204は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号78である、実施形態A1～A130のいずれか1つの方法または組成物である。実施形態A205は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号80である、実施形態A1～A130のいずれか1つの方法または組成物である。実施形態A206は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号81である、実施形態A1～A130のいずれか1つの方法または組成物である。実施形態A207は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号82である、実施形態A1～A130のいずれか1つの方法または組成物である。実施形態A208は、オープンリーディングフレームが、その配列の少なくともその最初の10%、12%、15%、20%、25%、30%、または35%にわたって配列番号311と少なくとも95%の同一性を有する、先行実施形態のいずれか1つの組成物または方法である。

【0923】

実施形態A209は、オープンリーディングフレームが、配列番号311と少なくとも94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%の同一性を有する配列を含む、先行実施形態のいずれか1つの組成物または方法である。

【0924】

実施形態A210は、オープンリーディングフレームのコドンの少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%が、表4、表5、または表7に列挙されるコドンである、先行実施形態のいずれか1つの組成物または方法である。

【0925】

実施形態A211は、表4、表5、または表7に列挙されるコドンが、表4に列挙されるコドンである、実施形態A210の組成物または方法である。

【0926】

実施形態A212は、表4、表5、または表7に列挙されるコドンが、表5の低Uコドンセットのコドンである、実施形態A210の組成物または方法である。

【0927】

実施形態A213は、表4、表5、または表7に列挙されるコドンが、表5の低Aコドンセットのコドンである、実施形態A210の組成物または方法である。

【0928】

実施形態A214は、表4、表5、または表7に列挙されるコドンが、表5の低A/Uコドンセットのコドンである、実施形態A210の組成物または方法である。

【0929】

実施形態A215は、表4、表5、または表7に列挙されるコドンが、表7に列挙されるコドンである、実施形態A210の組成物または方法である。

【0930】

実施形態A216は、オープンリーディングフレームが、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の101%、102%、103%、105%、110%、115%、120%、または123%の範囲である、先行実施形態のいずれか1つの組成物または方法である。

【0931】

実施形態 A 2 1 7 は、オープンリーディングフレームが、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の 1 0 1 %、1 0 2 %、1 0 3 %、1 0 5 %、1 1 0 %、1 1 5 %、1 2 0 %、1 2 5 %、1 3 0 %、1 3 5 %、1 4 0 %、1 4 5 %、または 1 5 0 % の範囲である、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【 0 9 3 2 】

実施形態 A 2 1 8 は、核酸が、配列番号 2 3 2、2 3 4、2 3 6、2 3 8、2 4 1、または 2 7 5～2 7 7 のいずれか 1 つと少なくとも 9 0 % の同一性を有する 5' UTR を含む、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【 0 9 3 3 】

実施形態 A 2 1 9 は、核酸が、配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 7、2 3 9、または 2 4 0 のいずれか 1 つと少なくとも 9 0 % の同一性を有する 3' UTR を含む、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【 0 9 3 4 】

実施形態 A 2 2 0 は、核酸が、同じ供給源からの 5' UTR および 3' UTR を含む、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【 0 9 3 5 】

実施形態 A 2 2 1 は、核酸が、Cap 0、Cap 1、および Cap 2 から選択される 5' キャップを含む mRNA である、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【 0 9 3 6 】

実施形態 A 2 2 2 は、オープンリーディングフレームが、配列番号 3 7 7 と少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9.5 %、または 1 0 0 % の同一性を有する配列を含む、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【 0 9 3 7 】

実施形態 A 2 2 3 は、核酸が、ウリジンの少なくとも 1 0 % が修飾ウリジンで置換される mRNA である、先行実施形態のいずれかの組成物または方法である。

【 0 9 3 8 】

実施形態 A 2 2 4 は、修飾ウリジンが、N1-メチル-シュードウリジン、シュードウリジン、5-メトキシウリジン、または 5-ヨードウリジンのうちの 1 つ以上である、実施形態 A 2 2 3 の組成物または方法である。

【 0 9 3 9 】

実施形態 A 2 2 5 は、修飾ウリジンが、N1-メチル-シュードウリジンまたは 5-メトキシウリジンのうちの片方または両方である、実施形態 A 2 2 3 の組成物または方法である。

【 0 9 4 0 】

実施形態 A 2 2 6 は、修飾ウリジンが、N1-メチル-シュードウリジンである、実施形態 A 2 2 3 の組成物または方法である。

【 0 9 4 1 】

実施形態 A 2 2 7 は、修飾ウリジンが、5-メトキシウリジンである、実施形態 A 2 2 3 の組成物または方法である。

【 0 9 4 2 】

実施形態 A 2 2 8 は、mRNA 中のウリジンの 1 5 %～4 5 % が、修飾ウリジンで置換されている、実施形態 A 2 2 3～A 2 2 7 のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【 0 9 4 3 】

実施形態 A 2 2 9 は、mRNA 中のウリジンの少なくとも 2 0 % または少なくとも 3 0 % が、修飾ウリジンで置換されている、実施形態 A 2 2 3～A 2 2 8 のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【 0 9 4 4 】

実施形態 A 2 3 0 は、mRNA 中のウリジンの少なくとも 8 0 % または少なくとも 9 0 % が、修飾ウリジンで置換されている、実施形態 A 2 2 9 の組成物または方法である。

10

20

30

40

50

【0945】

実施形態A231は、mRNA中のウリジンの100%が、修飾ウリジンで置換されている、実施形態A229の組成物または方法である。

【0946】

実施形態A232は、ATTRを有するヒト対象を治療するための医薬の調製のための、実施形態A1またはA4～A231のいずれかの組成物または製剤の使用である。

以下に、本願の当初の特許請求の範囲に記載の発明を列挙する。

[発明1]

ATTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を治療する方法であって、それを必要とする対象にコルチコステロイドおよび組成物を投与することを含み、前記組成物が、(i) RNAガイドDNA結合剤またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、(ii) ガイドRNAであって、

- a. 配列番号5～82から選択されるガイド配列、
 - b. 配列番号5～82から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または
 - c. 配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列を含む、ガイドRNAと、を含み、
- それによって、ATTRを治療する、方法。

[発明2]

ATTR血清濃度を低減する方法であって、それを必要とする対象にコルチコステロイドおよび組成物を投与することを含み、前記組成物が、(i) RNAガイドDNA結合剤またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、(ii) ガイドRNAであって、

- a. 配列番号5～82から選択されるガイド配列、
 - b. 配列番号5～82から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または
 - c. 配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列を含む、ガイドRNAと、を含み、
- それによってATTR血清濃度を低減する、方法。

[発明3]

対象においてATTRを含むアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する方法であって、それを必要とする対象にコルチコステロイドおよび組成物を投与することを含み、前記組成物が、(i) RNAガイドDNA結合剤またはRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸と、(ii) ガイドRNAであって、

- a. 配列番号5～82から選択されるガイド配列、
 - b. 配列番号5～82から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または
 - c. 配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列を含む、ガイドRNAと、を含み、
- それによってアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減する、方法。

[発明4]

ガイドRNAを含む組成物であって、前記ガイドRNAが、

- a. 配列番号5～82から選択されるガイド配列、
- b. 配列番号5～82から選択される配列の少なくとも17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチド、または
- c. 配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列を含む、

対象において T T R 遺伝子内の二本鎖切断 (D S B) を誘導し、細胞もしくは対象において前記 T T R 遺伝子を修飾し、対象において T T R に関連するアミロイドーシス (A T T R) を治療し、対象において T T R 血清濃度を低減し、かつ／または対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する方法においてコルチコステロイドと組み合わせて使用するための、組成物。

〔発明 5〕

ガイド RNA をコードするベクターを含む組成物であって、前記ガイド RNA が、

- a. 配列番号 5 ～ 8 2 から選択されるガイド配列、
- b. 配列番号 5 ～ 8 2 から選択される配列の少なくとも 1 7、1 8、1 9、もしくは 2 0 個の連続ヌクレオチド、または
- c. 配列番号 5 ～ 8 2 から選択される配列と少なくとも 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 4 %、9 3 %、9 2 %、9 1 %、もしくは 9 0 % 同一であるガイド配列を含み、

対象において T T R 遺伝子内の二本鎖切断 (D S B) を誘導し、細胞もしくは対象において前記 T T R 遺伝子を修飾し、対象において T T R に関連するアミロイドーシス (A T T R) を治療し、対象において T T R 血清濃度を低減し、かつ／または対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する方法においてコルチコステロイドと組み合わせて使用するための、組成物。

〔発明 6〕

組成物であって、

(i) ガイド RNA であって、

- a. 配列番号 5 ～ 8 2 から選択されるガイド配列、
- b. 配列番号 5 ～ 8 2 から選択される配列の少なくとも 1 7、1 8、1 9、もしくは 2 0 個の連続ヌクレオチド、または
- c. 配列番号 5 ～ 8 2 から選択される配列と少なくとも 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 4 %、9 3 %、9 2 %、9 1 %、もしくは 9 0 % 同一であるガイド配列を含む、ガイド RNA と、

(i i) RNA ガイド DNA 結合剤をコードする mRNA であって、

- a. オープンリーディングフレームが、配列番号 3 1 1 と少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含み、
- b. 前記オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の 3 0、5 0、7 0、1 0 0、1 5 0、2 0 0、2 5 0、もしくは 3 0 0 個のヌクレオチドにわたって配列番号 3 1 1 と少なくとも 9 5 % の同一性を有し、
- c. 前記オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも 7 5 % が表 1 に列挙されるコドンである、コドンのセットからなり、
- d. 前記オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の 1 5 0 % の範囲であり、かつ／あるいは
- e. 前記オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の 1 5 0 % の範囲である、mRNA と、を含み、

対象において T T R 遺伝子内の二本鎖切断 (D S B) を誘導し、細胞もしくは対象において前記 T T R 遺伝子を修飾し、対象において T T R に関連するアミロイドーシス (A T T R) を治療し、対象において T T R 血清濃度を低減し、かつ／または対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する方法においてコルチコステロイドと組み合わせて使用するための、組成物。

〔発明 7〕

組成物であって、

(i) ガイド RNA をコードするベクターであって、前記ガイド RNA が、

- a. 配列番号 5 ～ 8 2 から選択されるガイド配列、
- b. 配列番号 5 ～ 8 2 から選択される配列の少なくとも 1 7、1 8、1 9、もしくは

20個の連続ヌクレオチド、または

c. 配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、もしくは90%同一であるガイド配列を含む、ベクターと、

(ii) RNAガイドDNA結合剤をコードするmRNAであって、

a. オープンリーディングフレームが、配列番号311と少なくとも95%の同一性を有する配列を含み、

b. 前記オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の30、50、70、100、150、200、250、もしくは300個のヌクレオチドにわたって配列番号311と少なくとも95%の同一性を有し、

c. 前記オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも75%が表1に列挙されるコドンである、コドンのセットからなり、

d. 前記オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の150%の範囲であり、かつ／あるいは

e. 前記オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の150%の範囲である、mRNAと、を含み、

対象においてTTR遺伝子内の二本鎖切断(DSB)を誘導し、細胞もしくは対象において前記TTR遺伝子を修飾し、対象においてTTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を治療し、対象においてTTR血清濃度を低減し、かつ／または対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する方法においてコルチコステロイドと組み合わせて使用するための、組成物。

[発明8]

前記方法が、30分間より長い、例えば、60分間より長い、または120分間より長い注入によって前記組成物を投与することを含む、発明1～3または5～7のいずれか一つに記載の使用のための組成物または方法。

[発明9]

前記ガイドRNAが、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択されるガイド配列を含む、発明1～8のいずれか一つに記載の組成物または方法。

[発明10]

前記ガイドRNAが、配列番号5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、17、22、23、27、29、30、35、36、37、38、55、61、63、65、66、68、または69から選択されるガイド配列を含む、先行発明のいずれか一つに記載の組成物または方法。

[発明11]

細胞もしくは対象において前記TTR遺伝子内の二本鎖切断(DSB)を誘導するか、細胞もしくは対象において前記TTR遺伝子を修飾するか、対象においてTTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を治療するか、または対象においてTTR血清濃度を低減するか、または対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する際に使用するための、発明4～10のいずれか一つに記載の組成物。

[発明12]

前記コルチコステロイドが、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、トリアムシノロン、またはエタメタゾネブである、発明1～11のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

[発明13]

前記コルチコステロイドが、デキサメタゾンである、発明1～12のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

[発明14]

前記コルチコステロイドが、前記組成物の前に投与される、発明1～13のいずれか一

10

20

30

40

50

つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 15〕

前記コルチコステロイドが、前記組成物の後に投与される、発明 1～14 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 16〕

前記コルチコステロイドが、前記組成物と同時に投与される、発明 1～15 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 17〕

前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与される前の約 5 分間～約 168 時間以内に投与される、発明 1～16 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 18〕

前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与された後、約 5 分間～約 168 時間以内に投与される、発明 1～17 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 19〕

前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与される 5 分、10 分、15 分、30 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、6 時間、12 時間、18 時間、1 日、1.5 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、または 1 週間前に投与される、発明 1～18 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 20〕

少なくとも 2 回用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物の投与の前または後に投与される、発明 1～19 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 21〕

少なくとも 2 回用量の前記コルチコステロイドおよび少なくとも 2 回用量の前記組成物が投与される、発明 1～20 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 22〕

前記コルチコステロイドが、前記対象に、0.75 mg～20 mg の用量で、または約 0.01～0.4 mg/kg、例えば、0.1～0.35 mg/kg もしくは 0.25～0.35 mg/kg の用量で投与される、発明 1～21 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 23〕

前記コルチコステロイドが、静脈内注射を介して前記対象に投与される、発明 1～22 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 24〕

前記コルチコステロイドが、前記対象に経口投与され、任意選択で、前記コルチコステロイドが、前記組成物が静脈内注射によって前記対象に投与される前に、前記対象に経口投与される、発明 1～23 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 25〕

前記コルチコステロイドが、デキサメタゾンであり、前記デキサメタゾンが、前記組成物が前記対象に投与される前に、20 mg の量で 6～12 時間、前記対象に経口投与されるか、または前記デキサメタゾンが、前記組成物が前記対象に投与される前に、20 mg の量で 30 分間 6～12 時間、前記対象に静脈内投与される、発明 24 に記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 26〕

前記組成物が、約 60 分間、約 90 分間、約 120 分間、約 150 分間、約 180 分間、または約 240 分間の注入によって投与される、発明 1～25 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 27〕

前記コルチコステロイドが、デキサメタゾンである、発明 1～26 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 28〕

前記方法が、注入予防を投与することをさらに含み、前記注入予防が、アセトアミノフェン、H 1 遮断薬、またはH 2 遮断薬のうちの1つ以上を含み、任意選択で、前記アセトアミノフェン、H 1 遮断薬、またはH 2 遮断薬のうちの1つ以上が、前記コルチコステロイドと同時に、かつ／または前記組成物の前に投与される、発明1～27のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明29〕

前記アセトアミノフェン、H 1 遮断薬、またはH 2 遮断薬の各々が投与される、発明28に記載の方法または使用のための組成物。

〔発明30〕

前記H 1 遮断薬および／または前記H 2 遮断薬が、経口投与される、発明28または29に記載の方法または使用のための組成物。

〔発明31〕

前記注入予防が、静脈内コルチコステロイド（例えば、デキサメタゾン8～12mg、または10mgもしくは等価物）およびアセトアミノフェン（例えば、経口アセトアミノフェン500mg）を含む、発明28～30のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明32〕

前記注入予防が、ガイドRNA含有組成物、例えば、LNP組成物を投与する前に、必要な前投薬として投与される、発明28～31のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明33〕

H 1 遮断薬が、ジフェンヒドラミンである、発明28～32のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明34〕

前記H 2 遮断薬が、ラニチジンである、発明28～33のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明35〕

第1の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与される約8～24時間前に投与され、第2の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与される約1～2時間前に投与される、発明1～35のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明36〕

前記方法が、アセトアミノフェン、H 1 遮断薬、またはH 2 遮断薬のうちの1つ以上を投与することをさらに含み、任意選択で、前記アセトアミノフェン、H 1 遮断薬、またはH 2 遮断薬のうちの1つ以上が、前記第2の用量の前記コルチコステロイドと同時に投与される、発明35に記載の方法または使用のための組成物。

〔発明37〕

第1の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与される約8～24時間前に経口投与され、第2の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与される約1～2時間前に静脈内投与される、発明1～36のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明38〕

第1の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与される約8～24時間前に経口投与され、第2の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が投与される約1～2時間前に、アセトアミノフェン、H 1 遮断薬およびH 2 遮断薬の投与と同時に静脈内投与される、発明1～37のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明39〕

前記コルチコステロイドが、デキサメタゾンであり、前記組成物が前記対象に投与される約8～24時間前に、第1の用量の前記デキサメタゾンが、約6～10mgの量で、前記対象に経口投与され、第2の用量の前記デキサメタゾンが、約8～12mgの量で、前記組成物が前記対象に投与される約1～2時間前に、アセトアミノフェンの経口投与なら

10

20

30

40

50

びにH 1遮断薬およびH 2遮断薬の静脈内投与と同時に、前記対象に静脈内投与され、任意選択で、前記H 1遮断薬がジフェンヒドラミンであり、前記H 2遮断薬がラニチジンであり、かつ／または任意選択で、前記対象がヒトである、発明1～38のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明40〕

前記コルチコステロイドが、デキサメタゾンであり、前記組成物が前記対象に投与される約8～24時間前に、第1の用量の前記デキサメタゾンが、8mgの量で、前記対象に経口投与され、第2の用量の前記デキサメタゾンが、10mgの量で、前記組成物が前記対象に投与される約1～2時間前に、アセトアミノフェンの経口投与ならびにH 1遮断薬およびH 2遮断薬の静脈内投与と同時に、前記対象に静脈内投与され、任意選択で、前記H 1遮断薬がジフェンヒドラミンであり、前記H 2遮断薬がラニチジンである、発明1～39のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

10

〔発明41〕

前記組成物が、3mg/kgの量で約1.5～6時間、注入によって投与され、第1の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が注入される約8～24時間前に経口投与され、第2の用量の前記コルチコステロイドが、前記組成物が注入される約1～2時間前に静脈内投与される、発明1～40のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明42〕

前記コルチコステロイドを投与することで、前記ガイドRNAを含む前記組成物の許容性を改善する、発明1～41のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

20

〔発明43〕

前記コルチコステロイドを投与することで、前記ガイドRNAを含む前記組成物に応答して、炎症、吐き気、嘔吐、血中ALT濃度の上昇、高熱症、および／または痛覚過敏のうちの1つ以上の発生率または重症度を低減する、発明1～42のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明44〕

前記コルチコステロイドを投与することで、前記ガイドRNAを含む前記組成物に応答して、1つ以上のインターフェロンおよび／または炎症性サイトカインの産生または活性を低減または阻害する、発明1～43のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

30

〔発明45〕

前記組成物が、血清TTRレベルを低減する、発明1～44のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明46〕

前記組成物の投与前の血清TTRレベルと比較して、前記血清TTRレベルが少なくとも50%低減される、発明45に記載の方法または使用のための組成物。

〔発明47〕

前記組成物が、前記TTR遺伝子の編集を引き起こす、発明1～46のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

40

〔発明48〕

前記編集が、編集される集合体の割合（編集パーセント）として計算され、任意選択で、前記編集パーセントが、前記集合体の30～99%である、発明47に記載の方法または使用のための組成物。

〔発明49〕

前記組成物が、少なくとも1つの組織におけるアミロイド沈着を低減し、任意選択で、前記少なくとも1つの組織が、胃、結腸、坐骨神経、または後根神経節のうちの1つ以上を含む、発明1～48のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明50〕

前記組成物が、少なくとも2回投与または送達される、発明1～49のいずれか一つに

50

記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 5 1〕

前記投与または送達が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15日間、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15週間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15ヶ月間の間隔で行われる、発明 5 0 に記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 5 2〕

前記ガイド配列が、配列番号 5 ～ 8 2 から選択される、発明 1 ～ 5 1 のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明 5 3〕

前記ガイド RNA が、前記ヒト T T R 遺伝子に存在する標的配列に少なくとも部分的に相補的である、発明 1 ～ 5 2 のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明 5 4〕

前記標的配列が、前記ヒト T T R 遺伝子のエクソン 1、2、3、または 4 にある、発明 5 3 に記載の方法または組成物。

〔発明 5 5〕

前記ガイド配列が、前記 T T R 遺伝子のプラス鎖内の第 1 の標的配列に対して相補的であり、前記組成物が、前記 T T R 遺伝子のマイナス鎖内の第 2 の標的配列に対して相補的である第 2 のガイド配列をさらに含む、発明 1 ～ 5 4 のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明 5 6〕

前記ガイド RNA が、シングルガイド (s g RNA) である、発明 1 ～ 5 5 のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明 5 7〕

前記 s g RNA が、配列番号 5 ～ 8 2 のガイド配列および配列番号 3 のヌクレオチド 2 1 ～ 1 0 0 のうちのいずれか 1 つを含む、発明 5 6 に記載の方法または組成物。

〔発明 5 8〕

前記 s g RNA が、配列番号 8 7 ～ 1 2 4 から選択される配列と少なくとも 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 6 %、9 5 %、9 4 %、9 3 %、9 2 %、9 1 %、もしくは 9 0 % 同一であるガイド配列を含む、発明 5 6 に記載の方法または組成物。

〔発明 5 9〕

前記 s g RNA が、配列番号 8 7 ～ 1 2 4 から選択される配列を含む、発明 5 8 に記載の方法または組成物。

〔発明 6 0〕

前記ガイド RNA が、少なくとも 1 つの修飾を含む、発明 1 ～ 5 9 のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明 6 1〕

前記少なくとも 1 つの修飾が、2' - O - メチル (2' - O - Me) 修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート (P S) 結合、または 2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む、発明 6 0 に記載の方法または組成物。

〔発明 6 2〕

前記少なくとも 1 つの修飾が、最初の 4 個のヌクレオチド間の P S 結合、最後の 4 個のヌクレオチド間の P S 結合、5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドおよび／または 3' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドを含む、発明 6 0 または 6 1 に記載の方法または組成物。

〔発明 6 3〕

前記ガイド RNA が、配列番号 3 の修飾ヌクレオチドを含む、発明 6 0 ～ 6 2 のいずれか一つに記載の方法または組成物。

10

20

30

40

50

〔発明 6 4〕

前記ガイド RNA が、脂質ナノ粒子（LNP）と会合している、発明 1 ～ 6 3 のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明 6 5〕

前記 LNP が、イオン化可能な脂質を含む、発明 6 4 に記載の方法または組成物。

〔発明 6 6〕

前記 LNP が、生分解性イオン化脂質を含む、発明 6 4 または 6 5 に記載の方法または組成物。

〔発明 6 7〕

前記 LNP が、アミン脂質、例えば、CCD 脂質を含む、発明 6 4 または 6 5 に記載の方法または組成物。

〔発明 6 8〕

前記 LNP が、ヘルパー脂質を含む、発明 6 4 ～ 6 6 のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明 6 9〕

前記 LNP が、ステルス脂質を含み、任意選択で、

（i）前記 LNP が、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約 50 ～ 60 mol % の脂質 A などのアミン脂質と、約 8 ～ 10 mol % の中性脂質と、約 2.5 ～ 4 mol % のステルス脂質（例えば、PEG 脂質）とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記 LNP 組成物の N / P 比が、約 6 であり、

（ii）前記 LNP が、約 50 ～ 60 mol % の脂質 A などのアミン脂質と、約 2.7 ～ 39.5 mol % のヘルパー脂質と、約 8 ～ 10 mol % の中性脂質と、約 2.5 ～ 4 mol % のステルス脂質（例えば、PEG 脂質）とを含み、前記 LNP 組成物の N / P 比が、約 5 ～ 7（例えば、約 6）であり、

（iii）前記 LNP が、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約 50 ～ 60 mol % の脂質 A などのアミン脂質と、約 5 ～ 15 mol % の中性脂質と、約 2.5 ～ 4 mol % のステルス脂質（例えば、PEG 脂質）とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記 LNP 組成物の N / P 比が約 3 ～ 10 であり、

（iv）前記 LNP が、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約 40 ～ 60 mol % の脂質 A などのアミン脂質と、約 5 ～ 15 mol % の中性脂質と、約 2.5 ～ 4 mol % のステルス脂質（例えば、PEG 脂質）とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記 LNP 組成物の N / P 比が、約 6 であり、

（v）前記 LNP が、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約 50 ～ 60 mol % の脂質 A などのアミン脂質と、約 5 ～ 15 mol % の中性脂質と、約 1.5 ～ 10 mol % のステルス脂質（例えば、PEG 脂質）とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記 LNP 組成物の N / P 比が、約 6 であり、

（vi）前記 LNP が、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約 40 ～ 60 mol % の脂質 A などのアミン脂質と、約 0 ～ 10 mol % の中性脂質と、約 1.5 ～ 10 mol % のステルス脂質（例えば、PEG 脂質）とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記 LNP 組成物の N / P 比が、約 3 ～ 10 であり、

（vii）前記 LNP が、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約 40 ～ 60 mol % の脂質 A などのアミン脂質と、約 1 mol % 未満の中性脂質と、約 1.5 ～ 10 mol % のステルス脂質（例えば、PEG 脂質）とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記 LNP 組成物の N / P 比が約 3 ～ 10 であり、

（viii）前記 LNP が、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約 40 ～ 60 mol % の脂質 A などのアミン脂質と、約 1.5 ～ 10 mol % のステルス脂質（例えば、PEG 脂質）とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記 LNP 組成物の N / P 比が約 3 ～ 10 であり、前記 LNP 組成物が、中性リン脂質を本質的に含まないか、または含まず、あるいは

（ix）前記 LNP が、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約 50 ～ 60 mol % の脂質

10

20

30

40

50

Aなどのアミン脂質と、約8～10mol%の中性脂質と、約2.5～4mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記LNP組成物のN/P比が約3～7である、発明64～67のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明70〕

前記LNPが、中性脂質を含む、発明64～69のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明71〕

前記LNPが、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約50mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約9mol%のDSPCなどの中性脂質と、約3mol%のPEG脂質などのステルス脂質（例えば、PEG2k-DMG）とを含み、前記脂質成分の残りが、コレステロールなどのヘルパー脂質であり、前記LNP組成物のN/P比が、約6である、発明64～70のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明72〕

前記LNPが、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約50mol%の脂質Aと、約9mol%のDSPCと、約3mol%のPEG2k-DMGとを含み、前記脂質成分の残りが、コレステロールであり、前記LNP組成物のN/P比が、約6である、発明64～71のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明73〕

前記組成物が、RNAガイドDNA結合剤をさらに含む、発明1～72のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明74〕

前記組成物が、RNAガイドDNA結合剤をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、発明1～72のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明75〕

前記ポリヌクレオチドが、mRNAである、発明74に記載の方法または組成物。

〔発明76〕

前記RNAガイドDNA結合剤が、Casクリパーゼである、発明73～75のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明77〕

前記ポリヌクレオチドが、RNAガイドDNA結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含み、

a. 前記オープンリーディングフレームが、配列番号311と少なくとも95%の同一性を有する配列を含み、

b. 前記オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の30、50、70、100、150、200、250、もしくは300個のヌクレオチドにわたって配列番号311と少なくとも95%の同一性を有し、

c. 前記オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも75%が表4に列挙されるコドンである、コドンのセットからなり、

d. 前記オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の150%の範囲であり、かつ／あるいは

e. 前記オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の150%の範囲である、発明74～76のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明78〕

前記ポリヌクレオチドが、配列番号232、234、236、238、241、もしくは275～277のうちのいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する5'UTR、および／または配列番号233、235、237、239、もしくは240のうちのいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する3'UTRを含む、発明74～77のいずれか一つに記載の組成物または方法。

〔発明 79〕

前記ポリヌクレオチドが、mRNAであり、前記mRNA中のウリジンの少なくとも10%が、修飾ウリジンで置換される、発明74～78のいずれかに記載の組成物または方法。

〔発明 80〕

前記RNAガイドDNA結合剤が修飾されている、発明73～79のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明 81〕

前記修飾RNAガイドDNA結合剤が、核局在化シグナル(NLS)を含む、発明80に記載の方法または組成物。

〔発明 82〕

前記組成物が、薬学的製剤であり、薬学的に許容される担体をさらに含む、発明1～81のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明 83〕

前記組成物が、TTRを含むアミロイドまたはアミロイド原線維を低減または予防する、発明1～82のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 84〕

非相同性末端結合(NHEJ)が、前記TTR遺伝子におけるDSBの修復中に変異を引き起こす、発明1～83のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 85〕

前記ガイドRNAの配列が、
a) 配列番号92もしくは104、
b) 配列番号87、89、96、もしくは113、
c) 配列番号100、102、106、111、もしくは112、または
d) 配列番号88、90、91、93、94、95、97、101、103、108、
もしくは109であり、
任意選択で、前記ガイドRNAが、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域内で発生するオフターゲット部位でインデルを生成しない、発明1～84のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明 86〕

前記組成物を投与することで、前記対象におけるTTRのレベルを低減し、任意選択で、前記TTRのレベルが、少なくとも50%低減する、発明1～85のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 87〕

前記TTRのレベルが、血清、血漿、血液、脳脊髄液、もしくは喀痰、または肝臓、脈絡叢、および／または網膜において測定され、任意選択で、前記TTRのレベルが、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を介して測定される、発明86に記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 88〕

前記対象が、ATTR、家族性アミロイドポリニューロパチーまたは家族性アミロイド心筋症を有する、発明1～87のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 89〕

前記対象が、ヒトである、発明1～88のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 90〕

前記対象が、前記組成物または製剤を投与する前に、前記TTR遺伝子内の特定の変異について試験される、発明1～89のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 91〕

ATTRを有するヒト対象を治療するための医薬の調製のための、発明1～90のい

10

20

30

40

50

れかに記載の組成物または製剤の使用。

【 0 9 4 7 】

配列表

以下の配列表は、本明細書に開示される配列のリストを提供する。DNA配列（Tを含む）が、RNAに関して参照される場合、Tは、Uで置き換えられるべきであり（文脈に応じて、修飾または非修飾であり得る）、逆もまた同様であることが理解される。

【表 4 3 - 1】

說明	備列	備列番号

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2】

1	GGGTCCCGCAGTCCGGCGTCCAGGGGCTCTGGCTTGTGTTGTGTGTCG TTGCAGGCCCTTATTTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCG GACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATCGGTCAGTCAACAGACGA ATACAAGGTCCGAGCAAGAGTTCAAGGTCCTGGGAACACAGACAGA CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCCGACAGCGGAG AAACAGCAGAAGCAACAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGATACAC AAGAAGAAAGAACAGAACTCTGCTACCTGCAGGAATCTTCAGCAACGAA ATGGCAAAAGTCCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC TGGTCGAAGAAGACAAAGAACGACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACAT CGTCGACGAAGTCGCATACACGAAAGTACCCGACAATCTACCACTG AGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCT ACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAAGGACACTTCTCTGATCGA AGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACCTCGACAAGCTGTTTCATCCAG CTGGTCCAGACATACAACCAAGCTGTTTGAAGAAAACCCGATCAACGCCAA GCGGAGTCGACGCAAGGCAATCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAG AAGACTGGAAACCTGATCGCACAGTCCCGGAGAAAGAAAGAACGGA CTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCTGGGACTGACACCGAACTTCA AGAGCAACTTCGACCTGGCAGAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGA CACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCCAG TAGGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAGAACCTGAGCGACGCAATCTGTC TGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAG CGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACACCCAGGACCTGACACTG CTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAAGTACAAAGAAATCT
15Dの5' UTR、配列番号204に対応するORF、Kozak配列、および5' UTRを有するCas9転写物	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3】

TCTTCGACGAGCAAGAACGGATACGCGAGGATACATCGACGGAGAGC AAGCCAGGAAGAAATTCACAAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAAGATG GACGGAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGA GAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAAGCATCCCGCACAGATCCACCT GGGAGAACTGCACCGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTT CTGAAGGACAAACAGAAAAAGATCGAAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCC CGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGAT GACAAAGAAAGCGGAAGAAACAAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTC GTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAATGACAAACT TCGACAAGAACTGCCGAACGAAAGGTCTCTGCCGAAGCACAGCCTGCT GTACGAATACTTCACAGTCTACACGAACTGACAAAGTCAAGTACGTC ACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGAGG CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTACAGTCAAGCA GCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAATGCTTCGACAGGTCGAA ATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACG ACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAAACGAAGAAA CGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTTGAAGAC AGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGACACCTGTTTCGACG ACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAAGATACACAGGATGGGGAAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAAGCAGCGGGAAG ACAATCCTGGACTTCTGAAGACGCGACGGATTTCGCAACAGAACTTCA TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAGGAAGACATCCAGAA GGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4】

CTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAGGGAATCCTGTCAGACAGTCAAGG TCGTCCAGCAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAAGCCGGAACACAT CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAACCAGACAAACAGAAAGGGAATCAAGGAACCTGG AACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAACACACAGCTGCAGAA GAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAACGGAAGAGACATGTACGTC CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTC GACCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCCACA TCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCT GACAAGAAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCTGAGCGGAA GAAGTCGTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGGCAA AGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCACAACCTGACAAAGGCAAGAGAGAGG AGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAAGATTCTCAAGAGACAGCTGGTC GAAACAAGACAGATCACAAAGCAGCTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAA TGAACACAAAGTACGACGAAACGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGT CATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAG TTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCGCACACGACGCAT ACCTGAACGCAGTCGTGGAAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCGAAGCT GGAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAG ATGATCGCAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAGTACT TCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGC AAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGG TCCTGAGCATGCCGCAAGGTCAACATCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5】

AGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCCCAAGAGAAACAGCGACAAG CTGATCGCAAGAAAGAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCTG ACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGCGCAAGGTCGAAAA GGGAAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACA ATCATGGAAGAAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTCTGGAAG CAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA GTACAGCCTGTTCCAACTGGAAACCGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGC GCAGGAGAACTGCAGAAGGGAACGAACTGGCACTGCCAGCAAGTACG TCAACTTCTGTACTGCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCC GGAAGACAACGAACAGAAAGCAGCTGTTCTGTCGAACAGCAACAGCACTAC CTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCGGATACAAAGCACAG TGGCAGACGCAACCTGGACAAGGTCTGAGCGCATACAAAGCACAG AGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAACATCATCCCTGTTTACA CTGACAACCTGGAGCACCGGCAGCATTCAGTACTTCGACACACAA TCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAGTCTCTGACGCAACACT GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAAGAAATCGACCTGAGC CAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAGGCCGAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAAGGCT AGCTAGCCATCACATTTAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAG AAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTTCATCTCTTTTCTTTTCTGTTG GTGTAAGGCCAACACCTGTCTAAAAACATAAAATTTCTTTAATCATTT TGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAGAACCTCGA G	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 6】

ヒトにおいて、 一般的に高い発現 を有するコードン を使用した、配 列番号205に 対応するC a s 9 ORFを含 むC a s 9 転写 産物	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCG TTGCAGGCCCTTATTTCGGATCCATGCCATAAGAAAAAGCGGAAGGTCGACG GGGATAAAGAAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACATAATTCGGTGGG TTGGGCAGTGATCAGCGATGAATACAAAGTGCCGTCCTCAAGAAAGTTCAAAG GTCCCTGGGGAAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCCGAG CCTGCTGTTTGTACTCCGGGGAACCGCAGAACCGACCCGGCTCAAAACG TACCGCAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAAATCGCATCTGCTATCTG CAAGAGATCTTTTCGAAACGAAATGGCAAGGTGACGACAGCTTCTTCC ACCGCCGTGAAGAAATCTTCTGCTGGAGGAGGACAAAGAAAGCATGAACG GCATCCCTATCTTTGGAAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAAG TACCGGACCATCTACCATCTGGCGGAAGAAAGTTGGTTGACTCAACTGACA AGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAAATT CCGCGGACACTTCTGATCGAAGGCGATCTGAACCTGTATAACTCCGAC GTGGATAAGCTTTTTCATTCAACTGGTGCAGACCTACAACTCACTGTTCG AAGAAACCCAAATCAATGCTAGCGGGCTCGATGCCAAGGCCATCCTGTC CGCCGGCTGTGGAAGTCGGGGCGCTCGAAAACTGATCGCACAGCTG CCGGAGAGAAAAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCAC TGGGACTCACTCCCAATTTCAAAGTCCAAATTTTGACCTGGCCGAGGACCG GAAGCTGCAACTCTCAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAAATTG CTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTCCTTGGCGCTAAGA ACCTTTCGGACCGCAATCTTCTGCTCGGATATCTGCGCGTGAAACACCGA AATAACCAAGGCGCGCTTAGCGCCCTCGATGATTAAAGGGTACGACGAG CATCACCAAGGATCTCAGCTGTCTCAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 7】

CTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAAGAAATGGGTACGC AGGATAATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATTAAGTTTCATC AAGCCAATCCTGGAANAAGATGGACGGAAACCGAAGAACTGCTGGTCAAGC TGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACAAACGGATC CATTCGCCAACAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCCATCTTGGCGCGGC CAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAAGGACAAACCGGAAAGATCGAGA AAATTCGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGCGG CAATTCGGGCTTCGGGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACT CCTTGGAAATTTCCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCT TCATCGAACGAAATGACCAACTTCGACAAAGAACTCCCAACGAGAAAGGT GCTTCCTAAGCACAGCCCTCCTTTACGAAATACCTTCACTGTCTACAAACGAA CTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTC TGTCGGGAGAACAGAAAGAAAGCAATTGTGATCTGCTGTTCAAGACCAA CCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAAGATC GAGTGTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACG CTTCGGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGA CTTCCTTGACAAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTG ACCTTGACCCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGA CCTACGCTCATCTCTTCGACGATAGGTCATGAAACAACTCAAGCGCGC CCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCCTCTCCGCCAAGCTGATCAACGGTATT CGCGATAAACAGAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCCTCAAAATCGGATG GCTTCGCTAAATCGTAACCTTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCCCTGAC CTTTAAGGAGGACATCCAAAAGCACAAAGTGTCGGGACAGGAGACTCA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 8】

CTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCCGCCGGCGATTAAAGAAGG GAATTCTGC AAACTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGTCAATGGG ACGGCACAAACCGGAGAAATATCGTGATTGAAATGGCCGAGAAACACAG ACTACCCAGAAAGGCCAGAAAACCTCCCGGAAAGGATGAAGCGGATCG AAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAACAGCACCCCGGT GGAA AACACGGCAGCTGCAGAACGAGAACCTCTACCTGTACTATTTGCCAA AATGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGT CTGATTACGACGTGGACCAACATCGTTCACACAGTCCCTTCTGAAGGATGA CTCGATCGATAACAAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAAGAACAGAGGGAAAG TCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTGGTGAAGAGATGAAGATTACT GGCGGACCTCCTGAATGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAA TCTCACTAAAGCCGAGCGCGGGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGA TTCATCAAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACCGTGG CGCAGATCTTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAA GCTCATCCGGGAAGTGAAAGGTGATTACCCTGAAAGCAAACTTGTGTCG GACTTTCGGAAAGGACTTTCAGTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACT ACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGGTACCGCCCT GATCAAAAAGTACCCATAAAGTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTAC AAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAAGTCCGAAACAGGAATCG GGAAAGCAACTGCGGAATACTCTCTTTACTCAAAACATCATGAACCTTTT CAAGACTGAAAATTACGCTGGCCAAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTG ATCGAAACTAACGGAGAAACGGCGGAAATCGTGTGGACAAAGGCCAGGG ACTTCGCAACTGTTCCGCAAAAGTGCTCTCTATGCCCGCAAGTCAATATTGT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 9】

GAAGAAAACCGAAGTGCAAAACCGGCGGATTTTCAAAAGGAATCGATCCTC CCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTTGCACGCAAGAAAGACTGGGACC CGAAGAAAGTACGGAGGATTTCGATTTCGCCGACTGTGCGCATACTCCGTCCT CGTGGTGGCCAAAGTGAGAGAAAGGAAAGCAAAAGCTCAAAATCCGTC AAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCCGAGAAGA ACCCGATTGATTTCTCGAGCGGAAGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGA TCTGATCATCAAACTCCCAAGTACTCACTGTTTCGAACTGGAAAAATGGT CGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGC TGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCCTCTATCTTGGCTTGGCACTA CGAAAAACTCAAAAGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAACGAGCTTTTC GTGGAGCAGCACAAAGCAATTACTGGATGAAATCATCGAACAATACTCCG AGTTTTCAAAAGCGGTGATCCTCGCCGACGCAACCTCGACAAAAGTCCCT GTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAG AACATTATCCACTTGTTCACCCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCT TCAAGTACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACAGGTCCACCAA GGAAGTTCCTGGACCGGACCCCTGATCCACCAAAAGCATCACTGGACTCTAC GAAACTAGGATCGATCTGTCCGAGCTGGGTGGCGATTGATAGTCTAGCC ATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAAA TGAAGATCAATAGCTTATTCACTCTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAG CCACACCCCTGTCTAAAAAAGATAAATTTCTTTTAATCATTTTGGCTCTT TTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 0】

修飾 s g RNA 配列 (IN. は 任意の天然また は非天然ヌクレ オチドであって もよい)	3	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNGUUUA G AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUC CGUUAUC AmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU *mU*mU
30/30/3 9ポリA配列	4	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAACCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAA
ヒトTTR (エ クソン1) を標 的とするCRO 03335 g RNA	5	CUGCUCUCCUCUGCCUUGC
ヒトTTR (エ クソン1) を標 的とするCRO 03336 g RNA	6	CCUCCUCUGCCUUGCUGGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 1】

ヒトTTR (エ クソン1) を標 的とするCR0 03337 g RNA	CCAGUCCAGCAAGGCAGAGG	7
ヒトTTR (エ クソン1) を標 的とするCR0 03338 g RNA	AUACCAGUCCAGCAAGGCAG	8
ヒトTTR (エ クソン1) を標 的とするCR0 03339 g RNA	ACACAAAUACCAGUCCAGCA	9
ヒトTTR (エ クソン1) を標 的とするCR0 03340 g RNA	UGGACUGGUAUUUGUGUCUG	10

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 2】

1 1	CUGGUAUUUGUGUCUGAGGC	ヒトTTR (エ クソン1) を標 的とするCR0 03341 g RNA
1 2	CUUCUCUACACCCAGGGCAC	ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 03342 g RNA
1 3	CAGAGGACACUUGGAUUCAC	ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 03343 g RNA
1 4	UUUGACCAUCAGAGGACACU	ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 03344 g RNA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 3】

ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 03345 g RNA	UCUAGAACUUUGACCAUCAG	15
ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 03346 g RNA	AAAGUUCUAGAUGCUGUCCG	16
ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 03347 g RNA	CAUUGAUGGCAGGACUGCCU	17
ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 03348 g RNA	AGGCAGUCCUGGCAUCA AUG	18

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 4】

ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 03349 g RNA	UGCACGGGCCACAUGAUGGC	19
ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 03350 g RNA	CACAUGCACGGGCCACAUUGA	20
ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 03351 g RNA	AGCCUUUCUGAACACAUGCA	21
ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 03352 g RNA	GAAAGGCGUGGUGAUGACACC	22

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 5】

ヒトTTR (ヒ クソン2) を標 的とするCR0 03353 g RNA	AAAGGCCUGCUGAUGACACCU	2 3
ヒトTTR (ヒ クソン2) を標 的とするCR0 03354 g RNA	ACCUGGGAGCCAUUUGCCUC	2 4
ヒトTTR (ヒ クソン2) を標 的とするCR0 03355 g RNA	CCCAGAGGCCAAUUGGCCCC	2 5
ヒトTTR (ヒ クソン2) を標 的とするCR0 03356 g RNA	GCAACUUACCCAGAGGCAA	2 6

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 6】

ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 03357 g RNA	UUCUUUGGCAACUUACCCAG	27
ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03358 g RNA	AUGCAGCUCUCCAGACUCAC	28
ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03359 g RNA	AGUGAGUCUGGAGAGCUGCA	29
ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03360 g RNA	GUGAGUCUGGAGAGCUGCAU	30

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 7】

ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03361 g RNA	GCUGCAUGGGCCUACAACUG	3 1
ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03362 g RNA	GCAUGGGCCUACAACUGAGG	3 2
ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03363 g RNA	ACUGAGGAGGAUUUUGUAGA	3 3
ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03364 g RNA	CUGAGGAGGAUUUUGUAGAA	3 4

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 8】

35	UGUAGAAAGGGAUUAUACAAAG	ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03365 g RNA
36	AAAUAGACACCAAAUUCUUAC	ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03366 g RNA
37	AGACACCAAAUUCUACUGGA	ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03367 g RNA
38	AAGUGCCUCCAGUAAGAUU	ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03368 g RNA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 9】

ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03369 g RNA	CUCUGCAUGCCUCAUGGAAUG	39
ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03370 g RNA	CCUCUGCAUGCCUCAUGGAU	40
ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03371 g RNA	ACCUCUGCAUGCCUCAUGGAA	41
ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 03372 g RNA	UACUCACCCUCUGCAUGCUCA	42

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 0】

ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03373 g RNA	GUAUUCACAGCCAAACGACUC	4 3
ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03374 g RNA	GCGGCGGGGGCCGGAGUCGU	4 4
ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03375 g RNA	AUGGUGUAGCGGGGGGGC	4 5
ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03376 g RNA	CGGCAUUGGUGUAGCGGGGG	4 6

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 1】

ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03377 g RNA	GCGGCCAAUGGUGUAGCGCGG	4 7
ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03378 g RNA	GGCGGCCAAUGGUGUAGCGGC	4 8
ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03379 g RNA	GGCGGCCAAUGGUGUAGCGGG	4 9
ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03380 g RNA	GCAGGGCGGCCAAUGGUGUAG	5 0

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 2】

ヒトTTR（エ クソン4）を標 的とするCR0 03381 g RNA	GGGGCUCAGCAGGGCGGCAA	5 1
ヒトTTR（エ クソン4）を標 的とするCR0 03382 g RNA	GGAGUAGGGGCU CAGCAGGG	5 2
ヒトTTR（エ クソン4）を標 的とするCR0 03383 g RNA	AUAGGAGUAGGGGCU CAGCA	5 3
ヒトTTR（エ クソン4）を標 的とするCR0 03384 g RNA	AAUAGGAGUAGGGGCU CAGC	5 4

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 3】

ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03385 g RNA	CCCCUACUCCUAUUCACCA	55
ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03386 g RNA	CCGUGGUGGAUAGGAGUAG	56
ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03387 g RNA	GCCGUGGUGGAUAGGAGUA	57
ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03388 g RNA	GACGACAGCCGUGGUGGAU	58

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 4】

ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03389 g RNA	AUUGGUGACGACACAGCCGUGG	5 9
ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03390 g RNA	GGGAUUGGUGACGACAGCCG	6 0
ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03391 g RNA	GGCUGUCGUCACCAAUCCCA	6 1
ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 03392 g RNA	AGUCCCUCAUUCUUUGGGAU	6 2

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 5】

ヒトTTR (エ クソン1) を標 的とするCR0 05298 g RNA	UCCACUCAUUCUUGGCAGGA	6 3
ヒトTTR (エ クソン4) を標 的とするCR0 05299 g RNA	AGCCGUGGUGGAAUAGGAGU	6 4
ヒトTTR (エ クソン1) を標 的とするCR0 05300 g RNA	UCACAGAAACACUCACCGUA	6 5
ヒトTTR (エ クソン1) を標 的とするCR0 05301 g RNA	GUCACAGAAACACUCACCGU	6 6

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 6】

ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 05302 g RNA	ACGUGUCUUCUUCUACACCCA	6 7
ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 05303 g RNA	UGAAUCCAAGUGUCCUCUGA	6 8
ヒトTTR (エ クソン2) を標 的とするCR0 05304 g RNA	GGCCGUGCAUGUGUUCAGAA	6 9
ヒトTTR (エ クソン3) を標 的とするCR0 05305 g RNA	UAUAGGAAAACCAGUGAGUC	7 0

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 7】

ヒトTTR (エクソン3) を標的とするCR005306 gRNA	AAAUCUUACUGGAAGGCACU	7 1
ヒトTTR (エクソン4) を標的とするCR005307 gRNA	UGUCUGUCUUUCUCAUAGG	7 2
カニクイザルTTRを標的とするCR000689 gRNA	ACACAAAUAACAGUCCAGCG	7 3
カニクイザルTTRを標的とするCR005364 gRNA	AAAGGCGUGUGAUGAGACCU	7 4
カニクイザルTTRを標的とするCR005365 gRNA	CAUUGACAGCAGGACUGCCU	7 5

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 8】

7 6	AUACCAGUCCAGCGAGGCAG	カニクイザルト TRを標的とす るCR0053 66 gRNA
7 7	CCAGUCCAGCGAGGCAGAGG	カニクイザルト TRを標的とす るCR0053 67 gRNA
7 8	CCUCCUCUGCCUCCGUGGAC	カニクイザルト TRを標的とす るCR0053 68 gRNA
7 9	AAAGUUCUAGAUGCCGUCGG	カニクイザルト TRを標的とす るCR0053 69 gRNA
8 0	ACUUGUCUUCUCUAUACCCA	カニクイザルト TRを標的とす るCR0053 70 gRNA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 9】

カニクイザルト TRを標的とする CR0053 71 gRNA	AAGUGACUUC CAGUAAGA UU	8 1
カニクイザルト TRを標的とする CR0053 72 gRNA	AAAAAGGCGUGAUGAGACC	8 2
	未使用	8 3
	未使用	8 4
	未使用	8 5
	未使用	8 6
ヒトTTRを標 的とするG00 0480 s g RNA修飾配列	mAmAmAmAm*GGCUGCUGACAC CUGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUC CGUUUUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmU *mU*mU	8 7
ヒトTTRを標 的とするG00 0481 s g RNA修飾配列	mU*mC*mU*AGAACUUUGACCAUCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUC CGUUUUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmU *mU*mU	8 8

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 0】

ヒト TTR を標 的とする G O O 0 4 8 2 s g RNA 修飾配列	m U * m G * m U * A G A A G G G A U A U A C A A A G G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	8 9
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 4 8 3 s g RNA 修飾配列	m U * m C * m C * A C U C A U U C U G G C A G G A G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	9 0
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 4 8 4 s g RNA 修飾配列	m A * m G * m A * C A C A A A U C U U A C U G G A G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	9 1
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 4 8 5 s g RNA 修飾配列	m C * m C * m U * C C U C U G C C U U G C U G G A C G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	9 2
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 4 8 6 s g RNA 修飾配列	m A * m C * m A * C A A A U A C C A G U C C A G C A G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	9 3

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 1】

ヒト TTR を標 的とする G O O 0 4 8 7 s g RNA 修飾配列	m U * m U * m C * U U U G G C A A C U U A C C C A G G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A A A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	9 4
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 4 8 8 s g RNA 修飾配列	m A * m A * m A * m A * G U C U A G A U G C U G U C C G G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A A A A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	9 5
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 4 8 9 s g RNA 修飾配列	m U * m U * m U * m U * G A C C A U C A G A G G A C A C U G U U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A A A A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	9 6
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 4 9 0 s g RNA 修飾配列	m A * m A * m A * m A * U A G A C A C C A A A U C U U A C G U U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A A A A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	9 7
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 4 9 1 s g RNA 修飾配列	m A * m U * m A * m C C A G U C C A G C A A G G C A G G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A A A A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	9 8

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 2】

ヒトTTRを標 的とするG00 0492 sg RNA修飾配列	mC*mU*mU*CUCUACACCCAGGGCACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUm*mU *mU*mU	99
ヒトTTRを標 的とするG00 0493 sg RNA修飾配列	mA*mA*mG*UGCCUCCAGUAAGAUUGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUm*mU *mU*mU	100
ヒトTTRを標 的とするG00 0494 sg RNA修飾配列	mG*mU*mG*AGUCUGGAGAGCUGCAUGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmCmUm*mU *mU*mU	101
ヒトTTRを標 的とするG00 0495 sg RNA修飾配列	mC*mA*mG*AGGACACUUGGAUUCACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUm*mU *mU*mU	102
ヒトTTRを標 的とするG00 0496 sg RNA修飾配列	mG*mG*mC*CGUGCAUGUGUUCAGAUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUm*mU *mU*mU	103

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 3】

ヒト TTR を標 的とする G O O 0 4 9 7 s g RNA 修飾配列	m C * m U * m G * C U C C U C C U C G C C U U G C G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 0 4
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 4 9 8 s g RNA 修飾配列	m A * m G * m U * G A G U C U G G A G A G C U G C A G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 0 5
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 4 9 9 s g RNA 修飾配列	m U * m G * m A * A U C C A A G U G U C C U C U G A G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 0 6
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 5 0 0 s g RNA 修飾配列	m C * m C * m A * G U C C A G C A A G G C A G A G G G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 0 7
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 5 0 1 s g RNA 修飾配列	m U * m C * m A * C A G A A A C A C U C A C C G U A G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 0 8

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 4】

ヒト TTR を標 的とする G O O 0 5 6 7 s g RNA 修飾配列	m G * m A * m A * A G C C U G C U G A U G A C A C C G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 0 9
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 5 6 8 s g RNA 修飾配列	m G * m G * m C * U G U C G U C A C C A A U C C C A G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 1 0
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 5 7 0 s g RNA 修飾配列	m C * m A * m U * U G A U G G C A G G A C U G C C U G U U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 1 1
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 5 7 1 s g RNA 修飾配列	m G * m U * m C * A C A G A A A C A C U C A C C G U G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 1 2
ヒト TTR を標 的とする G O O 0 5 7 2 s g RNA 修飾配列	m C * m C * m C * C U A C U C C U A U U C C A C C A G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 1 3

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 5】

カニクイザルT TRを標的とす るG 0 0 0 5 0 2 s g RNA 修飾配列	m A * m C * m A * C A A A U A C C A G U C C A G C C G G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A A G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 1 4
カニクイザルT TRを標的とす るG 0 0 0 5 0 3 s g RNA 修飾配列	m A * m A * m A * A G G C U G C U G A U G A G A C C G U U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A A G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 1 5
カニクイザルT TRを標的とす るG 0 0 0 5 0 4 s g RNA 修飾配列	m A * m A * m A * G G C U G C U G A U G A G A C C U G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A A G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 1 6
カニクイザルT TRを標的とす るG 0 0 0 5 0 5 s g RNA 修飾配列	m C * m A * m U * U G A C A G C A G G A C U G C C U G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A A G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 1 7

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 6】

カニクイザルT TRを標的とする G00050 6 s g RNA 修飾配列	m A * m U * m A * C C A G U C C A G C G A G G C A G G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m C m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 1 8
カニクイザルT TRを標的とする G00050 7 s g RNA 修飾配列	m C * m C * m A * G U C C A G C G A G G C A G A G G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m C m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 1 9
カニクイザルT TRを標的とする G00050 8 s g RNA 修飾配列	m C * m C * m U * C C U C C U C C U C G C U G G A C G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m C m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 2 0
カニクイザルT TRを標的とする G00050 9 s g RNA 修飾配列	m A * m A * m A * G U U C U A G A U G C C G U C C G G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m C m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 2 1

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 7】

カニクイザルト TRを標的とする G O O O 5 1 O s g R N A 修飾配列	m A * m C * m U * U G U C U U C U C U A U A C C C A G U U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 2 2
カニクイザルト TRを標的とする G O O O 5 1 1 s g R N A 修飾配列	m A * m A * m G * U G A C U U C C A G U A A G A U U G U U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 2 3
マウスTTRを 標的とするG O O O 2 8 2 s g R N A修飾配 列	m U * m U * m A * C A G C C A C G U C U A C A G C A G U U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	1 2 4
s g R N Aを形 成するためのガ イド配列の3' 末端に続く例示 的なヌクレオチ ド配列	G U U U A G A G C U A G A A A U A G C A A G U U A A A A A A G C C U A G U C C G U U A U C A A C U U G A A A A A G U G G C A C G A G U C G G U G C U U U	1 2 5

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 8】

c r R N Aを形 成するためのガ イド配列の 3' 末端に続く例示 的なヌクレオチ ド配列	GUUUUAGAGCCUAUGCUGUUUUUG	1 2 6
	未使用	1 2 7 ~ 2 0 0

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 9】

Ca s 9 DN Aコ--ト配列2	20 1
	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAAACAGCGTCG GATGGGCAGTCATCACAAGACGAAATACAAAGGTCCCGAGCAGAAGTTCAA GGTCTGGGAAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGA GCACTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAAGACTGAAGA GAACAGCAAGAAGAAATACACAAGAAGAAGAAACAGAAATCTGCTACCT GCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAGGTGGACGACAGCTTCTTC CACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGTCGAAAGAAAGACAAAGAACGCAAGAAA GACACCCGATCTTCGGAACATCGTCGACGAAGTGCGCATACCAACGAAAA GTACCCGACAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGAC AAGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGA CGTCGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTT GAAGAAAACCCGATCAACGCAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGA GGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCT GCCGGAGAAAAGAAAGAACGGACTGTTGGAAACCTGATCGCACTGAGC CTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGAG CAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAAG AACCTGAGCGACCGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAAACACAG AAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGA ACACCAACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTG CCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGCAAGAACGGATACG CAGGATACATCGACCGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATCTACAAAGTTCAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 0】

CAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAG CTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAAACATTTCGACAAACGGAA GCATCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCCAATCCTGAGAAAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCCTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAA AAGATCCTGACATTTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAAGAAAAGAGCGAAGAAACAAATCAC ACCGTGGAACTTCGAAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGC TTCATCGAAAAGAAATGACAAAACCTTCGACAAAGAACCTGCCGAAACGAAAAGG TCCTGCCGAAGCACAGCCCTGCTGTACGAAATACCTCACAGTCTACAAACGA ACTGACAAAAGGTCAAGTACGTTCACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCAATC CTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAA ACAGAAAAGGTCAACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGAT CGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAAC GCAAGCCTGGGAACATACCAAGACCTGCTGAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCCTGGACAAACGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCT GACACTGACACTGTTCCGAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAG ACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA GAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACGGAAAT CAGAGACAAAGCAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAAGAGCGAC GGATTTCGCAAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACAGCCCTGA CATTCAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAG CCTGCACGAAACATCGCAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAAGAAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 1】

GAAGACACAAAGCCGGAAAAACATCGTCAATCGAAATTGGCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAAACAGCAGAGAAAGAAATGAAAGAGAAATC GAAAGAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGG TCGAAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCCAGGAACTGGACATCAACAGACTG AGCGACTACGACCTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAGGACG ACAGCATCGACAAACAAAGTCTCTGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGGAAA GAGCGACAAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCGTCAAAGAAATGAAGAACTAC TGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACA ACCTGACAAAGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAAGCCAGG ATTCAATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACACAAAGTACGACGAAAAACGACA GCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAAACGACA AGCTGATCAGAGAAATCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAG CGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTCAAGAGAAATCAACAAAC TACCACCCACGACACAGACGCATACCTGAACGCAGTCGTGGAAACAGCAC TGATCAAGAAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAAGACAGAAATCACTGCGCAACCGAGAAATCAGAAAGAGACCGCT GATCGAAACCAACCGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACCAAGGGAAAG GACTTCGCCAACAGTCAGAAAGGTCTGTAGCATGCCGCAGGTCAACATCG TCAAGAAACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGCAAGGAAAGCATCTCT GCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 2】

	CCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCCGACAGTCCGATACAGCGTCC TGGTCGTGCAAAAGGTGGAATAAGGAAAGAGCAAGAAAGCTGAAAGCGGT CAAGGAACCTGCTGGGAATCAAAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAAAG AACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAAGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAACCTGGAAAACCG AAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAA CTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAAACTTCCCTGTACCTGGCAAGCCACT ACGAAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAAGCAACAGAAAGCAGCTGTT CGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAAACAGATCAGC GAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAAGGTCC TGAGCGCATACAACAAGCACAGACAGACAGCCGATCAGAGAACAGGCAGA AAACATCATCCACCCTGTTCACTACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCA TTCAAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAA AGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTA CGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC CCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 3】

C a s 9 DN A コ -- 下配列 1	2 0 2
ATGGATAAGAAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACCTAATTCCGTGG GTTGGGCAGTGATCAGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAAGTTCAA GGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGA GCCCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAGCGCGGCTCAAAAC GTACCGGAGCGGACGCTACACCGCGGAGAAATCGCATCTGCTATCT GCAAGAGATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTC CACCGCTGGAAAGATCTTCTGTGGAGGAGGACAAGAAAGCATGAAC GGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTCGACGAAAGTGCGTACCAAGAAAA GTACCGGACCATCTACCATCTGCGGAAGAGTTGGTTGACTCAACTGAC AAGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAAAT TCCGGGACACTTCTGATCGAAGGCGATCTGAACCTGTAACTCCGA CGTGGATAAGCTTTTCATTCAACTGGTGACAGCCTACAAACCACTGTTT GAAGAAAACCCCAATCAATGCTAGCGGCTCGATGCCAAGGCCATCCTGT CCGCCGGCTGTGGAAGTGGCGGCGCTCGAAACCTGATCGCACAGCT GCCGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCA CTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAAATTTTGACCTGGCCGAGGACG CGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAATTT GCTGGCACAAAATTGGCGATCAGTACGGGATCTGTTCCTTGGCGCTAAG AACCTTTCGGACGCAATCTTGTGTCCGATATCTCGCGGTGACACCG AAATAACCAAGCGCGCTTAGCGCTCGATGATTAAAGGTTACGACGA GCATCACCCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTG CCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGTCCAAGAAATGGGTACG CAGGGTACATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCAT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 4】

CAAAGCCAAATCCTGGAAAAAGATGGACGGGAACCCGAAAGAACTGCTGGTCAAAG CTGAACAGGGAGGATCTGTCTCCGGAACACAGAGAAACCTTTGACAAACGGAT CCATTCCCCACACAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGGCG CCAGGAGGACTTTTACCCATTCTCTCAAGGACACCCGGGAAAAGATCGAG AAAAATCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCGGGCG GCAATTCCGGCTTCGGCTGGATGACTAGAAAAATCAGAGGAAACCATCAC TCCTTGGAATTTCCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCCACAAAGC TTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAAGAACTCCCCAACGAGAAAGG TGCTTCCCTAAGCACAGCCTCCCTTTACGAATATCTTCACTGTCTACAAACGA ACTGACTAAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCCTTT CTGTCCGGAGAACAGAAAGAAAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCA ACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAAGAT CGAGTGTTTCCGACTCAGTGGAAATCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAAAC GCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCCCTTGACAAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCCT GACCTTGACCCCTTTTCGAGGATCCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAG ACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCAATGAACAACTCAAGCGCC GCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACCGGTAT TCGCGATAAACAGAGCGGTAAACCTATCCTGGATTTCCTCAAAATCGGAT GGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCCCTGA CCTTTAAGGAGGACATCCAAAAGCACAAAGTGTCCGGACAGGGAGACTC ACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCCGCCGGGATTAAAGAAAG GGAATTCGTCAAACTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGGTCATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 5】

GACGGCACAAACCGGAGAAATATCGTGATTGAAATGGCCCCGAGAAAAACCA GACTACCCAGAAAGGCCAGAAAAAACTCCCGCGAAAAGGATGAAGCGGATC GAAAGAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCCTGAAAAGAGCACCCGG TGGAAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTCTACCTGTACTATTGCA AAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTG TCTGATTACGACGTGGACCAACATCGTTCCACAGTCCCTTCTGAAGGATG ACTCGATCGATAAACAAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAAGAACAGAGGAA GTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCTGTGAAGAAGATGAAGAATTAC TGGCGGCAGCTCCTGAATGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACA ATCTCACTAAAGCCGAGCGCGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGG ATTCAATCAAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGCTG GCGCAGATCTTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATA AGCTCATCCGGGAAGTGAAAGTGATTACCCCTGAAAAGCAAACTTGTGTC GGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTACAAAAGTGAGAGAAATCAACAAAC TACCATCACCGGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTACCGCCC TGATCAAAAAAGTACCCCTAAACTTGAAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCCAAGTCCGAACAGGAAATC GGGAAAGCAACTGCGAAAATACTCTTTTACTCAAAACATCATGAACTTT TCAAGACTGAATTTACGCTGGCCAAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACT GATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAAGGGCAGG GACTTCGCAACTGTTCCGCAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTG TGAAGAAACCGAAGTCCAAACCCGGGATTTCCAAAGGAATCGATCCT CCCAAGAGAAATAGCGACAAAGCTCATTTGCACGCAAGAAAGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 6】

	CCGAAAGAGTACGGAGGATTTCGATTTCGCCGACTGTCCGATACTCCGTCC TCGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAAATCCGT CAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTTCGAGAAAG AACCCGATTGATTTCCTCGAGGGGAAGGGTTACAAAGGAGGTGAAGAAAGG ATCTGATCATCAAACTCCCCAAGTACTCACTGTTCCGAACTCGAAAAATGG TCGGAAGCCGATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAG CTGGCCTTGCCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTTGCTTCGCACT ACGAAAAAATCAAAAGGTCACCCGAAAGATAACGAAACAGAAAGCAGCTTTT CGTGGAGCAGCACAAAGCATTTATCTGGATGAATCATCGAAACAAATCTCC GAGTTTCAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCC TGTCGGCCCTACAAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGA GAACATTATCCACTTGTTCAACCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCC TTCAAGTACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAAGATACACGTCCACCA AGGAAGTTCTGGACGCGACCCCTGATCCACCAAAAGCATCAGTGGACTCTA CGAAACTAGGATCGATCTGTCCGAGCTGGGTGGCGATGGCGGTGGATCT CCGAAAAAGAGAGAAAGGTGTAAATGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 7】

C a s 9 ア ズ ノ 酸配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF IIRLEESFLVEEDKKIHERHIPFGNIVDEVAYIEKYPTIYHLRKKLVDSTD KADLRLIYLALAIMIKFRGHFLIEGDLNPNDSVDKLFILQLVQTYNQFL EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAFDAKLQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVRQQL PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPHIILGELHAILRRQEDFYFFLKDNREKIE KILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEFVVDKGASQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSHLLYFYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLKKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLK TYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD GFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGGQDLSLHEHIANLAGSPAIAKK GILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRI EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNY WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKIIV AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVINN YHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQE I GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITTLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGTFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD	20 3

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 8】

	PKKYGGFDSP TVAYSVLVVAKVEKGSKKLKS VKELLGITIMERS SF EK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLF ELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNF LYLASHIEKLKGS PEDNEQQLFVEQIHKIYLD EIIIEQIS EFSKRVI LADANLDKVL SAYNKHIRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGS PKKKRKV	
		10
		20
		30
		40
		50

【表 4 3 - 5 0】

	CAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAACAGAAAGAACUGCCUGGUCAAG CUGAACAGAGAAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAAACAUUCGACAAACGGAA GCAUCCCGCACCCAGAUCCACCCUGGGAGAACUGCACGCATUCCUGAGAAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAAACAGAGAAAAGAUCCGAA AAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACCGCGGACCCGUCGCAAGAG GAAACAGCAGAUUCCGCAUGG AUGACAAGAAAGAGCCGAAGAAACAAUUCAC ACCGUGGAACUUCCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGC UUCAUCGAAAAGAAUGACAAACUUUCGACAAAGAACCUGCCGAAACGAAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUUACAGUUCUACAAACGA ACUGACAAAGGUCAAGUACCGUCACAGAAAGGAUGAGAAAGCCGGCAUUC CUGAGGGGAGAACAGAAAGAAAGGCAUCCGUCGACCGUGGUUCAAAGACAA ACAGAAAGGUCAACAGUCAAAGCAGCUGAAGGAAAGACUACUUCAAAGAAAGAU CGAAUGCUUUCGACAGCCGUCGAAAACAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAAAC GCAAGCCUGGGAAACUACCAAGACCGUCUGAGAGAUCAUCAAGGACAAAGG ACUUCUUGGACAAAGAAAGAAACGAGACAUCCUGGAGACAUCCUCCU GACACUGACACUGUUCGAGACAGAGAAAUAGAUCCGAAGAAAGACUGAAG ACAUACGCCACACCCUGUUCGACGACAAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAA GAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAACCGGAU CAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGAC GGAUCCGCAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGA CAUUCAGGAAGACAUCCAGAAAGGACAGGUCAAGGACAGGAGACAG CCUGCACGAACACAUCCGCAACCCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAAGAAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAAGGUCCGUCGACGAAACUGGUCAAAGGUCAUGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 1】

GAAGACACAAGCCCGGAAAAACAUCGUCAUUCGAAAAUGGCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAAACAGCAGAGAAAGAAUAGAAAGAAUUC GAAGAAAGGAUUCAAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGG UAGAAAAACACACAGCUGCAGAAAGAAAGAAAGCUGUACCUUGUACUACCUGCA GAACGGAAAGAGACAUGUACGUCGACCCAGGAACUGGACAUCACAACAGACUG AGCGACUACGACGUCGACCAACAUCGUCGCCAGAGAUUCUGAAGGACG ACAGCAUCGACAAACAAGGUCUGACAAAGAGCGACAAAGAACAGAGGAAA GAGCGACAACGUCGCCGAGCGAAGAAAGUUCUCAAAGAAUGAAGAAACUAC UGGAGACAGCUGCUGAACCGCAAGCUGAGUACAACAGAGAAAGUUCGACA ACCUGACAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGG AUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAACAAAGCACGUC GCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAAACAACAAGUACGACGAAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAAGUCAAAGGUCAUCACACUGAAGCAAGCUUGGUCAG CGACUUCAGAAAGGACUUCACAGUUCUACAAGGUCAAGAAAUCAACAAC UACCAACACGCAACAGACGCAUACCUGAACCGCAGUCCUGGAAACAGCAC UGAUCAAAGAAAGUACCCGAAGCUGGAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUA CAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUAGUUCGCAAAAGAGCGAACAGGAAAUC GGAAGGCACAAGCAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUAGAACUUCU UCAAGACAGAAUUCACACUGGCACAAAGGAGAAUACAGAAAGACCCGU GAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAUUCGUCUGGGAACAAGGGAAGA GACUUCGCACAGUCAGAAAGGUCUUGAGCAUCCCGAGGUCACACUCCG UCAAGAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAGCAUCCU GCCAAGAGAAACAGCGACAAAGCUGAUCCGCAAGAAAGAAAGGACUGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 2】

	CCGAAGAAGUACGGAGGAUUUGACAGACAGCCCGACAGUCCGAUAACAGCGUCC UGGUCGUCGCAAGGUCGAAAGGGAAGAGCAAGAAAGCUGAAGAGCGU CAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCUUGGAAGAAAGCAGCUCUCCGAAAG AACCCGAUCGACUCCUGGAAGCAAGGGAUACAAAGGAAGUCAGAAAGG ACCUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUUGGAAACCG AAGAAAGAGAAUCCUGGCAAGCCAGGAGAACUGCAGAAAGGAAACGAA CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAAACUUCUGUACCUUGGCAAGCCACU ACGAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGAAAGACAAACGAAACAGAAAGCAGCUGUU CGUCGAAACAGCACAAAGCACUACCUUGGACGAAAUCAUCGAAACAGAUACGC GAUUACAGCAAGAGAGUCUCCUUGGCAGACGCAACCUUGGACAAAGGUCC UGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGA AAACAUCUCCACCUUGUUCACACUGACAAACCUUGGAGCACCGGCAGCA UUCAAGUACUUCGACACAAACAACUCCAGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAA AGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCCAGCCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAAGC CCGAAGAAGAGAAAGGUUAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 3】

C a s 9 m R N A O R F 1	2 0	AUGGAUAAAGAAAGUACUCAAUCCGGGCUUGGAUAUCCGGAACUAAUUCGUGG
	5	GUUGGGCAGUGAUCACGGAGUGAAUAACAAAGUGCCGUCACAGAAAGUUCAA GGUCCUGGGGAACACCGAUAGACACAGCAUCACAGAAANAAUUCUACUCGGA GCCUGCUGUUUGACUCCGGCGAAACCGCAGAGCGACCCGGGCUCAAAC GUACCGCGAGGCGACGCUACACCGCGCGAAGAAUCCGACUCUGCUAUCU GCAAGAGAUUUUUUGAACGAAUUGGCAAAGGUCCGACGACAGCUUUUUU CACCGCCUGGAAGAAUUCUUUCCUGGUGGAGGAGCAAGAAAGCAUGAAC GGCAUCCUAUCUUUGGAAACAUUGUUGGACGAAUGUGGCUACCAAGAAAA GUACCGGACCAUCUACCAUCUGCGGAGAGAGUUGGUUGACUCAAUCGAC AAGCCGACCUAGAUUGAUUACUUUGGCCUCCGCCADUAGAUCAAU UCCCGGACACUUCCUGAUCCGAAAGCGGAUCUGAACCCUGAAACUCCGA CGUGGAUAAAGCUUUUUAUUCAAUCUGGUGCAGACCUACAAACCAACUGUUC GAAGAAAACCCAAUCAAUGCUAGCGGCGUGCGAUGCCAAAGGCCAUCCUGU CCGCCCGGCGUGUGAAGUCCGGCGCCUCCGAAACCUUGACGACAGCU GCCGGAGAGAAAGAAACGACUUUUCCGCAACUUUGAUCGCUUCUCA CUGGACUCACUCCCAAUUUCAAGUCCAAUUUUGACUUGCCGAGGACG CGAAGCUGCAACUCUCAAGGACACCUACGACGACGACUUGGACAAUUU GCUGGCACAAUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUGUUCCUUGCCGCUAAG AACCUUUCGGACGCAAUUUUGUGUCGUAUUCUUGCGGUGAACACCG AAAUAAACAAAGCGCCGUUAGCGCCUCCGAUGAUUUAAGCGGUACGACGA GCAUCACCGAGAUUCACGCUCCUCAAGCGCUCCUGAGACAGCAACUG CCUGAAAAGUACAAAGGAGAUUUUCCAGCCAGUCCAAAGAAUGGGUACG CAGGGUAUCAUGGAUGGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUUUAAGUUCAU

10

20

30

40

50

CAAGCCAAUUCUGGAAAAAGAUUGGACGGAAACCGAAGAACUCUGGUCAAAG CUGAACAGGGAGGAGUCUGCUCGGAAACAGAGAACCCUUUGACAAACGGAU CCAUUCGCCACAGAUCCAUUCUGGGUGAGUCGACGCCAUCUUGCGCGG CCAGGAGGACUUUACCCAUUCUACAGGACACCGGGAAAGAUCCGAG AAAAUUCUGACGUUCCGCACUCCGUUUACGUGGGCCACUGGCGCGCG GCAAUUCGCGCUUCGCGUGGAUGAGACUAGAAAAUCAGAGGAACCAUCAC UCCUUGGAAUUUCGAGGAAGUUGUGAUAAAGGAGCUUCGGCACAAAGC UUCAUCGAACGAUAGACCAACUUCGACAAAGAAUUCUCCAAACGAGAAAG UGUUUCUAAAGCACAGCCUCCUUUACGAAUACUUCACUGUCUACAAACGA ACUGACUAAAGUGAAAUACGUUACUGAAGAAUGAGGAAGCGGCCUUU CUGUCCGGAGAACAGAAAGAAAGCAAUUGUCGAUCUGUGUUCAAGACCA ACCGCAAGGUGACCGUCAAAGCAGCUUAAAGAGGACUACUUCAAAGAAAGAU CGAGUGUUUCGACUCAGUGGAAAUACAGCGGGUGGAGGACAGAUUCAAAC GCUUCGUGGGAACCUAUCAUGAUUCUCCUGAAGAUCAUCAAGGACAAAG ACUUCUUGACAAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAAGAUACGUUCCU GACCUUGACCCUUUCCGAGGAUCGCGAGAUUGAGGAGAGGCUUUAAG ACCUACGCUCAUCUUCUUGACGAUAAAGGUCAUGAAACAAUCACAGCGCC GCCGGUACACUGGUUGGGGCCGCCUUCUCCCGCAAGCUGAUCAAACGGUAU UCCGGAUAAACAGAGCGGUAAACUUAUCCUGGAUUUCCUCAAAUCGGAU GGUUCGCUAAUUCGUAAACUUCUGCAAUUGAUCCACGACGACAGCCUGA CCUUUAAAGGAGGACAUCCAAAAGCACAAUGUCCCGACAGGGAGACUC ACUCCAUGAACACAUCCCGAAUCUGGCCGUUCCGGCGCGGAUUAAGAAAG GGAUUUCGCAAAACUGUAAAGGUGGUCCGACGAGCUUGGUGAAGGUCUAGG

50

【表 4 3 - 5 5】

	GACGGCACAAACCCGGAGAAUUAUCGUGAUUUGAAAUUGGCCCGGAGAAAACCA GACUACCCAGAGGGCCAGAAAACUCCCGGAAAGGAUGAAGCGGAUC GAAGAAGGAUUCAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAAGAGCACCCGG UGGAAAACACGCAGCUGCAGAACGAGAGAGCUCUACCUUACUUAUUUGCA AAUGGACGGGACAUGUACGUGGACCAAGAGCUGGACAUAUCGGUUG UCUGAUUACGACGUGGACCAUAUCGUUCCACAGUCCUUCUUAAGGAUG ACUCGAUCGAUAAACAAGGUGUUGACUCGACGCGACAAAGAACAGAGGGA GUCAGAUAAUUGUCCAUCCGAGGAGGUGUGAAGAGAGAAUUAUC UGGGGCAGCUCUUGAAUUGCGAAGCUGAUUACCCAGAGAAAGUUUGACA AUUCACUAAGCCGAGCGCGGCGGACUCUAGAGCUGGAUAAAGGCUGG AUUCAUCAAACGGCAGCUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUG GCGCAGAUUCUUGGACUCCCGCAUGAACACUAUUACGACGAGAACGAUA AGCUCUCCGGGAAGUGAAGUGAUUACCCUGAAAGCAACUUGUGUC GGACUUUCGGAGGACUUUCAGUUUACAAAGUGAGAGAAUCAAACAA UACCAUCACGGCAUGACGCAUAACCUCAACGCGUGGUCGGUACCGCCC UGAUCAAAAGUACCCUAAACUUGAAUCGGAGUUUGUACGGAGACUA CAAGGUCUACGACGUGAGGAAGAUAGUAGCCAGUCCGAAACAGGAUUC GGAAAGCAACUGCGAAAUACUUCUUUUAUCUCAAACAUCUAGAACUUUU UCAGACUGAUAUUCGUGGCCAUUGGAGAAUUCAGGAAAGAGGCCACU GAUCGAAACUAACGGAGAAACGGGGCAAUUCGUGUGGGACAAAGGGCAGG GACUUCGCAACUGUUCGCAAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGUCAAUUUG UGAAGAAACCGAAGUGCAACCGGGCGAUUUUCAAGGAUCCGACCU CCAAAGAGAAAUAGCGACAAAGCUCAUUGCACGCAAGAAAGACUGGGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 6】

	CGAAGAAAGUACGGAGGAUUUCGAUUCGCCGACUUGUCCGCAUACUCCGUCC UCGUGUGGCCAAGGUGGAGAAAGGAAAGAGCAAAAAGCUCAAAUCCGU CAAAGAGCUGCUGGGGAUUACCAUCAUGGACGAUCCUGGUCCGAGAAAG AACCCGAUUGAUUUCCUCGAGGGAGGGUUACAGGAGGUAGAAAGG AUCUGAUCAUCAAAACUCCCAAGUACUACUGUUCCGAACUGGAAAAUUG UCGGAAGCCCAUGCUGGCUUGGCCCGGAGAACUCCAAAAGGAAAUAGAG CUGGCCUUGCCUAGCAAGUACGUCAACUUCUCCUUAUCUUGCUUCGCACU ACGAAAACUCAAGGUCACCGGAAGAUACGAACAGAACGACGUUUU CGUGGAGCAGCAACAGCAUUUUCUGGAUGAAAUCAUCCGAAACAAAGUCC GAGUUUCAAAGCGCGUAUCCUGCCGACGCCAACCCGACAAAGUCC UUCGGCCUACAUAAGCAUAGAGAUAAAGCCGAUCAGAGAACAGGCCGA GAACAUAUCCACUUGUUCACCCUGACUAACCUGGGAGCCCGAGCCGC UUCAAGUACUUCGAUACUACUUCGAUCGCAAAAAGAUACACGUCACCA AGGAAGUUUCUGGACGCGACCCUGAUCACCAAAAGCAUCACUGGACUCUA CGAAACUAGGAUCCGAUCUGUCCGAGCUGGGUGGCGAUGGCCGUGGAUUC CCGAAAAGAGAGAAAGGUGUAUGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 7】

C a s 9 ニ ッ カ ーゼ (D10 A) アミノ酸配 列	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSPKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSF IRLEESFLVEEDKKHIERIPIFGNIVDEVAYIEKYPTIYILRKKLVDSTD KADLRLIYLAALAIMIKFRGIHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLF FENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIAALS LGLTPNFKSNFDLAEDAQLLSKDTYDDLDNL LAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL PEKYEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPHIILGELHAIILRRQEDFYFLLKDNREKIE KIILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQS FIERMTNFDKNIIPNEKVLPHKSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDILLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIERLK TYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD GFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGS LHEHIANLAGSPA I KK GILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSREFMKRI EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKNY WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKIIV AQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVIENN YHHAHDAYLNAVVGTA LIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMKIAKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 8】

	PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGSKKLKSVKELLLGITIMERSSEK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFLYLASHIEKLGSPEDNEQQLFVEQIKIYYLDEIEQIS EFSKRVI LADANLDKVL SAYNKHIDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGS PKKKRKV	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 9】

C a s 9 ニ ッ カ --P (D10 A) mRNA ORF	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCCGGACUGGCCAAUCCGGAACAAACAGCGUCG	20 7
	GAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAAGGUCCCGAGCAAGAAAGUUCAA GGUCCUGGGAAACACAGACACAGACACAGCAUCACAGAAACCCUGAUCGGA GCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAGAAACAAAGACUGAAGA GAACAGCAAGAAAGAAUACACAAAGAAAGAAAGAAACAGAAUUCUGCUACCU GCAGGAADUUCAGCAACGAAUAGGCAAGGUCAGGACGACAGCUUCUUC CACAGACUGGAAAGAAAGUUCUGGUCGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAA GACACCCGAUCUUCGGAAACAUCCGUGGACGAGAAUCCGCAUCCACGAAAAA GUACCCGACAAUCUACCCUUGAGAAAGAAAGCUGGUCGACAGCACAGAC AAGGCAGACCUAGACUGAUUACUACUUGGCACUGGCACACAUCAAGU UCAGAGGACACUUCUUGAUCCAGGAGACCUGAACCCGGACACAGCGA CGUCGACAAAGCUGUUCAUCCAGCUUGGUCCAGACAUACAAACCCAGCUUUC GAAGAAACCCGAUCAAACGCAAGCCGGAGUCGACGCAAGGCAAUCCUGA GGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAAACCUGAUCCGACAGCU GCGGGAGAAAGAAAGAACGGACUUGUCCGGAACCUGAUCCGACUGAGC CUGGGACUGACACCGAAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUUGGCAGAAAGCG CAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUUGGACAAACCU GCUGGCACAGAUCCGGAGACCAGUAACGACAGACCUGUUCCUGGCAGCAAG AACUGAGCGACGCAUUCUUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAAACACAG AAUUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAAGAGAUACGACGA ACACCAACAGGACCUGACACUGCUGAAGGCAUUGGUACAGACAGCAGCUUG CCGGAAAAGUACAAGGAAAUUUUUUCCGCCAGACAGCAAGAACGGAUACG CAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUUACAAGUUCAU	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 6 0】

	CAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAACAGAAAGAACUGCUGGUCAAAG CUGAACAGAGAAAGACCUGGUCUGAGAAAGCAGAGAAACAUUCGACAAACGGAA GCAUCCCGCACCCAGAUCCACCGUGGAGAAACUGCACGCAAUCCUGAGAAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAAACAGAGAAAAGAUCCGAA AAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGACCGCUGGCAAGAG GAAACAGCAGAUUCGCAUGGAGUACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUAC ACCGUGAAACUUCGAAAGAAUGUCGUCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGC UUCAUCGAAAAGAAUGACAAACUUCGACAAAGAACUGCCGAAACGAAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUUCACAAACGA ACUGACAAAGGUCAGUACGUCACAGAAAGGAUGAGAAAGCCGGCAUUC CUGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGGCAUCCUGCACCGUUGUUCAGACAA ACAGAAAGGUACACAGUCAAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAAGAAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGUCCGAAAUCAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAAAC GCAAGCCUGGGAACAUAACACGACCGUCUGAGAGAUCAUCAAAGGACAAAG ACUUCUUGGACAAAGAAAGAAACGAAAGACAUCCUGGAAAGACAUCCUCCU GACACUGACACUGUUCGAAAGACAGAGAAAUUGAACGAAAGACUCUGAAG ACAUAACGCACACCCUGUUCGACGACAAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAA GAAGAUAACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUAACCGGAU CAGAGACAAAGCAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCUUGAAGAGCGAC GGAUUCGCAAAACAGAAACUUCUUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGA CAUUCAGGAAGACAUCCAGAAAGGCACAGGUACAGCGGACAGGAGACAG CCUGCACGAACACAUCCCAACCCUGGCAGGAAGCCCGCAAUCAAAGAG GGAUCCUGCAGACAGUCAAAGGUCCGUCGACGAAACUGGUCAAAGGUCAUGG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 6 1】

	GAAGACACAAGCCGGAAAAACAUCGUCUACGAAAUGGCCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUUC GAAGAAAGAAUCAAAGGAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGG UCGAAAACACACAGCUCGACAGAACGAAAAGCUGUACCUUACUACCUGCA GAACGGAACAGACAUCUACCUCCAGCAACAGGAACUGGACAUCACAGACUG AGCGAUACGACGUCGACCAUCCUCCGAGAGCAGAGCAGAGCAGAGAGAGG ACAGCAUCGACAAACAGGUCUGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGGAAA GAGCGACAAACGUCGCCGAGCGAAGAGAGUGUCAAAGAAAGAAAGAACUAC UGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAAGCUGAUCAACACAGAGAAAGUUCGACA ACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGG AUUCAUCAAAGACAGCUGGUCGAAACAAAGACAGAUCAACAAGCACGUC GCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAAACACAAAGUACGACGAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAAGUCAAAGGUCAUCAACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAG CGACUUCAGAAAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAAAC UACCAACAGGACACGACGCAUACCUAGAACGAGUCCGCGAACAGCAC UGAUCAGAAAGUACCCGAAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUUACGGAGACUA CAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUAGUCCGCAAAAGAGCGAACAGGAAUUC GGAAGGCAACAGCAAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCU UCAAGACAGAAAUCAACACUGGCAACCGGAGAAAUCAAGAAAGAGCCGU GAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUUCGUUCUGGACAAAGGAAAG GACUUCGCAACAGUACAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGACAGGUCAACAUCC UCAAGAAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAGCAUCCU GCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAAGACUGGGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 6 2】

CCGAAAGAGUACGGAGGAUUUCGACAGCCCCGACAGUCCGAUACAGCGGUCC UGGUCGUCGCAAAAGGUCGAAAGGAAAGAGCAAGAAAGCUGAAGAGCGGU CAAGGAACUCUGCGGGAUUCACAAUCUUGGAAAGAAAGCAGCUUCGAAAGG AACCCGAUCGACUUCUUGGAAGCAAGGGAUACAAAGGAAGUCAAAGAAAGG ACCUGAUCAUCAAGCUGCCGGAAGUACAGCCUGUUCCGAACUGGAAACCGG AAGAAAGAGAAUUCUGGCAAGCCAGGAGAACUGCAGAAAGGAAACGAA CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUAACUUCUUGUACCUUGGCAAGCCACU ACGAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAAAGAAACAGAAAGCAGCUGUU CGUCGAAACAGCAACAGCACUACCUUGGACGAAAUCAUCCGAACAGAUCCAGC GAUUCAGCAAGAGAGUACUCCUUGGCAGACCGCAAACCUGGACAAGGUCC UGAGCGCAUACAAAGCACAGAGACAAAGCCGAUCCAGAGAACAGGCAGA AAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUUGGAGCACCGGCAGCA UUCAAGUACUUCGACACAACAUAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAA AGGAAGUCCUGGACGCAACAUCUGAUCCACCAGAGCAUCCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCCAGCCUAGGCCAGCUUGGAGGAGACCGGAGGAGGAAGC CCGAAAGAGAGAGAAAGGUUAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 6 3】

dC a s 9 (D 1 0 A H 8 4 0 A) アミノ酸 配列	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDSDSFF IIRLEESFLVEEDKKIHERIPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYIILRKKLVDSTD KADLRLIYLALAIMIKFRGHIPLIEGDLNPDNSDVDDKLFILQVQTYNQFLF EENPINASGVDAKAILSARLSKRRLENLIAQLPGKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVRQQL PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPIHQIHLGELHAILRRQEDFYPLKDNREKIE KILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEFVVDKGSASQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYYHDLKLIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLK TYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSD GFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGGQDSLHEHIANLAGSPAIAKK GILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKQKNRERMKRI EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNY WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKIIV AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVEINN YHHAHDAYLNAVVGTA L I K K Y P K L E S E F V Y G D Y K V Y D V R K M I A K S E Q E I G K A T A K Y F F Y S N I M N F F K T E I T L A N G E I R K R P L I E T N G E T G E I V W D K G R D F A T V R K V L S M P Q V N I V K K T E V Q T G G F S K E S I L P K R N S D K L I A R K K D W D	2 0 8

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 6 4】

	PKKYGGFDSP TVAYSVLVVAKVEK GKSKKLKSVKELLGITIMERS SF EK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNF LYLASHIYEK LKGS PEDNEQKQLFVEQIKHIYLD EII EQIS EFSKRVI LADANLDKVLSAYNKH RDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGS PKKKRKV	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 6 5】

d C a s 9 (D 1 0 A H 8 4 0 A) mR N A O R F	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCCGGACUGGGCAAUCCGGAACAACACAGCGUCG GAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAAGGUCCCGAGCAAGAAAGUUCAA GGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAAGAAACCCUGAUCGGA GCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAGACUGAAGA GAACAGCAAGAAAGAAUACACAAAGAAAGAAAGAAACAGAAUCCUGCUACCU GCAGGAAUUUUACGACAGAAUAGGCAAGGUCCGACGACAGCUUUCUUC CACAGACUGGAAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAAGAAAGCAAGAAAGCAAGAA GACACCCGAUCUUCGGAAACAUCCGUCGACGAAAGUCCAUACCAAGCAAGAA GUACCCGACAAUCUACCAUCCUGAGAAAGAAAGCUGGUCGACAGCACAGAC AAGGCAGACCUAGACUGAUUACUACUUGGACUUGGCACACAUCAUCAAAGU UCAGAGGACACUUCUGAUCCGAAAGGAGACCUGAACCCGGACACAGCGA CGUCGACAAAGCUGUUCAUCCAGCUUGGUCCAGACAUACAAACCAAGCUUUC GAAGAAACCCGAUCAAAGCAAGCGGAGUCGACGCAAGGCAAUCCUGA GCCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAAACCUGAUCCGACAGCU GCCGGAGAAAGAAAGAACGGACUUGUCCGGAACCUGAUCCGACUGAGC CUGGGACUGACACCGAAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUUGGACAGAAAGCG CAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUUGGACACACCU GCUGGCACAGAUCCGGAGACCAGUAACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAG AACUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAAACACAG AAUUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAAGAGAUACGACGA ACACCAACAGGACCUGACACUGCUGAAGGCAUUGGUUACAGACAGCAGCUG CCGGAAAGUACAAGGAAAUUUUUUCCAGCCAGACAGCAAGAACGGAUACG CAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUUACAAGUUCAU

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 6 6】

CAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUUGGACGGAAACAGAAAGAACUGCUGGUCAAG CUGAACAGAGAAAGACCUGCUGAGAAAACAGAGAACAUUCGACAAACGGAA GCAUCCCGCACCCAGAUCCACUGGGAGAACUGCACGCCAAUCCUGAGAAAG ACAGGAAGACUUUCUACCCGUCCUGAAGGACAAACAGAGAAAAGAUCCGAA AAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAG GAAACAGCAGAUUCGCAUGGAGUAGACAGAAAGAGCGAAGAAACAUAUCAC ACCGUGGAACUUUCGAAAGAGUUCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGC UUCAUCCGAAAGAUAGACAAACUUUCGACAAAGAACCCUGCCGAAACGAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUACAGUUCACAAACGA ACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAAGAAUAGAAAGCCGGCAUUC CUGAGCGGAGAACAGAGAAAGGCAUUCGUCCAGCCUGGUUUCAAGACAA ACAGAAAGGUCAACAGUCCAAAGCAGCUGAAGGAAAGACUACUUUCAAAGAAU CGAAUGCUUCGACAGCGUCCGAAAUACAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAAAC GCAAGCCUGGGAACAUACACGACCCUGCUGAAGAUCAUCAAAGGACAAAG ACUUCCUGGACACGAGAAAGAAACGAAAGACAUCCUGGAGACAUCCGUCCU GACACUGACACUUGUUGAAGACAGAGAAAUAGAUCCGAAAGAAAGACUGAAG ACAUAACGCACACCCUGUUCGACGACAAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAA GAAGAUACACAGGAUUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAAACGGAAU CAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGAC GGAUUCCGCAACACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACGCCUGA CAUUCAAAGGAAGACAUCCAGAAAGCACAGGUCAAGCGGACAGGGAGACAG CCUGCACGAAACACAUCGCAACCCUGGCAGGAAAGCCCGCAAUCAAGAAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAAGGUCCGUCGACGAAACUGGUCAAAGGUCAUGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 6 7】

	GAAGACACAAGCCGGAAAAACAUCGUCUCCGAAAUUGGCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAAGAAUGAAGAGAAUUC GAAGAAAGGAUUCAAAGGAACUCUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGG UCGAAACACACAGCUCGACAGAACGAAAGCUGUACCUUACUCCUGCA GAACGGAAGACAGACAUGUACCUCCAGCCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG AGCGAUACGACGUCGACGCAAUUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACG ACAGCAUCCGACAAACAAAGGUCUGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGGAAA GAGCGACAAACGUCGCCGAGCGAAGAAAGUCCUCAAAGAAUGAAGAAACUAC UGGAGACAGCUGCUGAACGCAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCCGACA ACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAAGCAGG AUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAAGACAGAUCAACAAGCACGUC GCACAGAUCCUGGACACGACAGAAUAGAACACAAAGUACGACGAAAAACGACA AGCUGAUCAAGAGAAAGUCAAAGGUCAUCAACUCAGAAAGACAAAGCUGGUCAG CGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAAAC UACCAACACGACACAGACGCAUACCUAGAACCGAGUCCGUAACAGGAC UGAUCAGAAAGUACCCGAAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUUACGGAGACUA CAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUAGUCCGCAAAAGAGCGAACAGGAAAUUC GGAAGGCAACAGCAAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCU UCAAGACAGAAAUCAACUGGCAACCGGAGAAUUCAGAAAGAGACCGCU GAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAUUCGUUGGACAAAGGAAAGA GACUUCGCAACAGUACAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGACAGGUCAACAUCCG UCAAGAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGGCAAGGAAGCAUCCU GCCGAAGAGAAACAGCGACACAGCUGAUCGCAAGAAAGAAAGACUGGGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 6 8】

	CCGAAGAAGUACGGAGGAUUUCGACAGCCCGACAGUCCGAUAACAGCGUCC UGGUCGUCGCAAGGUGGAAAAGGGAAGAGCAAGAAAGCUGAAGAGCGU CAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCUUGGAAGAAAGCAGCUUCGAAAGA AACCCGAUCGACUUCUUGGAAGCAAGGGAUACAAAGGAAGUCAGAAAGG ACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAAACUGGAAAACGG AAGAAAGAGAUUCUGGCAAGCCAGGAGAACUGCAGAAAGGAAACGAA CUGGCAUCUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUUGGCAGCCACU ACGAAAAGCUGAAGGAAGCCCGGAAAGCAACGAACAGAAAGCUGU CGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAACAGAUACAGC GAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAACCCUGGACAAAGGUCC UGAGCGCAUACAACAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGA AAACAUCAUCCUUGUUCACACUGACAAACCUUGGGAGCACCGGCAGCA UUCAAAGUACUUCGACACAACAAUUCGACAGAAAGAGAUACACAAAGCACAA AGGAAGUCCUGGACGCACACACUGAUCCACAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAUUCGACCUAGCCAGCCUGGGAGGAGACCGAGGAGGAGC CCGAAGAAGAGAGAAAGGUUAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 6 9】

C a s 9 ベアコ --ド配列	2 1 0
G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C A U G G A C A U C G G A A C A A A C A G C G U C G G A U G G C A G U C A U C A C A G A C A G A A U A C A A G G U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C U G G G A A A C A C A G A C A G A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G U C G A C A G C G G A G A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A G A A C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A A A G A A C A G A A U C U G C U A C C U G C A G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G G U C G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C U G G U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C G A U C U U C G G A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C C G A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A C A G A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C A C C U G G C A C U G G C A C A C A U G A U C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A G A C C U G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A U C C A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U U C G A A G A A A C C C G A U C A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G A G C G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A U C G C A C A G C U G C C G G G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G A A A C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C A A G A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C C G A A A G C U G C A G C U G A G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U G G C A C A G A U C G G A G A C C A G U A C G C A G A C C U G U U C C U G G C A G C A A A G A A C C U G A G C G A C G C A A U C C U G C U G A G C G A C A U C C U G A G A G U C A A C A C A G A A A U C A C A A A G G C A C C G C U G A G C G C A A G C A U G A U C A A G A G A U A C G A C G A A C A C C A C C A G G A C C U G A C A C U G C U G A A G G C A C U G G U C A G A C A G C A G C U G C C G G A A A G U A C A A G G A A A U C U U C U G A C C A G A C C A G A G C A A G A A C G G A U A C C G A G G A U A C A U C G A C G G A G G A G C A A G C C A G G A A G A A U U C U A C A A G U U C A U C A A	

10

20

30

40

50

G C C G A U C U G G A A A A G A U G G A C G G A A C A G A A G A A A C U G C U G G U C A A A G C U G A A C A G A G A A G A C C U G C U G A G A A A G C A G A G A A C A U U C G A C A A C G G A A G C A U C C G C A C C A G A U C C A C C U G G G A G A A C U G C A C G C A A U C C U G A G A A G A C A G G A A G A C U U C U A C C C G U C C U G A A G G A C A A C A G A G A A A A G A U C G G A A A A G A U C C U G A C A U U C A G A A U C C C G U A C U A C G U C G G A C C G C U G G C A A G A G G A A A C A G C A G A U U C G C A U G G A U G A C A A G A A A G A G C G A A G A A C A A U C A C A C C G U G G A A C U U C G A A G A A G U C G U C G A C A A A G G A G C A A A G C G C A C A G A G C U U C A U C G A A A G A A U G A C A A A C U U C G A C A A G A A C C U G C C G A A C G A A A A A G G U C C U G C C G A A G C A C A G C C U G C U G A C G A A U A C U U C A C A G A C U C U A C A A C G A A A C U G A C A A A G G U C A A G U A C C U C A C A G A A G G A A U G A A A G C C G G C A U U C C U G A G C G G A G A A C A G A A G A A G C A A U C G U C G A C C U G C U U C A A G A C A A A C A G A A A G G U C A C A G U C A A G C A G C U G A A G G A A G A C U A C U U C A A G A A G A U C G A A U G C U U C G A C A G C G U C G A A A U C A G C G G A G U C G A A G A C A G A U U C A A C G C A A G C C U G G G A A C A U A C C A C G A C C U G C U G A A G A U C A U C A A A G G A C A A A G G A C U U C C U G G A C A A C G A A A A C G A A C A C A C A C U C C U G G A A G A C A U C C U C C U G A C A C U G A C A C U G U U C G A A G A C A G A G A A A U G A U C G A A G A A A G A C U G A A G A C A U A C G C A C A C C U G U U C G A C G A C A A G G U C A U G A A G C A G C U G A A G A G A A G A A G A U A C A C A G G A U G G G G A A G A C U G A G C A G A A A A G C U G A U C A A C G G A A U C A G A G A C A A G C A G A G C G G A A A G A C A A U C C U G G A C U U C C U G A A G A G C G A C G G A U U C G C A A A C A G A A A C U U C A U G C A G C U G A U C C A C G A C G A C A G C C U G A C A U U C A A G G A A G A C A U C C A G A A G G C A C A G G U C A G C G G A C A G G G A G A C A G C C U G C A C G A A C A C A U C G C A A A C C U G G C A G G A A G C C C G G C A A U C A A G A A G G A A U C C U G C A G A C A G U C A A G G U C G U C G A C G A A C U G G U C A A A G G U C A U G G G A A

50

【表 4 3 - 7 1】

	GACACAAAGCCGGAAACAUCGUCAUCGAAAUUGGCAAGAGAAAACAGAC AACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAAGAGAAUCGAA GAAGGAUUCAAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCG AAAACACACAGCUGCAGAACGAAAGCUGUACCUUGUACUACCUUGCAGAA CGGAAGAGACAUUACGUCGACCAAGAACUGGACAUAACAAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCAUAUCCUCCGACAGAUUCCUGAAGGACGACA GCAUCGACAAACAAGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAG CGACAAACGUCGCCGAGCGAAGAGUUGUCAAGAGAGUAGAAACUACUGG AGACAGCUGCUGAAAGCAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUGGACAAAC UGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAAACUGGACAAGGCAGGAUU CAUCAAGAGACAGCUGGUGGAACACAAGACAGAUCAAAAACGACGUGCA CAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAACGACAAAGC UGAUCAGAGAAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGA CUUCAGAAAGGACUUCAGUUUACAAGGUCAAGGAAAGAAUCAAACAUAAC CACCAAGCACACGACGCAUAUCCUGAACCGAGUCCUGGAAACAGACUGA UCAAGAAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUACCGAGACUACAA GGUUAACGACGUCAGAAAGAUAGAUUCGCAAGAGCGCAACAGGAAAUCCGA AAGGCAACAGCAAAAGUACUUUUCUACAGCAACAUCAUAGAACUUCUUA AGACAGAAAUACAUCUGGCAACCGGAGAAUACAGAAAGAGACCGCUGAU CGAAACAAACCGGAGAAACAGGAGAAUUCGUUGGGACAAAGGGAAGAGAC UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGACGUCAACAUCCUCA AGAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCUGAUCCGCAAGAAAGAAAGGACUGGGAACCG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 7 2】

	AAGAAUACGGAGGAUUUCGACAGCCCGACAGUCCGAUACAGCCUCCUGG UCGUCGCAAAAGGUCGAAAAGGAAAAGAGCAAGAAAGCUGAAGAGCGUCAA GGAACUGCUGGGAUUCACAAUCUUGGAAAGAGCAGCUUCGAAAGAAC CCGAUCGACUUCUUGGAAGCAAGGAAUACAAAGGAAGUCAAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAAG AAAGAGAAUUCUGGCAAGCCAGGAGAACUGCAGAGGGAACGAACUG GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUUGGCAAGCCACUACG AAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAAGAAACAGAACGCUUUCGU CGAACAGCACAAACUACCUUGGACGAAAUCAUCGAAACAGAUACAGCGAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAAACUUGACAAAGUCCUGA GGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAA CAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUUGGAGCACCGGCAGCAUUC AAGUACUUCGACACAAACAAUUCGACAGAAAGAGAUACACAAAGCACAAGG AAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACACAGAGCAUACAGGACUGUACGA AACAAAGAAUCCGACCUGAGCCAGCUUGGAGGAGACCGGAGGAGGAGCCCG AAGAAAGAGAAAGGUC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 7 3】

C a s 9 ニツカ --ゼペアコード 配列	2 1
	1
GACAAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCCGAAACAAACAGCGUCCGGAU GGGCAGUCAUCAAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAAGUUCAAAGGU CCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAGAGAGAACCCUGAUCGGAGCA CUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAGAGAACACAGACUGAGAGAA CAGCAAGAAAGAAUACACAAGAAAGAAAGAAACAGAAUCUGCUACCCGCA GAAAUCUUCAGCAACGAAAUUGGCAAGGUCCGACGACAGCUUCCUCCAC AGACUGGAAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAAGAGACAAAGAAAGCACGAAAGAC ACCCGAUCUUCGGAAACAUCCUGCGACGAGUCCGAUACCCACGAAAGUA CCCGACAAUCCACCCUGAGAAAGAAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAG GCAGACCGAGACUGAUUACCUUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCA GAGGACACUUCUGAUCCGAAAGGAGACCUGAAACCCGGACAAACAGCGACGU CGACAAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAAACAGCUGUUCGAA GAAACCCGAUCAAACGCAAGCGGAGUCCGACGCAAGGCAAUCCUGAGCG CAAGACUGAGCAAGAGCAGAGACUGGAAACCUUGAUCGCAACAGCUGCC GGGAGAAAGAAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUUGAUCGCAACAGACCUG GGACUGACACCGAACUUCAAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAAGACGCA AGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUUGGACAAACCUUGCU GGCACAGAUCCGGAGACCAGUACGCAGACCUUGUCCUGGCAGCAAGAAC CUGAGCGACGCAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAAACACAGAAA UACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAAGAGAUACGACGAAAC CCACCAAGGACCUGACACUGCUAGAGGACUUGGUACAGACAGCAGCUGCCG GAAAGUACAAGGAAAUUUUUUCCGACGAGCAAGAAAGAAUACCGAG GAUACAUCCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAAGAAUUUCAAAGUUCAUCAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 7 4】

GCCGATCCUGGAAAAAGAUUGGACGGAAACAGAAAGAACUGCUGGUCAAAGCUG AACAGAGAAAGACCUUGCUGAGAAAAGCAGAGAAACAUCGACAAACGGAAAGCA UCCCGCAACAGAUUCCACCUUGGGAGAAACUGCACGCAUCCUGAGAAAGACA GAAAGACUUCUACCCCGUUCUGAAGGACAAACAGAGAAAGAAUCGAAAG AUCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCCGACCCUGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCGCAUGGACAGACAGAAAGAGCGAAGAAACAACACACC GUGGAACUUCGAAAGAGUUCGUCGACAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUC AUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAAGAACCUCCGACACGAAAGGUGC UCCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAAACGAAACU GACAAAGGUCAAGUACGUACAGAAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUCCUG AGCGGAGAACAGAAAGCAAGGCAUCCGACCCUGCUUUCAGACAAACA GAAAGGUCCACAGUCAAAGCAGCUUGAAGGAAAGACUACUUCAAAGAAAGUCCA AUGCUCGACAGCGUCGAAAUACGCGGAGUCGAGACAGAUUCACCGCA AGCCUGGGAAACAUACCAAGACCCUGCUGAAGAUCAUACAGGACAAAGGACU UCCUGGACAAAGAAAGAAACGAGACAUCCUGGAGACAUCCGUCCUGAC ACUGACACUGUUCGAAAGACAGAGAAAUAGAUCCGAAAGAAAGACAGACA UACGCACACCCUGUUCGACGACAAAGGUCAUAGAACGACUGAAGAGAAAGAA GAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUUCAG AGACAAGCAGAGGGAAAGACAACUCCUGGACUCCUGAAGAGCGACGGA UUCGCAAAACAGAAACUUCAGCAGCUAGUCCAGCAGCCUGACAU UCAAGGAAGACAUCCAGAAAGGCACAGGUACCGGACAGGAGACAGCCU GCACGAAACACAUCCGCAACCUCCGACGGAAGCCCGCAAUCAAGAAAGGA AUCUGCAGACAGUCAAGGUCCGUCGACGCAACUGGUCAGGUCUAGGGAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 7 5】

	GACACAAAGCCGGAAACAUCCGUCAUCGAAAUUGGCAAGAGAAAACCCAGAC AACACAGAAAGGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUUCGAA GAAAGAAUCAAAGGAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCG AAAACACACAGCUGCAGAACGAAAGCCUGUACCUUGUACUCCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUGACACAGGAAACUGGACAUCACACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCAUCCGUCGCCGAGAGCUUCCUGAAGGACGACA GCAUCGACAAACAAGGUCCUGACAAAGAAAGGACAAAGAACAGAGAAAGAG CGACAAAGCUGCCGAGCGAAGAAAGUCCUAAAGAAAGAAAGAAACUACUGG AGACAGCUGCUGAAAGCAAAAGCUGAUCAACACAGAAAGAAAGUUCGACAAAC UGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGCCAGGAUU CAUCAAGAGACAGCUGGUCCAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGCA CAGAUCCUGGACACAGAAAGAAAGAAACAAAGUACGACGAAACGACAAAGC UGAUCAGAGAAAGUCAAGGUCAUCAACUCGAAAGAGCAAGCUGGUCAGCGA CUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUAC CACACGCACACGACGCAUACCUGAACCGAGUCCGUAACAGCACUGA UCAAGAAUAACCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUUACCGGAGACUACAA GGUCUACGACGUCAGAAAGAAUGAUUCGCAAAAGAGCGAAACAGGAAAUCCGA AAGGCACACAGCAAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUA AGACAGAAAUCAACACUGGCAAAACGGAGAAAUCAAGAAAGAGACCGCUGAU CGAAACAACCGGAGAAACAGGAGAAAUCCGUUUGGACAAAGGAAAGAGAC UUCGCAACAGUCCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGACGGUCAAACAUCGUA AGAAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAGCAUCCUGCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCUGAUCCGCAAGAAAGAAAGGACUGGACCCG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 7 6】

	AAAGAGUACGGAGGAAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCUUGG UCGUCCAAAAGGUUCGAAAAGGGAAGAGCAAGAGCUGAAGAGCGUCAA GGACUGCUGGGAUUCACAAUCUUGGAAGAAGCAGCUUCGAAAGAAC CCGACGACUUCUUGGAAGCAGAAGGGAUACAGGAAGUCAGAGGACC UGAUCACAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAA AAAGACAUCUGGCAAGCCAGGAGAACUCAGAGGAAACGAACUG GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCCACUACG AAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAAGAACAGAGCUGUUCGU CGAACAGCACAGCACUACCUUGGACGAAAUCAUCCAAACAGUACGGA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUUGGACAGACCGCAAACUUGGACAAAGUCCUGA GGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUUCAGAGAACAGGCAGAAA CAUCAUCCACCUUGUUCACACUGACAAACUUGGAGCACCGGCAGCAUUC AAGUACUUCGACACAAACAUAUCGACAGAAAGAGAUACACACAAAGG AAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACAGAGCAUACAGGACUGUACGA AACACAUAUCGACCUGAGCCAGCUUGGAGGAGACCGGAGGAGAGCCCC AAGAGAGAGAAAGGUC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 7 7】

d C a s 9 ベア コード配列	2 1 2
	GACAAAGAAUACAGCAUCGGACUGGCAAUCCGAAACAAACAGCGUCGGAU GGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAAGGUCCCGAGCAAGAAAGUUCAAAGGU CCUGGGAACACAGACAGACACAGCAUCAGAUCAAGAAACCUAGUCCGAGCA CUGUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAAGAAACAAAGACUAGAAAGAA CAGCAAGAAAGAAAGAUACACAAAGAAAGAAACAGAAUUCUGCUACCCUGCA GGAUUUUUUCAGCAACGAAUUGGCAAGGUCGACGACAGCUUCCUCCAC AGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAAGAACAAAGAACGAAAGAC ACCGAUUUUCCGGAACAUUCGUCGACGAAGUGGCAUACCAAGAAAGUA CCCGACAAUUCACCCUGAGAAAGAAAGCUGGUCGACAGCAACAGACAAAG GCAGACCUAGACUGAUUACCUUGGCAUCUGGCAACAUCAAGAUUCA GAGCACUUCCUGAUCCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGU CGACAAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUAACACAGCUUGUUCGAA GAAACCCGAUUACGCAAGCGGAGUCCGACGCAAAAGGCAAUCCUGAGCG CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAACUGGAAACCUAGAUCCGACAGCUGCC GGGAGAAAGAAAGAACGGACUGUUCCGAAACCUGAUCCGACUGAGCCUG GGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUUGGCAGAGAGCGCA AGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGACGACGACCUUGGACAAACUUCU GGCACAGAUCCGGAGACCAGUACGACAGACCUUGUCCUGGCAGCAAAAGAAC CUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAAACACAGAAA UCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAAACA CCACCAGGACCUGACAUUGCUUGAAGGACUUGGUCAAGACAGCUUGCCG GAAAGUACAAAGGAAAUUUUUUUGACCAAGCAAGAAACGGAUACGGCAG GAUACAUCCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAAGAAUUUUAACAAAGUUCAUCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 7 8】

	GCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAACAGAAAGAACUGCUGGUCAAAGCUG AACAGAGAAAGACCCUGCCUGAGAAAAGCAGAGAAACAUUCCGACAAACGGAAAGCA UCCCGACCCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCCAUAUCCUGAGAAAGACA GGAAGACUUUACCCGUAUCCUGAAGGACAAACAGAGAAAAGAUCCGAAAAG AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAACAGGAA ACAGCAGAUUCGCAUGGAGACAGAAAGAGCGAAGAAACAUAUCACACC GUGGAACUUUCGAAAGAAUGUCGUCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCUUC AUCGAAAGAAUGACAAACUUUGACAAAGAACCCUGCCGAAACGAAAAGGUCC UGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUUAACACGAACU GACAAAGGUCAAGUACGUACAGAAAGAAUGAGAAAGCCGGCAUCCUG AGCGGAGAACAGAAAGGCAAUCCGUCCGACCCUGGUUCAAAGACAACA GAAAGGUCAACAGUCAAAGCAGCUGAAGGAAAGACUACUUCAAAGAAAGAUCCA AUGCUCGACAGCGUCCGAAAUCAGCGGGAGUCGAAAGACAGAUUCAACGCA AGCCUGGGAAACAUACCAAGACCCUGCUGAAGAUCAUCAAAGGACAAAGGACU UCCUGGACAAACGAAAGAAACGAAACAUCCUGGAGAGACAUCCGUCCUGAC ACUGACACUGUUUGAAAGACAGAGAAAUGAUCCGAAAGAAAGACUGAAGACA UACGCACACCCUGUCCGACGACAAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAAGAA GAUACACAGGAUUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAAACGGAAUUCAG AGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCUUGAAGAGCGACCGGA UUCGCAAACAGAAACUUCUUGCAGCUGAUCCACGACGACCGCUGACAU UCAAGGAAGACAUCCAGAAAGGACAGGUCAAGCGGACAGGGAGACAGCCU GCACGAACACAUCCGCAAAACCCUGGCAGGAAGCCCGCAUCAAAGAAAGGA AUCCUGCAGACAGUCAAGGUCCGACGAAACUGGUCAAAGGUCAUGGGAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 7 9】

GACACAAAGCCGGAAACAUCCGUCAUCGAAAUUGGCAAGAGAAACACAGAC AACACAGAAAGGCACAGAAAGAACACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUUCGAA GAAGGAUUCAGGAACUGGGAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCC AAACACACAGCUGCAGAACGAAAGCCUGUACCUUACUCCUGCAGAA CGGAAGAGACAUUACGUCCGACCAAGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACGCAAUCCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACA GCAUUGGACAAAGGUCCUGACAAAGAGAGGACAAAGAACAGAGGAAAGAG CGACAAAGCUCGAGCGAAGAGAGUGGUCAGAGAGAGUAGAACUACUGG AGACAGCUGCUGAACGCAAGAGCUGAUCAACAGAGAAAGUUCGACAAAC UGACAAAGGCAGAGAGAGGAGACUGAGCGAACUGGACAAAGCAGGAUU CAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAAGACAGAUCAACAAAGCAGGCA CAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAACGACAAAGC UGAUACAGAGAAAGUCAAAGGUCAUCAACUCGAAAGAGCAAGCUGGUCAGCGA CUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAAGGUCAGAGAAAUCAACAAUAC CACCAAGCACACGACGCAUACCUUACCGCAGUCCUGGAAACAGCACUGA UCAAGAAUACCCGAGCUGGAAAGCGAAUUCGUUACGGAGACUACAA GGUCUACGACGUCAGAAAGAUAGAUCCGCAAGAGCGAAACAGGAAAUCCGGA AAGGCACACAGCAAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUCA AGACAGAAUUCACACUGGCAACCGGAGAAAUCAAGAAAGAGACCGCUGAU CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAUCCGUUUGGACAAAGGAAAGAGAC UUCGCAACAGUACAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGACAGGUCAACAUCCUCA AGAAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCUGAUCCGCAAGAAAGAAAGGACUCCG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 8 0】

	AAGAAAUACGGAGGAUUUCGACAGCCCGACAGUUCGCAUACAGCGUCCUGG UCGUCCGCAAAAGGUCGAAAAGGAAAAGAGCAAGAGCCUGAAGAGCGUCAA GGAAUCUGCUGGGAUUCACAAUUAUGGAAAGAAAGCAGCUUCGAAAGAAAC CCGAUCGACUUCUUGGAAGCAAGGAAUACAAAGGAAGUCAAAGAAAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUUCGAAACUGGAAAACGGGAAAG AAAGAGAAUGCUGGCAAGCCAGGAGAACUGCAGAAAGGAAACGAACUG GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUUAUCCUGGCAAGCCACUACG AAAAGCUAAGGAAGCCCGGAAGACAAAGAAAGAAAGCAGCUUUCGU CGAACAGCACAAACACUACCUUGGACGAAAUCAUCGAAACAGAUACAGCGAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAACUUGCACAAAGGUCCUGA GGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUACAGAGAACAGGCAGAAAA CAUCAUCCACCCUGUUCACACUGACAAACUUGGGAGCACCGGCAGCAUUC AAGUACUUCGACACAAACAUAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGG AAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACACAGAGCAUCACAGGACUGUACGA AACAAAGAAUCCGACCUAGCCAGCUUGGGAGGAGACCGGAGGAGAGCCCCG AAGAAAGAGAAAGGUC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 8 1】

C a s 9 のアミ ノ酸配列 (NL S なし)	2 1
	3
MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDDSFF IIRLEESFLVEEDKKHIERIPIFGNIVDEVAYIEKYPTIYIILRKKLVDDSTD KADRLIYLAALAIMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQFLF FENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKDITYDDLDNLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPIHQIHLGELIHAILRRQEDFYPPFLKDNREKIE KILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWTRKSEETITPWNFEFVVVDKGASQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLVEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLKLIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLK TYAAILFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSD GFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSLHEHIANLAGSPAIKK GILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKQKNSRERMKRI EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNY WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKIIV AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINN YHHAHDAYLNAVVGTA L I K K Y P K L E S E F V Y G D Y K V Y D V R K M I A K S E Q E I G K A T A K Y F F Y S N I M N F F K T E I T L A N G E I R K R P L I E T N G E T G F I V W D K G R D F A T V R K V L S M P Q V N I V K K T E V Q T G G F S K E S I L P K R N S D K L I A R K K D W D	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 8 2】

	PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGSKKLKS VKELLGITIMERS SF EK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFEL ENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFLYLASHIYEKLGSPEDNEQQLFVEQHKHLYLDEII EQIS EFSKRVI LADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATL IHQSITGLYETRIDLSQLGGD	

10

20

30

40

50

開始コドンおよび終止コドンを示す、表3に列挙される最小ウリジンコドンを使用した、配列番号13をコードするCas	1 AUGGACAAAGUAACAGCAUCGGACUGGACACUAGGAAACAAACAGCGUCG 2 GAUGGGCAGUCAUCACAGACGAUACAAAGGUCCCGAGCAAGAGAUUCAA 3 GUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUACAGAAAGAACCCUGAUCCGA 4 GCACUGCUGUCCGACAGCGGAGAAACAGCAAGAGCAACAGACUGAAGA 5 GAACAGCAAGAAAGAAUACACAAAGAAAGAAACAGAAUCCUGCUACCU 6 GCAGGAAAUUCUACGCAACGAAAUAGGCAAGGUCGACGACACUUCUUC 7 CACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAAGAAAGACAAAGACACGAAA 8 GACACCGAUUCUCCGAAACAUCCUGCGACGAGUGCAUACCAACGAAAA 9 GUACCGACAAUUCUACCAUCCUGAGAAAGAAAGCUGGUCGACAGCAACAGAC 10 AAGGCAGACCUGAGACUGAUCAUCCUGGCAUCCUGGCAACAUCAUCAAAGU 11 UCAGAGGACACUCCUGAUCCGAAGGAGACCCUGAACCCGACACACGCGA 12 CGUCGACAAAGCUGUUAUCCAGCUGGUCGAGACAUACAAACAGCUGUUC 13 GAAGAAAACCCGAUCAACGCAAAGCGGAGUCGACGCAAAAGGCAAUCCUGA 14 GGCACAGACUGAGCAAGAGCAGAAACUGGAAACCCUGAUCCGCAACAGCU 15 GCCGGAGAAAAGAAACCGACUGUUCGGAAACCCUGAUCGCAUCCGACUGAGC 16 CUGGACUGACACCGAACUUCAGAGCAACUCCGACCCUGGCAAGACG 17 CAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCCUGGACAAACCU 18 GCUGGCACAGAUCCGGAGACACAGUACGCAACCUUGUCCUGGCAGCAAAAG 19 AACCUAGCGCACGAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAAACACAG 20 AAUACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGA 21 ACACCAACGACCUGACAUCCUGAAGGCAUCCUGUACAGACAGCAGCUG 22 CCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUCCGACCAAGAGCAAGAAACGGAUACG 23 CAGGAUACAUCCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAAGUUCAU

30

40

50

【表 4 3 - 8 4】

C A A G C C G A U C C U G G A A A G A U G G A C G G A A C A G A A G A A C U G C U G G U C A A G	
C U G A A C A G A A G A C C U G C U G A G A A A G C A G A G A A C A U U C G A C A A C G G A A	
G C A U C C G C A C C A G A U C C A C C U G G G A A C U G C A C G C A A U C C U G A G A A G	
A C A G G A A G A C U U C U A C C G U U C C U G A A G G A C A A C A G A A A A G A U C G G A	
A A G A U C C U G A C A U U C A G A A U C C C G U A C U A C G U C G G A C C G C U G G C A A G	
G A A C A G C A G A U U C G C A U G G A U G A C A A G A A A G A G C G A A G A A C A A U C A C	
A C C U G G A A C U U C G A A G A A G U C G U C G A C A A G G G A G C A A G C G C A C A G A G C	
U U C A U C G A A G A A U G A C A A A C U U C G A C A A G A A C C U G C C G A A C G A A A A G G	
U C C U G C C G A A G C A C A G C C U G C U G U A C G A A U A C U U C A C A G U U A C A A C G A	
A C U G A C A A A G G U C A A G U A C C U C A C A G A A G G A A U G A A A A G A A A G C C G C A U U C	
C U G A G C G G A A C A G A A G A A G G C A A U C G U C G A C C U G C U G U U C A A G A C A A	
A C A G A A A G G U C A C A G U C A A G C A G C U G A A G G A A G A C U A C U U C A A G A A G A U	
C G A A U G C U U C G A C A G C G U C G A A A U C A G C G G A G U C G A A G A C A G A U U C A A C	
G C A A G C C U G G G A C A U A C C A C G A C C U G C U G A A G A U C A U C A A G G A C A A G G	
A C U U C C U G G A C A A C G A A A A C G A A C A G A C A U C C U G G A A G A C A U C G U C C U	
G A C A C U G A C A C U G U U C G A A G A C A G A A A U G A U C G A A A A G A A A G A C U G A A G	
A C A U A C G C A C A C C U G U U C G A C G A C A A G G U C A U G A A G C A G C U G A A G A G A A	
G A A G A U A C A C A G G A U G G G A A G A C U G A G C A G A A A G C U G A U C A A C G G A A U	
C A G A G A C A A G C A G A G C G G A A G A C A A U C C U G G A C U U C U G A A G A G C G A C	
G G A U U C G C A A C A G A A A C U U C A U G C A G C U G A U C C A C G A C G A C A G C C U G A	
C A U U C A A G G A A G A C A U C C A G A A A G G C A C A G G U C A G C G G A C A G G G A G A C A G	
C C U G C A C G A A C A C A U C C G C A A A C C U G G C A G G A A G C C C G C A A U C A A G A A G	
G G A A U C C U G C A G A C A G U C A A G G U C G U C G A C G A A C U G G U C A A G G U C A A G G	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 8 5】

GAAGACACAAGCCGGAAAACAUCCGUCAUCGAAAUUGGCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAAACAGCAGAGAAAGAAUAGAAAGAAUUC GAAAGAAAGAAUCAAAGAAUCUGGGAAGCCAGAUCCUGAAAGAAACACCCGG UCGAAAAACACACAGCUCGAGAACGAAAGCUGUACCUUGUACUACCUUGCA GAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCCAGGAAACUGGACAUAACAAGACUG AGGACUACGACGUCGACCAUAUCCUCCGACAGACUUCUUGAAGGACG ACAGCAUCGACAAACAAAGGUCCUGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGGAAA GAGCGACAAACGUCGCCGAGCGAAGAAAGUCCGUAAGAAAGUAGAAACUAC UGGAGACAGCUCUGAAACGCCAAAGCUGAUCAACACAGAGAAAGUUCGACA ACUUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAAACUGGACAAGGCAGG AUUCAUAAGAGACAGCUGGUGGAAACAAAGACAGAUCAACAAAGCACGUC GCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUAGAACACAAAGUACGACGAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAAGUCAAAGGUCAUCACACUGAAAGAGCAAGCUGGUCAG CGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUUACAAAGUACAGGACAGAGAAUCAAACAA UACCAACACGACACAGACGCAUACCUGAACGACGUCGUCGGAACAGCAC UGAUCAAAGAAUACCGAAGCUGGAAAGGAAUUCGUUACCGGAGACUA CAAGGUUUAACGACGUCAGAAAGAUAGUUCGCAAAAGAGCGAACAGGAAUUC GGAAGGCAACAGCAAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCU UCAAGACAGAAUACACACUGGCAACCGGAGAAUACAGAAAGAGACCGCU GAUCGAAACAAACCGAGAAACAGGAGAAUUCGUUCGGAACAAAGGAAAG GACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUCCGACAGGUCAACAUCC UCAAGAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCU GCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCUGAUCCGCAAGAAAGAGACUGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 8 6】

CGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUUCGCAUACAGCGUCC UGGUCGUCCGCAAGGUCGAAAAGGGAAGAGCAAGAGCCUGAAGAGCGU CAAGGAACUGCCUGGGAUUCACAUCUAUGGAAGAGAGCUUCGAAAAG AACCGAUCCGACUUCUGGAGAGCAAGGGAUACAGGAGUCCAGAAAGG ACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUCCGAACUGGAAAAAGG AAGAAAGAGAAUGCCUGGCAAGCCAGGAGAACUGCAGAAAGGAACGAA CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCACUUCUUAUCCUGGCAAGCCACU ACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACACGAAACAGAGCAGCUGUU CGUCGAAACAGCACAAAGCACUACUCCUGGACGAAAUUCCAGAACAGCAGC GAAUUCAGCAAGAGAGUACUCCUGGCGAGAGCAACCCUGGACAGGUCC UGAGCGCAUACAAACAGCACAGAGACAAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGA AAACAUCAUCCACCUUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCA UUCAAAGUACUUCGACACAAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAAGCACAA AGGAAGUCCUGGACGCAACACUAGAUCCACCGAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCCGACCUGAGCCAGCCUGGAGGAGACUAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 8 7】

表3に列挙されるような最小ウリジンコドンを使用した、配列番号13をコードするCas9ニッカ―ゼノード配列（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）	21 5 GACAAAGAAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCCGGAACAAACAGCGUCGGAU GGGCAAGUCUACACAGACGAAUACAGGUCCGAGCAAGAAAGUUCAAAGGU CCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAAGAAAGAACCUGAUCGGAGCA CUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAGACUGAAAGAGAA CAGCAAGAAAGAUACACAGAAAGAAAGAACAGAAUUCUGCUACCUGCA GGAAAUUUUAGCAACGAAAUUGGCAAGGUCCAGCAGCUUUUUCCAC AGACUGGAAAGAAAGCUUCUGGUUCGAAAGAAAGACAAAGACACGAAAGAC ACCGAUUUUCCGGAACAUUCGUCGACGAGUCCAUACCAAGAAAGUA CCCGACAAUUCUACCAACUGAGAAAGAGCUGGUGGACAGCACAGACAAAG GCAGACUUGAGACUAGUUCUACCUUGGACUUGGACACACAUAGAUCAAGUUA GAGGACACUUUUUUUAGUAGGAGACCUGAAACCGGACAAACAGCGACGU CGACAAAGCUUUUUCUUCAGCUGGUCCAGACAUACAAACAGCUUUCGAA GAAACCCGACUACAGCAAGCGGAGUUCGACGCAAGGCAAUCCUGAGCG CAAGACUGAGCAAGAGCAGAGACUUGGAAACCUUGAUCCGACAGCUGCC GGAGAAAGAAAGAACCGACUUGUUCCGAAACCUGACUCCGACUAGCCUG GGACUGACACCGAACUUCAGAGCAACUUCGACCUUGGACAGAGACGCAA AGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUUGGACAAACCUUCU GGCACAGAUCCGAGACAGUACGCAGACCUUGUUCCUGGACGCAAGAAAC CUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAAACAGAA UCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAAACA CCACCAGGACCUGACACUUGCUGAAGGCACUUGGUCAGACAGCAGCUGCCG GAAAGUACAGGAAAUUUUUUCCGACCAAGCAAGAACGGAUACGACG GAUACAUCCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAAGAAUUUCAAAGUUCAUCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 8 8】

GCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAACAGAAAGAAACUGCUGGUCAAAGCUG AACAGAGAAAGACCCUGCUGAGAAAAGCAGAGAAACAUUCGACAAACGGAAAGCA UCCGGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCCAUAUCCUGAGAAAGACA GGAAGACUUUUAACCCGUUCCUGAAGGACAAACAGAAAGAAAGAUCCGAAAAAG AUCCUGACAUAUCAGAAUCCCGUAUACGUCCGACCCGCGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCCGAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUAUCACACC GUGGAACUUUCGAAAGAAUGUCGUCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGACUUC AUCGAAAGAAUGACAAACUUUCGACAAAGAACCCUGCCGAAACGAAAGGDUCC UGCCGAAGCACACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUUAACAAACGAAACU GACAAAGGUCAAGUACGUACAGACAGAGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUUG AGGGAGAAACAGAAAGGCAAUUGUCCGACUUGCUUUAAGACAACA GAAAGGUCAACAGUCAAAGCAGCUGAAGGAAAGACUUAUUCAAAGAAAGUCCA AUGC UU CGACAGCCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAACGCA AGCCUGGGAACAUAACACGACCCUGCUGAAGAUCAUCAAAGGACAAAGGACU UCCUGGACAAACGAAAGAAACGAAAGACAUCCUGGAGAGACAUCCGUCUGAC ACUGACACUGUCCGAAGACAGAGAAAUAGAUUCGAAAGAAAGACUAGAGACA UACGCACACCUGUUCGACGACAAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAAGAA GAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUUCAG AGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGA UUCGCAAAACAGAAACUUCUUGCAGCUGAUCCACGACGACCGUAGACAU UCAAGGAAGACAUCCAGAAAGGCACAGGUCAAGCGGACAGGAGACAGCCU GCACGAACACAUCCGCAACCCUGGACGAGGAAAGCCCGCAAUCAAGAGGGA AUCCUGCAGACAGUCAAGGUCCGUCGACGAAACUGGUCAAGGUCAUUGGAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 8 9】

	GACACAAAGCCGGAAACACAUCCGUCAUCGAAAUUGGCAAGAGAAAAACAGAC AACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAAGAGAAUUCGAA GAAGGAUUCAAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCCG AAAAACACAGCUGCAGAACGAAAGCUGUACUUGUACUACCUUGCAGAA CGGAAGAGACAUUACGUCCGACCAAGAACUGGACAUCAACAGACUUGAGC GACUACGACGUCCGACCAUCCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACA GCAUCCGACAAACAAGUCCUGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGGAAAGAG CGACAAACGUCCCGAGCGAAGAAAGUCCGUCAAGAGAGAAUAGAAACUACUGG AGACAGCUGCUGAAACGCAAAAGCUGAUCAACACAGAGAAAGUUCGACAAAC UGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGGAAACUGGACAAAGGCAGGAUU CAUCAAGAGACAGCUGGUCCGAAACAAAGACAGAUCAACAAAGCACGUCCGA CAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAACGACAAAGC UGAUCAGAGAAAGUCAAAGGUCAUCAACUGAAGAGCAAGCUGGUCAAGCGA CUUCAGAAAGGACUUCAGUUUCAAAAGGUCAAGAGAAAUCAACAAACUAC CACACGCACACGACGCAUACCUCAACCGACGUCGUCCGACACAGCACUGA UCAAGAAUAACCCAGCUGGCAAGCGAAUUCGUUCCGACGACUACAA GGUUAACGACGUCAGAAAGAUAGUCCGCAAGAGCGAACAGGAUUCGGA AAGGCAACAGCAAAAGUACUUUUUUUACAGCAACAUCAUGAACUUUUUCA AGACAGAAAUCAACUGGCAACCGGAGAAUUCAGAAAGAGACCGCUGAU CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAUUCGUUUGGACAAAGGGAAGAGAC UUCGCAACAGUACAGAAAGGUCCUGAGCAUCCGCGAGGUCAACUCCUCA AGAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAGCAUCCUCC GAAAGAAACACGACCAAGCUGAUCCGCAAGAAAGAAAGGACUGGGAACCCG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 9 0】

	AAGAAGUACGGAGGAUUCCGACAGCCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGG UCCUCGCAAAAGGUCCGAAAAGGGAAGAAGCAAGACUGAAGAGCGUCAA GGAAUCUGCUGGGAUUCACAAUCUUGGAAAGAAAGCAGCUUCGAAAGAAC CCGAUCGACUUCUGGAAAGCAAAGGGAUACAAAGGAAGUCAAAGAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGACUGGAAACGGGAAAG AAAGAGAUUCUGGCAAGCCAGGAGAACUGCAGAGGGAACGGAACUG GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAAACUUCUGUACCUUGGCAGCCACUACG AAAAGCUGAAGGGAAGCCCGAAGACAAACGAACAGAAAGCAGCUGUUCGU CGAACAGCACAAAGCACUACCUUGGACGAAAUCUUGAAACAGAUACAGCAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAACCUGGACAAGGUCCUGA GGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGACAGGCAGAAA CAUCUCCACCUUGUUCACACUGACAAACCUGGAGCACCGGCAGCAUUC AAGUACUUCGACACAAACAUAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGG AAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUACAGGACUGUACGA AACAGAAUCCAGCCUGAGCCAGCCUGGAGGAGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 9 1】

C a s 9 ニ ッ カ ーゼのアミノ酸 配列 (NLSな し)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSEFF IIRLEESFLVEEDKKIHERIPIFGNI VDEVAYIEKYPTIYIHLRKKLVDSTD KADRLIYALAIMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFILQLVQTYNQFLF FENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAQLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVRQQL PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPHIILGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIE KILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEFVVDKGASQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLYFYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIERLK TYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD GFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSLHEHIANLAGSPAIKK GILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRI EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNY WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKIIV AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVIINN YHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQE I GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI VWDKGR DFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGSFSESILPKRNSDKLIARKKDW D

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 9 2】

PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFLYLASHIYEKLGSPEDNEQQLFVEQIHKIYLDDEIIIEQIS EFSKRVI LADANLDKVL SAYNKHIRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 9 3】

開始コドンおよび終止コドンを有する、表 3 に列挙される最小ウリジンコドンを使用した、配列番号 16 をコードする C a s 9 ニッケアーゼ m R N A O R F	21 7	AUGGACAAGAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCCGGAACAAACAGCGUCG GAUGGGCAGUCAUACACAGACGAAUACAAAGGUCCCGAGCAAGAAAGUUCAA GGUCCUGGGAAACACAGACACACAGCAUCAGAAAGAACCCUGAUCCGGA GCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAGAAACAAAGACUGAAGA GAACAGCAAGAAAGAAUACACAAAGAAAGAAAGAAACAGAAUUCUGCUACCU GCAGGAUUUUACGCAACGAAUUGGCAAGGCAAGGACGACAGCUUCUUC CACAGACUGGAAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAAGAAAGAACAAAGACGAAA GACACCCGAUUCUUGGAAACAUUCGUCGACGAAAGUCCAGAAACACGAAAA GUACCCGACAAUUCUACCCUGAGAAAGAAAGCUGGUCGACAGCACAGAC AAGGACAGCCUGAGACUGAUUACCUUGGACUGGACACACAUCAAGU UCAGAGGACACUUCUGAUCGAAAGAGACCUGAACCCGGACAAACAGCGA CGUCGACAAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAAACAGCUGUUC GAAGAAACCCGAUCAAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAGGCAAUCCUGA GCGAAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAAACCUGAUCGACAGCU GCCGGAGAAAGAAAGAACCGACUGUUCCGAAACCUGAUCGACUGAGC CUGGGACUGACACCGAAACUUCAAAGAGCAACUUCGACCUUGGACAGAACG CAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUUGGACAAACCU GCUGGCACAGAUCCGGAGACCAGUACGCAGACCUUGUCCUGGCAGCAAG AACUGAGCGACGCAUUCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAAACACAG AAUUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAAGAGAUACGACGA ACACCAACAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUUG CCGGAAAGUACAAGGAAAUUUUUCCAGCCAGAGCAAGAACGGAUACG CAGGAUACAUCGACCGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUUACAAGUUCAU

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 9 4】

CAAGCCGAUCCUGGAAAAAGAUUGGACGGAAACAGAAAGAACUGCUGGUCAAAG CUGAACAGAGAAAGACCUGCUGAGAAAGACAGAGAAACAUUCGACAAACGGAA GCAUCCCGCACCAGAUCCACCCUGGGAGAACUGCACGCACUCCUGAGAAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAAACAGAGAAAGAUCCGAA AAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCCGACCCUGGCCAAGAG GAAACAGCAGAUUCGCAUGGAGAACAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCCAC ACCGUGGAAACUUCGAAAGAAAGUCGUCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGC UUCUUCGAAAGAAUAGACAAACUUCGACAAAGAACUCCGACCAAGAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAAACGA ACUGACAAGGUCAAGUACGUACAGAACAGAAAGAAUGAGAAAGCCGGCAUUC CUGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGCAUCCGUCGACCUCCUGUUCAGAGCAA ACAGAAAGGUACACAGUCAAAGCAGCUGAAAGAAAGACUACUUCAAAGAAAGU CGAAUGCUUCGACAGCGUCCGAAAUACAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCACAC GCAAGCCUGGGAACAUACCAAGACCCUGCUGAAGAUCAUCAAAGGACAAAGG ACUUCUUGGACAAACGAAGAAACGAGACAUCCUGGAGACAUCCGUCCU GACACUGACACUGUUCGAAAGACAGAGAAAUAGAUCCGAAAGAACUGAAG ACAUACGACACACCUUGUUCGACGACAAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAA GAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGGAU CAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGAC GGAUUCGCACAAAGAAACUUCUUGCAGCUGAUCCAGAGCAGCCUGA CAUUCAGGAAGACAUCCAGAAAGGACAGGUACAGCGACAGGAGAGACAG CCUGCACGAAACACAUCCGCAACCUUGGACAGAAAGCCGGCAAUCAAAGAAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAAGGUCCUGCAGCAAGCUGGUCAAAGGUCAUGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 9 5】

GAAAGACACAAAGCCGGGAAAAAUAUCGUAUUCGAAAAUUGGCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUUGAAAGAAUUC GAAGAAGGAAUUCAAAGGAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCCGG UCGAAACACACAGCAGCUGCAGAACGAAAGCUGUAUCCUGUAUACUUGCA GAACGGAAGAGACAUUUAUCCUCCAGGAAACUGGACAUCAACAGACUG AGCGACUAAGAGAGCUGGACCAUAUCCUCCGAGAGCUUCCUGAAAGGACG ACAGCAUUCGACAAACAAGGUCCUGACAAAGAAAGCGACAAAGAACAGAGGAAA GAGCGACAAAGUCCCGAGCGAAGAAAGUUGUCAAAGAAAGAAUAGAACUAC UGGAGACAGCUGCUGAACCGCAAGCUGAUCAACAGAGAAAGUUGGACA ACUAGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAAGGCAGG AUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUC GCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAAGUCAAAGGUCAUCACAUGAAGAGCAAGCUGGUCAG CGACUUCAGAAAGGACUUCACAGUUCUACAAAGGUCAAGAAUUCACAAAC UACCAACAGGACACAGCAGCAUACCUGAACGCAUCCUGGAAACAGCAC UGAUCAAGAAAGUACCCGAAGCUUGAAAGCGAAUUCGUUACGGAGACUA CAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUAGUUGCAAAAGAGCGAACAGGAAAUUC GGAAGGCCAACAGCAAGUAUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCU UCAAGACAGAAAUCAACUGGCACACGGAGAAUUCAGAAAGAGACCGCU GAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAUUCGUUUGGGACAAAGGAAAGA GACUUCGCCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUCCCGCAGGUCAACUUG UCAAGAACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAGCAUCCU GCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCUGAUCCGCAAGAAAGAAAGACUUGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 9 6】

CCGAAAGUAACGGAGGAUUCCGACAGCCCGACAGUCCGAUACAGCGUCC UGGUCGUCGCAAGGUCGAAAAGGAAAAGAGCAAGAGCUGAAGAGCGU CAAGGAACUGCUGGGAUUCACAAUCUUGGAAAAGAGCAGCUUCGAAAAAG AACCCGAUCGACUUCUUGGAAGCAAAAGGAUACAAAGGAAGUCAAAGAAAG ACCUGAUCAUACAGCUGCCGAAGUACAGCCUUGUUGGAACUGGAAAACGG AAGAAAGAGAAUCCUGGCAAGCGCAGGAAACUUGCAGAAAGGAAACGAA CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAAACUUCUCCUGUACCUUGGCAAGCCACU ACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGAACAGAAAGCAGCUGUU CGUCGAACAGCACAGCAACUACCUUGGACGAAUUCAUCCAGACAGUCCAGC GAAUUCAGCAAGAGAGUACUCCUUGGCAGACGCAAAACCUUGGACAAAGGUCC UGAGCGCAUACAAACAAGCACAGAGACAAAGCCGAUCAGAGAAACAGGCAGA AAACAUAUCCACCUGUUCACACACUGACAAACCUUGGAGCACCGGCAGCA UUCAAGUACUUCGACACACAAUUCGACAGAAAGAGAUACACACAGCACAA AGGAAGUCCUGGACGCAACACUAGUCCACCAAGAGCAUCCACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCCGACCUAGCCAGCCUGGAGGAGAGACUAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 9 7】

表3に列挙される最小ワリジン コードを使用し た、配列番号1 6をコードする C a s 9 ニック ーゼコード配列 (開始コードま たは終止コード なし、融合タン パク質コード配 列に含めるのに 好適である)	G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G C A A U C G G A A C A A A C A G C G U C G G A U G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A G G U C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G A A A C A C A G A C A G A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U U C G A C A G C G G A G A A C A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A G A A C A G C A A G A A G A G A U A C A C A G A A A G A A C A G A A U C U G C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G G U C G A C G A C A G C U U C U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C U G G U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C G A U C U U C G G A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C C C G A C A A U U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A C A G A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C A C A C A U A C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A G A C C U G A A C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A U C C A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U C G A A G A A A C C C G A U C A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G A G C G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A C C U G A U C G C A C A G C U G C C G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G A A A C C U G A U C C G A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C G A A C U U C A A G A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C U G A G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U G G C A C A G A U C G G A G A C C A G U A C G C A G A C C U G U U C C U G G C A G C A A A G A A C C U G A G C G A C G C A A U C C U G C U G A G C G A C A U C C U G A G A G U C A A C A G A A A U C A C A A A G G C A C C G C U G A G C G C A A G C A U G A U C A A G A G A U A C G A C G A A C A C C A C A G G A C C U G A C A C U G C U G A A G G C A C U G G U C A G A C A G C A G C U G C C G G A A A G U A C A A G G A A A U C U U C U C G A C C A G A G C A A G A C G G A U A C G C A G G A U A C A U C G A C G G A G G A G C A A G C C A G G A A G A A U U C U A C A A G U U C A U C A A

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 9 8】

GCCGATCCUGGAAAAAGAUUGGACGGAAACAGAAAGAACUGCUGGUCAGGCUG AACAGAGAAAGACCUGCUGAGAAAAGCAGAGAAACAUCGACAAACGGAAAGCA UCCCGACCCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAUCCUGAGAAAGACA GAAAGACUUCUACCCCGUCCUGAAGGACAAACAGAAAGAAAGAACGAAAG AUCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCCGACCGCUGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCCCAUGGAUGACAAAGAAAGAGCCAGAAACAACACACC GUGGAACUUCGAGAGAGUCCUGGACAAAGGAGCAAGGCCACAGACUUC AUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAAGAACUUGCCGACCGAAAGGUCC UGCCGAAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUUCACACGAAACU GACAAAGGUCAAAGUACGUACACAGAAAGGAAUGAGAAACCCGGCAUCCUG AGCGGAGAACAGAAAGAGCAUCCUGGACCCUGCUGUUCAGACAAACA GAAAGGUACACAGUACAGCAGCUGAAGGAAAGACUACUUCAAAGAAAGAUCCA AUGCUUCGACACAGCGUCGAAAUACAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCACCGCA AGCCUGGGAAACAUAACACGACCCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAAGGACU UCCUGGACAAACGAAAGAAACGAAAGCAUCCUGGAAAGACAUCCGUCUGAC ACUGACACUGUUCGAAAGACAGAGAAAUAGAUCCAAGAAAGACUGAAGACA UACGCACACCCUGUUCGACGACAAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAAGAA GAUACACAGGAUUGGGAAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUUCAG AGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGA UUCGCAAAACAGAAACUUCUUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAU UCAAGGAAGACAUCCAGAAAGCACAGGUACCGGACAGGAGACAGCCU GCACGAACACACAUCCGCAAAACUUGGCAGGAAGCCCGCAUUCAGAAAGGA AUCCUGCAGACAGUCAAGGUCCGUCGACGAAACUGGUCAAGGUCAUGGGAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 9 9】

GACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUUGGCAAGAGAAAACCAGAC AACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAAGAAUGAAAGAAUUCGAA GAAAGAAUCAAAGGAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAAGAAACCCCGGUCG AAAACACACAGCUGCAGAACGAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCCGACCAAGAACUGGACAUCAAACAGACUGAGC GACUACGACGUCCAGACCAUCCUCCGCGAGACUCCUGAAGGACGACA GCAUCGACAAACAAGGUCCUGACAAAGAAAGCAGCAAGAAACAGAGAAAGAG CGACAAACGUCCCGAGCGAAGAAAGUAGUACAGAAAGAAAGAAACUACUGG AGACAGCUGCUGAAAGCAAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAAAC UGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUU CAUCAAGAGACAGCUGGUCCGAACAAGACAGAUCAACAAGCAGUCCGA CAGAUCCUGGACAGCAGAAUUGAAACACAAAGUACGACGAAACGACCAAGC UGAUCAGAGAAAGUCAAAGGUCAUCACACUGAAAGAGCAAGCUGGUCAAGCA CUUCAGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAAACUAC CACACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCCGACAGCAUUGA UCAAGAAUAACCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUUACCGGAGACUACAA GGUCUACGACGUCAGAAAGAUAGAUCCAAAGAGCGAACAGGAAAUUCGGA AAGGCAACAGCAAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUA AGACAGAAAUCAACUGGCAAAACGGAGAAUUCAGAAAGAGACCGCUGAU CGAAACAACCGGAGAAACAGGAGAAAUCCGUUGGGACAAAGGGAAGAGAC UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUCCGCGAGGUCAACCAUCCGUA AGAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAAGGACUGGGACCCG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 0 0】

	AAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCCAUACAGCGUCCUGG UCGUCCAAAGGUUCGAAAGGGAAGAGCAAGAAAGCUGAAGAGCGUCAA GGAACUGCUGGGAUUCACAAUCAUUGGAAGAGAGCAGCUUCGAAAGAAC CCGAUCGACUUCUGGAAGCAAGGGAUACAAGGAAGUCAAAGAGGACC UGAUCAUCAAGCUCGCCGAAGUACAGCCUGUCCGAACUGGAAACCGAAG AAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAGGGAACCGAACUG GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUUGGCAAGCCACUACG AAAAGCUGAAGGGAAGCCCGAAGACACAGAACAGAAAGCAGCUUGUUGU CGAACAGCACAAAGCACUACCUUGGACGAAAUCAUCCGAACAGAUACAGCGAA UUCAGCAAGAGAGUACAUCUUGGCAGACGGCAAACCUGGACAAGGUCCUGA GGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUACAGAGAACAGGCAGAAAA CAUCAUCCACCUUGUUCACACUGACAAACCUUGGAGCACCGGCAGCAUUC AAGUACUUCGACACAAACAUAUCGACAGAAAGAGAUACAACAGCACAAAGG AAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUACACAGGACUGUACGA AACAGAAUCCAGCCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC

10

20

30

40

50

【表 43 - 101】

dCas9の7 ミノ酸配列 (N LSなし)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRRNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSSFF IRLEESFLVEEDKKHIERIPIFGNI VDEVAYIEKYPTIYHLRKKLV DSTD KADLRLIYLAIAIMIKFRGHIFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQ L F FENPINASGVDAKAILSARLSKRRLENL I AQLPGEKKNGLFCNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKD TYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPHIILGELIAILRRQEDFYFFLKD NREKIE KILTFRI PYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASQS FIERMTNFDKNLPNEKVL PKHSLLYEYFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDL LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLK TYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLINGIRDKQSGKTILD FLKSD GFANRNFMLIHDDSLTFKEDIKQAVSQGDSLHEHIANLAGSPA I KK GILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENI V IEMARENQTTQKGQKNSRERMKRI EEG IKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY LQNGRDMYVDQELDINRL SDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNY WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKIIV AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS KLVSDFRKDFQFYKVREINN YHHAHDAYLNAVVG TALI KKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI VWDKGR DFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDW D

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 0 2】

	PKYGGFDSP TVAYSVLVVAKVEK GKSKKLLKSVKELLGITIMERS SF EK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFEL ENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNF LYLASHIYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKIHYLDEIEQIS EFSKRVI LADANLDKVL SAYNKIIRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYE TRIDLSQLGGD	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 0 3】

開始コドンおよび終止コドンを示す、表 3 に列挙される最小ウリジンコドンを使用した、配列番号 19 をコードする d C a s 9 mRNA ORF	2 2 0	AUGGACAAGAAAGUA CAGCAUCCGGACUGGGCAAUCCGAAACAACAAGCCGUCG GAUUGGGCAGUUCACAGACGAAUAACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAA GGUCCUGGGAAACAAGACAGACACAGCAUACAAGAAACCCUGAUCCGGA GCAUCUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAGAAACAAGACUGAAGA GAACAGCAAGAAAGAAAGAUACACAAGAAAGAAAGAAACAGAAUCUGCUACCU GCAGGAAAUUCUUCAGCAACGAAAUUGCAAGGUCCGACGACGCUUCUUC CACAGACUGGAAAGAAAGCUUCUGGUCGAAAGACAAAGAACGACGAAA GACACCCGUAUCUGGAAACAUUCGUCGACGAAAGUCCACGAA GUAACCCGACAAUCUACCAACCUAGAAAGAAAGCUGGUCGACAGCACAGAC AAGGCAGACCUAGACUGAUUCUACCUCCUGGCACUGGCACAUCAAGU UCAGAGGACACUUCUGAUCCGAAUGGAGACCUGAACCCGGACACAGCGA CGUCGACAAAGCUGUUCUACUCCAGCUGGUCAGACAUACAACCAAGCUUUC GAAGAAACCCGAUCAAACGCAAGCGAGUCGACGCAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAAACCUGAUCGCACAGCU GCGGGAGAAAGAAAGACCGACUUGUUGGAAACCUGAUCGCACUGAGC CUGGGACUGACACCGAAAUUCAAAGACACUUCGACCUUGGACAGAACG CAAAGCUCGACGUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUUGGACCAACCU GCUGGCACAGAUCCGGAGACCAAGUACGACGACCUUGUCCUGGCAGCAAAG AACCUAGCGGACGCAUUCUUGCUGAGCGCAUCCUGAGAGUCAAACACAG AAAUCAACAAGGACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAAGAUACGACGA ACACCAACAGGACCUGACACUUCUGAAGGCAUUGGUCCAGACAGCAUCUG CCGGAAAAGUACAAGGAAAUUCUUCUCCAGCAGAGCAAGAACGGAUACG CAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAU

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 0 4】

C A A G C C G A U C C U G G A A A A G A U G G A C G G A A C A G A A A A C U G C U G G U C A A G	
C U G A A C A G A G A A G A C C U G C U G A G A A A G C A G A A A C A U U C G A C A A C G G A A	
G C A U C C C G C A C C A G A U C C A C C U G G G A G A C U G C A C G C A A U C C U G A G A A G	
A C A G G A A G A C U U C U A C C C G U U C C U G A A G G A C A A C A G A G A A A A A G A U C G G A	
A A G A U C C U G A C A U U C A G A A U C C C G U A C U A C C G G A C C G G A C C G G C A A G A G	
G A A A C A G C A G A U U C G C A U G G A U G A C A A G A A A A G A G C G G A A A A A A U C A C	
A C C G U G G A A C U U C G A A G A A G U C G U C G A C A A G G G A G C A A G C A C A G A G C	
U U C A U C G A A A G A A U G A C A A A C U U C G A C A A G A A C C U G C C G A A C G A A A A G G	
U C C U G C C G A A G C A G C C U G C U G U A C G A A U A C U U C A C A G U C U A C A A C G A	
A C U G A C A A A G G U C A A G U A C G U C A C A G A A A G A A U G A A A A A G C C G G C A U U C	
C U G A G C G G A A C A G A A A A G G C A A U C C U C G A C C U G C U U C A A G A C A A	
A C A G A A A G G U C A C A G U C A A G C A G C U G A A G G A A G A C U A C U U C A A G A A G A U	
C G A A U G C U U C G A C A G C G U C G A A A U C A G C G G A G U C G A A G A C A G A U U C A A C	
G C A A G C C U G G G A A C A U A C C A C G A C C U G C U G A A G A U C A U C A A G G A C A A G G	
A C U U C C U G G A C A A C G A A A A A A C G A A C G A C A U C C U G G A A G A C A U C G G U C C U	
G A C A C U G A C A C U G U U C G A A G A C A G A A A U G A U C G A A A A A A G A C U G A A G	
A C A U A C G C A C A C C U G U U C G A C G A C A A G G U C A U G A A G C A G C U G A A G A G A A	
G A A G A U A C A C A G G A U G G G A A G A C U G A G C A G A A A G C U G A U C A A C G G A A U	
C A G A G A C A A G C A G C G G A A A G A C A A U C C U G G A C U U C C U G A A G A G C G A C	
G G A U U C G C A A A C A G A A C U U C A U G C A G C U G A U C C A G A C G A C A G C C U G A	
C A U U C A A G G A A G A C A U C C A G A A G G C A C A G G U C A G C G G A C A G G G A C A G	
C C U G C A C G A A C A C A U C C G C A A C C U G G C A G G A A G C C C G G C A A U C A A G A A G	
G G A A U C C U G C A G A C A G U C A A G G U C C U C G A C G A C G A A C U G G U C A A G G U C A U G G	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 0 5】

GAAGACACAAGCCGGAAAAACAUCGUCAUUCGAAAAUUGGCAAGAGAAAAACA GACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAAACAGCAGAGAAAGAAUAGAAAGAAUUC GAAAGAGAAUUCAAAGAAACUGGGAAGCCAGUCCUAGAAAGAAACCCCGG UCGAAAAACACACAGCUGCAGACGAAAGAAAGCUGUACUGUACUACCUUCA GAACGGAAGAGACAUGUACGUCCGACAGGAAACUGGACAUAACAAGACUG AGGACUACGACGUCCAGCGCAUCCUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACG ACAGCAUCGACAAACAAAGGUCCUGACAAAGAGCGCAAGAAACAGAGGAAA GAGCGAACACGUCCCGAGCGAAGAAAGUCCGUCAAAGAAAGUAGAAACUAC UGGAGACAGCUGCUGAAACGCAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACA ACCUGACAAAGGACAGAGAGGAGGACUGAGCGAAACUGGACAAGGCAGG AUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCCGAAACAAGACAGAUCAACAAAGCACGUC GCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAAACACAAAGUACGACGAAACCGACA AGCUGAUCAGAGAAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAG CGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUUCAAGGUCAAGGACAGAGAAUCAAACAC UACCAACCGCACACGACGCAUACUGAACCGAGUCCGUGGAAACAGCAC UGAUCAAAGAAUACCCGAGCUGGAAAGCGAAUUCGUUACCGGAGACUA CAAGGUUCACGACGUCAGAAAGAUGAUCCGCAAGAGCGAACAGGAAUUC GGAAGGCAACAGCAAGUAUUCUUCUACAGCAACAUCUAGAACUUCU UCAAGACAGAAUACACUGGCAACCGGAGAAUUCAGAAAGAGACCGCU GAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAUUCGUUGGGAACAGGGAAGA GACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUCCGCGAGGUCAACAUCG UCAAGAAAGACAGAAUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCU GCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAAGGACUGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 0 6】

	CCGAAGAAGUACGGAGGGAUUUCGACAGCCCGACAGUCCGAUACAGCGUCC UGGUCCGUCCAAAGGUCCGAAAGGGAAGAGCAAGAACUGAAGCGU CAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCCUUGGAAAGAACGCUUCGAAAG AACCCGAUCCGACUUCUUGGAAGCAAGGGUAACAAAGGAAGUCAAAGAAAGG ACCUGAUCAUCAAGCUCGCCGAAGUACAGCCUUGUCCGAACUGGAAACCGG AAGAAAGAGAUGCUGGCCAAGCGCAGGAAACUGCAGAGGGAACCGAA CUGGCACUGCCGAGCAAGUAACGUCAACUUCUUGUACCUUGGCAGCCACU ACGAAAGCUCUAAAGGAAGCCCGGAAGACAAAGAACAGAACGACUGU CGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUUGGACGAAAUCAUCGAAACAGUCCAGC GAUUCAGCAAGAGAGUACAUCUUGGCAGACGCAACCUUGGACAAGGUCC UGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAAGCCGAUACAGAGAACAGGCAGA AAACAUCAUCCACCCUGUUCACACUGACAAACCUUGGGAGCACCGGCAGCA UUCAAGUACUUCGACACAAACAUAUCGACAGAAAGAGAUACACAAAGCACAA AGGAAGUCCUGGACGCACAACUGAUCCACCAAGAGCAUCACAGGACUGUA CGAAACAAGAUAUCGACCUUGAGCCAGCCUUGGAGGAGACUAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 0 7】

表3に列挙されるような最小ワリジンコドンを使用した、配列番号19をコードするdCas9ニッカ―ゼコード配列（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）	GACAGAAGUACAGCAUCGGACUUGGCAAUCCGGAACAAAACAGCUCGGAU GGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAAGUCCCGAGCAAGAAAGUUCAGG CCUGGGAACACAGACAGACACAGCAUCAGAAAGAACCCUGAUCGGAGCA CUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAGCAACAAAGACUGAAGAGAA CAGCAAGAAAGAAUACACAAGAAAGAAAGAAACAGAAUUCUACCUCCA GGAADUUCAGCAACGAAAUUGGCAAGGUCGACGACAGCUUCCUCCAC AGACUGGAAGAAAGCUUCUGGUCGAAAGAACAAAGAACGAAAGAC ACCCGAUCUUCGGAAACAUCCUGGACGAGUCCGCAUACCAAGAAAGUA CCCGACAUCUACCAACUGAGAAAGAAAGCUGGUCGACAGCAAGCAAG GCAGACCUAGACUGAUUACCUUGGACUUGGACACAUAGAAAGUUA GAGGACACUUCUGAUCCGAAAGAGACCUGAAACCCGGACAAACAGCGACGU CGACAAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAAGCUUCCGAA GAAACCCGAUCAAAGCAAGCGGAGUCGACGCAAGCAAUCCUGAGCG CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAAACCUAGUCCGACAGCUGCC GGGAGAAAGAAAGACCGGACUUGUUCGGAAACCUAGUCCGACUAGGACCU GGACUGACACCGAAACUUAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAAGACCAA AGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGACGACGACCUUGGACACCUGCCU GGCACAGAUCCGGAGCCAGUACGACAGACCUUGUCCUGGACAGCAAGAAC CUGAGCGACGCAUUCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAAACACAGAAA UCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAAGAGAUACGACGAAACA CCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCAUCUGGUCAGACAGCAGCUGCCG GAAAGUACAAGGAAAUUUUUUCCGACGAGCAAGAAACGGAUACGGCAG GAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 0 8】

	GCCGAUCCUGGAAAAAGAUGGACGGAACAGAAAGAAACUGCUGGUCAAGCUG AACAGAGAAAGACCCUGCUUGAGAAAAGCAGAGAAACAUUCGACAACGGAAAGCA UCCCGACCCAGAUCCACCCUGGGAGAACUGCACGCCAUAUCCUGAGAAAGACA GGAAGACUUUUAACCCGUUCCUGAAGGACAAACAGAGAAAAGAUCCGAAAAAG AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUAUAUCGUCGGACCCGCGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCGCAUGGAGUACAGAAAGAGCGAAGAAACAUAUCACACC GUGGAACUUUCGAAAGAAUGUCGUCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCUUC AUCGAAAGAAUGACAAACUUUCGACAAAGAACCCUGCCGAAACGAAAAAGGUCC UGCCGAAGCACAGCCUGCUUGUACGAAUACUUUACAGUUAACACGAAACU GACAAAGGUCAAGUACGUACAGAGAAAGAAUGAGAAAGCCGGCAUCCUG AGCGGAGAACAGAGAGAGCAUUGGUUGACCUUGCUUUAAGACAACA GAAAGGUCAACAGUCAAAGCAGCUUGAAGGAAAGACUACUUCAAAGAAAGAUCCA AUGC UU CGACAGCGUCCGAAAUACAGCGGAGUCCGAAAGACAGAUUCAAACGCA AGCCUGGGAAACAUAACACGACCUUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACU UCCUGGACAAACGAGAAACGAAAGACAUCCUGGAGAGACAUCCGUCUGAC ACUGACACUUGUUGAAGACAGAGAAAUUGAUCCGAAAGAAAGACUGAAGACA UACGCACACCUUGUUCGACGACAAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAAGAA GAUACACAGGAUUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAAACGGAAUUCAG AGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCUUGAAGAGCGACGGA UUCGCAAAACAGAAACUUCUUGCAGCUUGAUCCACGACGACGCUGACAU UCAAGGAAGACAUCCAGAAAGCACAGGUCAAGCGGACAGGGAGACAGCCU GCACGAAACACAUCCGCAACCCUGGACAGGAAGCCCGCAAUCAAGAAAGGA AUCCUGCAGACAGUCAAGGUCCGACGAAACUGGUCAAGGUCAUUGGAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 0 9】

GACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUUGGCAAGAGAAAACCAAGAC AACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAAGAAAGAAUUCGAA GAAGGAUUCAAAGGAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCG AAAACACACAGCUGCAGAACGAAAGCUGUAUCCUGUAUCCUGCAGAA CGGAAGAGACAUUACGUCGACAGGAAACUGGACAUAACAAGACUGAGC GACUACGACGUCGACGCAAUUGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACA GCAUCGACAAACAAGGUCCUGACAAAGAAAGCACAAGAACAGAGAAAGAG CGACAAACGUCCCGAGCGAAGAAAGUCCUACAGAAAGAAAGAAACUACUGG AGACAGCUGCUGAACGCAAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAAAC UGACAAAGGCAGAGAGAGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUU CAUCAAGAGACAGCUGGUGGAAACAAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGCA CAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAAACACAAAGUACGACGAAACGACAAGC UGAUCAGAGAAAGUCAAAGGUCUACACACUGAAAGAGCAAGCUGGUCAGCGA CUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAAGGUCAGAGAAAUCAACUAC CACCAAGCACACGACGCAUACCUGAACCGCAGUCCGGAACAGCACUGA UCAAGAAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCUACCGAGACUACAA GGUUCACGACGUCAGAAAGAAUGAUUCGCAAAAGAGCGAACAGGAAAUCCGA AAGGCAACAGCAAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUAGAACUUCUUC AGACAGAAAUCAACUUGGCAACCGGAGAAAUUCGUAUAGAAAGAGACCGGUAU CGAAACAAACCGGAGAAACAGGAGAAAUUCGUUUGGACAAAGGAAAGAGAC UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUCCCGCAGGUAACAUCGUA AGAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUCC GAAAGAGAAACAGCGACAAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAAGGACUUGGACCCG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 1 0】

	AAGAAUACGGAGGAUUUCGACAGCCCGACAGUCCGAUACAGCGUCCUGG UCGUCCAAAAGGUUCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAAGCUGAAGAGCGUCAA GGAACUGCUGGGAUUCACAAUCUUGGAAAGAAAGCAGCUCUUGAAAGAAC CCGAUCCGACUUCUGGAAGCAAAAGGAUACAAGGAAGUCAAAGAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCCGAACUGGAAAACGGAAAG AAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAGGGAACGAACUG GCAUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUUGUACCUUGGCAAGCCACUACG AAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAAGACAAAGAAACAGAAAGCUGUUCGU CGAACAGCACAAAGCACUACCUUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACCGCAACCUUGGACAAGUCCUGA GGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCCAGAGAACAGGCAGAAAA CAUCAUCCACCCUGUUCACACUGACAAACCUUGGAGCAACCGGCAGCAUUC AAGUACUUCGACACAACAUAUCGACAGAAAGAGAUACACAAAGCACAAAGG AAGUCCUGGACGCACAACUGAUCCACCAGAGCAUACACAGGACUGUACGA AACAGAUAUGGACCUAGACCCAGCUUGGAGGAGACCGGAGGAGGAGC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 1 1】

2つの核局存在化 シグナルをC末 端アミノ酸とし て有するC a s 9のアミノ酸配 列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDDSFF IIRLEESFLVEEDKKIHERIPIFGNIVDEVAYIIEKYPTIYIILRKKLV DSTD KADRLIYLAALAIMIKFRGIFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQ L F EENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKD TYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGT EELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPIQIILGELIAILRRQEDFYPFLLKDNREKIE KILTFRIPIYYVGPLARNSRFAWMTRKSEETITPWNFEFVVDKGASQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDL LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLK TYAILFDKVKMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD GFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGGQDSLHEHIANLAGSPA I KK GILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGGKNSRERMKRI EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNY WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL D KAGFIKRQLVETRQITKIIV AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINN YHHAHDAYLNAVVG TALI KKYPKLESEFVYGDYKVYDVVRKMI AKSEQE I GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 1 2】

	PKKYGGFDSP TVAYSVLVVAKVEKGSKKLKS VKELLGITIMERSSEK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNF LYLASHIYEKLGSPEDNEQQLFVEQHKIYYLDEII EQIS EFSKRVI LADANLDKVL SAYNKKIIRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGS GS PKKKRKVDGSPKKKRKVD SG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 1 3】

開始コドンおよび終止コドンを有する、表 3 に列挙される最小ウリジンコドンを使用した、配列番号 2 2 をコードする C a s 9 mRNA OR F	2 2
	3
AUGGACAAGAAGUACAGCAUCCGACUGGACAUCGGAACAAAACAGCGUCG	
GAUGGGCAGUCAUACAGACGAAUACAAGGUCCCCGAGCAAGAAAGUUCAA	
GGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCCAGAAAGAACCCUGAUCCGGA	
GCACUGCUGUCCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAGACUGAAGA	
GAACAGCAAGAAAGAAUAACACAAGAAAGAAAGAAACAGAAUUCUGCUACCU	
GCAGGAAAUUUUACGCAACGAAAUUGGCAAGGUGGACGACAGCUUCUUC	
CACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAAGAAAGCAAGAAAGCAGAAA	
GACACCCGUAUUCUUCGGAAACAUUCGUCGACGAAAGUCCAUACACGAAAA	
GUACCCGACAAUUCACACCUUGAAGAAAGAGUGGUCGACAGCACAGAC	
AAGGCAGACCUAGACUGAUUACCUUGGCACUGGCACACAUCAUCAAAGU	
UCAGAGGACACUUCCUGAUCCGAAAGGAGACCUGAACCCGGACAAACGGA	
CGUCGACAAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAAACAGCUUUC	
GAAGAAAACCCGAUCAAACGCAAGCGAGUCCGACGCAAGGCAAUCCUGA	
GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAAAAACCUGAUCCGACAGCU	
GCCGGAGAAAGAAAGAACGACUUGUUCCGAAACCUGAUCCGACUGAGC	
CUGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUUGGCAGAAAGCG	
CAAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUUGGACAAACCU	
GCUGGCACAGAUCCGGAGACCAAGUACGACAGACCUUGUCCUGGCAGCAAG	
AACUGAGCGACGCAUUCUUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAAACACAG	
AAAUCAAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAAGAGAUACGACGA	
ACACCAACAGGACCUGACACUUGCUGAAGGACUUGGUCAGACAGCAGCUG	
CCGGAAAAGUACAAGGAAAUUUUUUCCGACCAAGAGCAAGAAACGGAUACG	
CAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUUCAAGUUCAU	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 1 4】

CAAAGCCGAUCCUGGAAAAAGAUUGGACGGAAACAGAAAGAAACUGCUGGGUCAAAG CUGAAACAGAGAAAGACCUGGCUUGAGAGAAAGCAGAGAAACAUUCGACAAACGGGAA GCAUCCCGCACCCAGAUCCACCCUGGGAGAAACUGCACGCAAUCCUGAGAAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAAACAGAGAAAGAUCCGAA AAGAUCCUGACAUUCAGAAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAG GAAACAGCAGAUUCGCAUGGAGUACAAGAAAGAGCGAAGAAACAACUAC ACCGUGGAACUUCGAAAGAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGC UUCAUCGAAAAGAAUGACAAAACUUCGACAAAGAACCGCCGAACGAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUUCACAAAGCA ACUGACAAAGGUACAAGUACGUCACAGAAAGGAUGAGAAAGCCGGCAUUC CUGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGGCAAUCCGACCCUGCUUCAAAGACAA ACAGAAAGGUACAAGUCAAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAAGAAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGUGCGAAAUACAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAAAC GCAAGCCUGGGAAACAUACCAAGACCGUUGAGAGAUCAUCAAAGGACAAAG ACUUCUUGGACAAAGAAAGAAACGAAAGACAUCCUGGAAAGACAUCCGUCCU GACACUGACACUGUUCGAAAGACAGAGAAAUAGAUCCGAAAGAACUCUGAAG ACAUACGCACACCCUGUUCGACGACAAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAA GAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGGAAU CAGAGACAAAGCAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCUUGAAGAGCGAC GGAUUCGCAAACAGAAACUUCUUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGA CAUUCAGGAAGACAUCCAGAAAGGCACAGGUACGGGACAGGGAGACAG CCUGCACGAAACAUCGCAACCCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAAGAG GGAUCCUGCAGACAGUCAAAGGUCCGACGAAACUGGUCAAAGGUCAUGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 1 5】

GAAGACACAAAGCCGGAAACACUCCGUCAUCGAAAUUGGCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUAGAAAGAGAAUC GAAGAAAGGAUUCAAAGAACUAGGAAAGCCAGAUCCUUGAAAGAACACCCGG UCGAAACACACAGCUGCAGAACGAAAGCUGUACCUUGUACUACCUUGCA GAACGGAAAGAGACAUUACCGUCCAGCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG AGCGACUACGACCGUCCAGCACCAUCCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACG ACAGCAUCGACAAACAGGUCCUGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGGAAA GAGCGAACACGUCCCGAGCGAAGAAAGUCCUACAGAAAGUAGAAACUAC UGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACA ACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAAGGCAGG AUUCAUCAAAGAGACAGCUGGUCCGAACAAGACAGAUCAACAAAGCACGUC GCACAGAUCCUAGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAAGUCAAAGGUCAUCACACUAGAAAGCAAGCUGGUCCAG CGACUUCAGAAAGGACUUCACAGUUCUACAAAGUACAGAGAAAUCAACAA UACCAACACGCACAGACGCAUACCUAGAACCGCAGUCCGGAACAGCAC UGAUCAGAAAUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUUACCGGACUA CAAAGGUUACGACGUCAGAAAGAAUGAUCCGCAAAAGAGCGAACAGGAAUUC GGAAGGCAACAGCAAAAGUACUUCUUCACAGCAACAUCAUGAACUUCU UCAAGACAGAAAUCAACUGGCACACGGAGAAAUCAAGAAAGAGACCGCU GAUCCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCCUUGGGACAAAGGGAAGA GACUUCGCAACAGUACAGAAAGGUCCUGAGCAUCCCGCAGGUCAACAUCC UCAAGAAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCU GCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCUAGUCCGCAAGAAAGAAAGGACUGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 1 6】

	CCGAAAGAAUACGGAGGAUUUCGACACGCCCGACAGUUCGCAUACAGCGUCC UGGUUCGUCCGCAAGGUUCGAAAAGGGAAGAGCAAGAGCUUGAAGAGCGU CAAGGAACUGCUGGGAUUCACAUCUUGGAAGAAAGCAGCUUCGAAAAG AACCCGACUGGACUUCUGGAGCAAGGGAUACAGGAAGUCAGAAAGG ACUGAUCAUCAAGCUGCCGAAAGUACAGCCUGUUCGAAUCUGGAAAACGG AAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCCAGGAGAACUCAGAAAGGAAACGAA CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCCUGGCAAGCCACU ACGAAAAGCUGAAGGAGCCCGGAAGACACGAAACAGAAAGCUGUU CGUCCAAAGCACAAGCAUACUGGACGAAAUCAUAGAAAGAUCAAGC GAUUACAGCAAGAGAGUCAUCCUGGACAGACCAACCCUGGACAAAGGUCC UGAGCGCAUACACAAGCACAGAGACAAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGA AAACAUCAUCCACCUUGUUCACACUGACAAACCCUGGGAGCACCGGCAGCA UUCAAGUACUUCGACACAAUUCGACAGAAAGAGAUACAAAGCACAA AGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACAGAGCAUACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCCGACUGAGCCAGCUGGAGGAGAGCGGAAGCGGAAGC CCGAAAGAAAGAGAAAGGUCCACGGAAGCCCGAAGAGAGAGAAAGG UCGACAGCGGAUAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 1 7】

表3に列挙されるような最小ワリジンコドンを使用した、配列番号23をコードするCass9ニックーゼコード配列（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）	GACAAAGAAAGUACAGCAUUCGGACUGGACAUUCGGAAACAAACAGCGUCGGAU GGCAGUUAUCACAGACGAAUAACAAGGUCCCGAGCAAGAAAGUUAAGGU CUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAGAAAGAACCUAGUUCGGAGCA CUGCUUUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAGACUGAAAGAA CAGCAAGAAAGAAUACACAAGAAAGAAAGAAACAGAAUUCUGCUACCUCCA GGAUUCUUCAGCAACGAAUUGGCAAGGUCCGACGACAGCUUCCAC AGACUGGAAGAAAGCUUCUGGUCGAGAGAAAGACAGAGCAGAAAGAC ACCGAUUCUUCGGAAACAUUCGUCGAGAGAGUCCAGAUACCGAAAGUA CCGACAAUUCUACCAUCCUGAGAAAGAGAGUUGGUCCGACAGCACAGCAAG GCAGACUUGAGACUGAUUACCUUGGACUUGGCACACAUCAAGAUUUA GAGACACUUCUGAUUGAAGGAGACCUAGAACCCGGACACAGCGAGGU CGACAGCUUUCAUCCAGCUUGGUCCAGACAUACAAACAGCUUGUUGAA GAAACCCGAUUAACGCAAGCGAGUCCGACGCAAAAGGCAUCCUUGAGCG CAAGACUGAGCAAGAGCAGAGACUUGGAAACCUAGUCCACAGCUGCC GGGAGAAAGAAAGAACGGACUUGUCCGAAACCUAGUCCGACUGAGCCUG GGACUGACACCGAACUUCAGAGCAACUUCGACCUUGGACAGAGCGCAA AGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUUGGACAAACCUUGCU GGCACAGAUCCGGAGACCAAGUACGCAGACCUUGUCCUUGGCAGCAAGAAC CUGAGCGACGCAUUCUUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUACACAGAA UACAAAGGCAACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAA CCACAGGACCUGACACUUGCUGAAGGACUUGGUCAAGACAGCGUCCG GAAAGUACAAAGGAAUUCUUCGACCAAGAGCAAGAAAGGAAUUCUACAAAGUUAUCAA GAUACAUCCGACCGGAGGAGCAAGCCAGGAAAGAAUUCUACAAAGUUAUCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 1 8】

	GCCGAUCCUGGAAAAGAUUGGACGGAAACAGAAAGAAACUGGUCAAAGCUG AACAGAGAAAGACCUGCUGAGAGAAAAGCAGAGAAACAUUCGACAAACGGAAAGCA UCCGGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAAGACA GGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAAACAGAGAAAAGAUCCGAAAAG AUCCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCCGCGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCGCAUGGACAGAAAGAGCGAAGAAACAUAUCACACC GUGGAACTUUCGAAAGAUUCGUCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCUUC AUCGAAAAGAAUGACAAACUUCGACAAAGAACCCUGCCGAAACGAAAAGGUCC UGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUUCACACGAAACU GACAAAGGUCAAAGUACGUCACAGAGGAAGAAUGAGAAAGCCGGCAUCCUG AGCGGAGAAACAGAAAGAGGCAAUUGUCGACCCUGCUUCAAAGACAAACA GAAAGGUCCACAGUCAAAGCAGCUGAAGGAAAGACUACUCAAAGAAAGAUCCA AUGCUCGACAGCCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAAACGCA AGCCUGGGAACAUAACACGACCCUGCUGAAGAUCAUCAAAGGACAAAGGACU UCCUGGACAAACGAAAGAAACGAAACAUCUGGAAAGACAUCGUCUCCUGAC ACUGACACUUGUCCGAAGACAGAGAAAUAGAUUCGAAAGAAAGACUGAAAGACA UACGCACACCUGUUCGACGACAAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAAGAA GAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAAGCUGAUCAACGGAAUCAG AGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCUUGAAGAGCGGACGGA UUCGCAAAACAGAAACUUCUUGCAGCUGAUCCACGACAGCCUGACAU UCAAGGAAGACAUCCAGAAAGCACAGGUACAGCGGACAGGGAGACAGCCU GCACGAACACAUCCGCAACCCUGGACGGAAGCCCGCAAUCAAGAAAGGA AUCUUCGACACAGUCAAAGGUCCGUCGACGAAACUGGUCAAAGGUCAUGGGAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 1 9】

GACACAAGCCGGAAAAACAUCGUCAUUCGAAAUUGGCAAGAGAAAAACCAGAC AACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAAGAGAAUCCGAA GAAAGAAUCAAAGGAACUGGGAAAGCCAGUCCUGAAAGAAACCCGGUCCG AAAAACACACAGCUGCAGAACGAAACGAAAGCUGUACCCUGUACUACCUGCCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCCGACCAGGAACUGGACAUCAAACAGACUGAGC GACUACGAGGUCCGACCAUCCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACA GCAUCGACAAACAAGUCCUGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGGAAAGAG CGACAAACGUCCCGAGCGAAAGAAAGUCCUGUACAAAGAAAGUAAAGAAUACUUGG AGACAGCUGCUGAAACGCAAAAGCUGAUCAACACAGAGAAAGUUCGACAAAC UGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCCGAACUGGACAAGGCCAGGAUU CAUCAAGAGACAGCUGGUCCGAAACAAGACAGAUCAAAAGCAGCUGCCGA CAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAAACACAAAGUACGACGAAACGACAAAGC UGAUCAGAGAAAGUCAAAGGUCAUCCACACUGAAAGAGCAAGCUGGUCAGCGA CUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUACAGAGAAAUCAACAAACUAC CACCAAGCACACGACGCAUACCUCAACGACAGCUGCUGGAAACAGCACUGA UCAAGAAUAACCGAAGCUGGAAGCGAAUUCGUCAACGAGACUACAA GGUCUACGACGUCAGAAAGAUAGUUCGCAAAAGAGCGAAACAGGAAAUCCGGA AAGGCAACAGCAAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCA AGACAGAAAUCAACUCUGGCAAACGGAGAAAUCAAGAAAGAGACCCGUGAU CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCCGUUCUGGGACAAAGGGAAGAGAC UUCGCAACAGUACAGAAAGGUCCUGAGCAUCCCGCAGGUCAACAUCGUCA AGAAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAAGGACUGGGACCCG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 2 0】

	AAAGAAUACGGAGGAUUCGACACAGCCCGACACAGUCGCACUACAGCGUCCUGG UCGUCGCAAAAGGUCGAAAGGGAAGAGCAAGAAAGCUAGAGAGCGUCAAA GGAACUGCUGGGAUUCACAAUCUUGGAAGAGCAGCUUCGAAAGAAC CCGAUCGACUUCUUGGAAGCAAGGGAUACAGGAAGUCAGAGAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUUGUUGAACUGGAAACCGGAAG AAAGAGAAUUCUGGCAAGCCGAGGAGAACUCAGAGGAAACGGAACUG GCACUCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUUGUACCUUGCAAGCCACUACG AAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACACAGAACAGAGCAGCUGUUCGU CGAACAGCACAGCACUACCUUGGACGAUUCUUGAACAGAUACAGCGAA UUCAGCAAGAGAGUACAUCUUGGCAGACGCAACCUUGGACAAAGUCCUGA GGCAUACAACAAGCACAGAGACAAAGCCGAUCAGAGAACAGGACAGAAA CAUCAUCCACCUUGUUCACACUGACAAACCUUGGAGCACCCGCGACAUUC AAGUACUUCGACACAAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAGCACAAAGG AAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACAGAGCAUACAGGACUGUACGA AACAAAGAAUCCGACUAGCCAGCUGGAGGAGAGCGGAAGCGGAAGCCG AAGAAAGAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAGAGAGAAAGGUCG ACAGCGGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 2 1】

2つの核局在化 シグナルをC末端 アミノ酸として有するCas 9ニッカーゼの アミノ酸配列	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTRHSIKKNLIG ALLFDSGETAETRKRRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF IIRLEESFLVEEDKKIHERIPIFGNIVDEVAYHIEKYPTIYHILRKKLVDS TDKADRLIYLALAIMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDFLFIQLVQTYNQ LFFENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGCKKNGLFGNLI ALS LGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKDITYDDDLNLLAQIGDQYAD FLAAKNLSDAIILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTL LLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPI LEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPIQIHLGELI AILRRQEDFYFLKDNREKIEKILTFRI PYYVGPLARGNSRFAWMT RKSEETITPWNFEVVDK GASQSFIERMTNFDK NLPNEKVL PKHSLLYEYFTVYNE LTKVKYVTEGMRKPA FLSGEQKKAIVD LLFKTNRKVT VKQLKEDYFKKIECFD SVEISGVEDRFN ASLGTYHDL LLKIIKDKDFLDNEE NEDILEDIVLTLTL FEDREMIEERL KTYAHLFDDK VMKQLKRRRYT GWGRLSRKLINGIR DKQSGKTILDFL KSDGFANRNF MQLIHDDSLTF KEDIQKAVSGQGD SLHEHIANLAGSP AIKKGILQTVK VVDFLVKVMGR HKPENIVIFEMAR ENQTTQKGGKNS RFRMRRI EEGIKELGSQ ILKEHPVENTQ LQNEKLYLYLQNG RDMYVDQELDIN RLSDYD VDHIVPQSFL KDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDN VPSEEVKKMK NYWRQLLNA KLITQRKFD NLTKAERGGL SELDKAGFIK RQLVETRQIT KIIVAQI LDSRMNTKY DENDKLIREV KVITLKS KLVSDFRKDF QFYKVREIN NYHHAHD AYLNAVVG TALIKKYP KLESEFVY GDYKVYD VRKMI AKSEFEI GKATAKY FFYSNIMN FFKTEIT LANGEIR KRPLIE TNGET GEIVWD KGRDFA TVRK VL SMPQ VNI VKKTE VQTG GFSK ESIL PKR NSD KL IAR KKD WD

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 2 2】

	PKKYGGFDSP TVAYSVLVVAKVEKGSKKLKS VKELLGITIMERS SF EK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELNGRRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFLYLASHIYEKLGSPEDNEQKQLFVEQIKHIYLD EII EQIS EFSKRVI LADANLDKVL SAYNKNIRDKPIREQAENI IILFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGS GS PKKKRKVDGSPKKRKVD SG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 2 3】

開始コドンおよび終止コドンを有する、表3に列挙される最小ウリジンコドンを使用した、配列番号25をコードするC a s 9 ニッケアーゼmRNA ORF	AUGGACAAAGAAAGUACAGCAUCGGAUCUGGCAAUUGGAAACAAACAGCGUCG GAUGGGCAGUCAUCACAGACGAUAUACAAGGUCCCCGAGCAAGAAAGUUCAA GGUCCUGGGAACACAGACAGACACAGCAUCAGAAAGAACUUGAUCGGA GCAUCUGCUUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAAGACUGAAGA GAACAGCAAGAAAGAAAGUACACAAAGAAAGAAAGAAACAGAAUUCUGCUACCU GCAGGAAAUUCUUCAGCAACGAAAUUGCAAAGGUCCGACGACAGCUUCUUC CACAGACUGGAAGAAAGCUUCUGGUCGAGAGAAAGACAAAGAAAGCAGAAA GACACCCGAUCUUCGGAAACAUUCGUCGAGAGAGUCCGAAUCCACGAAAA GUACCCGACAAUCUACCAUCCUGAGAAAGAAAGCUGGUCGACAGCACAGAC AAGGCAGACCUAGACUGAUUACCUUGGCACUUGGCACACAUCAUCAAAGU UCAGAGGACACUUCUGAUCCGAGAGGAGACCUUACCCGGACAAACAGCGA CGUCGACAAAGCUUGUUCAUCCAGCUGGUCAGACAUACAACCAAGCUUGUC GAAAGAAACCCGAUACACGCAAGCGGAGUCCGACGCAAAAGGCAAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUUGGAAACCUUGAUCGACACAGCU GCCGGAGAAAGAAAGAACGGACUUGUCCGAAACCUUGAUCGACUCGAGC CUGGACUGACACCGAACUUCAGAGCAACUUCGACCUUGGACAGAACG CAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUUGGACAAACCU GCUGGCACAGAUCCGGAGACCAAGUACGACGACCUUGUCCUGGACGCAAG AACCUAGCGGACGCAUUCUGCUGAGCGGACUUCUGAGAGUCAAACACAG AAAUCACAAAGGCACCGCUAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGA ACACCAACGAGACCUGACACUGCUAGGCAUUGGACUUGGACAGACGCUUG CCGGAAGAAAGUACAAAGGAAAUUCUUCGACCAAGACAGCAAGAACGGAUACG CAGGAUACAUCCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAAGUUCAU	2 2 6

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 2 4】

C A A G C C G A U C C U G G A A A A G A U G G A C G G A A C A G A A G A A C U G C U G G U C A A G	
C U G A A C A G A G A A G A C C U G C U G A G A A A G C A G A G A A C A U U C G A C A A C G G A A	
G C A U C C C G C A C C A G A U C C A C C U G G G A G A C U G C A C G C A A U C C U G A G A A G	
A C A G G A A G A C U U C U A C C C G U U C C U G A A G G A C A C A G A G A A A G A U C G A A	
A A G A U C C U G A C A U U C A G A A U C C C G U A C U A C C G U A C C G U G G C A A G A G	
G A A A C A G C A G A U U C G C A U G G A U G A C A A G A A A A G A G C G A A A C A A U C A C	
A C C G U G G A A C U U C G A A G A U C G U C G A C A A G G G A G C A A G C G C A C A G A G C	
U U C A U C G A A A G A U G A C A A C U U C G A C A A G A A C C U G C C G A A C G A A A A G G	
U C C U G C C G A A G C A G C C U G C U G U A C G A A U A C U U C A C A G U U A C A A C G A	
A C U G A C A A A G G U C A A G U A C G U C A C A G A A A G A A U G A A G A A A G C C G G C A U U C	
C U G A G C G G A A C A G A A A A G G C A A U C C G U C C G A C C U G C U U C A A G A C A A	
A C A G A A A G G U C A C A G U C A A G C A G C U G A A G G A A G A C U A C U U C A A G A A G A U	
C G A A U G C U U C G A C A G C G U C G A A A U C A G C G G A G U C G A A G A C A G A U U C A A C	
G C A A G C C U G G G A C A U A C C A C G A C C U G C U G A A G A U C A U C A A G G A C A A G G	
A C U U C C U G G A C A A C G A A A A A C G A A A C G A A C U C C U G G A A G A C A U C C G U C C U	
G A C A C U G A C A C U G U U C C G A A G A C A G A A A U G A U C C A A G A A C A C U G A A G	
A C A U A C G C A C A C C U G U U C G A C G A C A A G G U C A U G A A G C A G C U G A A G A G A A	
G A A G A U A C A C A G A U G G G A A G A C U G A G C A G A A A G C U G A U C A A C G G A A U	
C A G A G A C A A G C A G A G C G A A A G A C A A U C C U G G A C U U C U G A A G A G C G A C	
G G A U U C G C A A A C A G A A A C U U C A U G C A G C C U G A U C C A C G A C G A C A G C C U G A	
C A U U C A A G G A A G A C A U C C A G A A G G C A C A G G U C A G C G G A C A G G G A C A G A C A G	
C C U G C A G G A A C A U C G C A A A C C U G G C A G A A G C C G G C A A U C A A G A A G	
G G A A U C C U G C A G A C A G U C A A G G U C C U C G A C G A A C U G G U C A A G G U C A U G G	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 2 5】

GAA GAC A C A A G C C G G A A A A C A U C G U C A U C G A A A U G G C A A G A G A A A A C C C A G A C A A C A C A G A A G G G A C A G A A G A A C A G C A G A G A A A G A A U G A A G A G A A U C G A A G A A G G A A U C A A G G A A C U G G G A A G C C A G A U C C U G A A G G A A C A C C C G G U C G A A A A C A C A C A G C U G C A G A A C G A A A G C U G U A C C U G U A C U A C C U G C A G A A C G G A A G A G A C A U G U A C G U C G A C C A G G A A C U G G A C A U C A A C A G A C U G A C C G A C U A C G A C G U C G A C C A C A U C C U C C C G C A G A G C U U C C U G A A G G A C G A C A G C A U C G G A C A A C A A G G U C C U G A C A A G A A G C G A C A A G A A C A G A G A A A G A G C G A C A A C C G U C C G A G C G A A G A A G U C G U C A A G A A G A U G A A G A A C U A C U G G A G A C A G C U G C U G A A C G C A A A G C U G A U C A C A G A G A A A G U U C G A C A A C C U G A C A A A G G C A G A G A G A G A G A C U G A G C G A A C U G G A C A A G G C A G G A U U C A U C A A G A G A C A G C U G G U C G A A A C A G A C A G A U C A C A A A G C A C G U C G C A C A G A U C C U G G A C A G C A G A A U G A A C A C A A A G U A C G A C G A A A A C G A C A A G C U G A U C A G A G A A G U C A A G G U C A U C A C A C U G A A G A G C A A G C U G G U C A G C G A C U U C A G A A A G G A C U U C C A G U U C U A C A A G U C A G A G A A A U C A A C A A C U A C C A C C A C G C A C A G A C G C A U A C C U G A A C C G A C C G A U C G G A C A G C A C U G A U C A A G A A G U A C C G A A G C U G G A A A G C G A A U U C G U C U A C G G A C U A C A A G G U C U A C G A C G U C A G A A A G A U G A U C G C A A A G A G C G A A C A G G A A A U C G G A A A G G C A A C A G C A A A G U A C U U C U C A C A G C A A C A U C A U G A A C U U C U U C A A G A C A G A A A U C A C A C U G G C A A A C G G A G A A A U C A G A A A G A G A C C G C U G A U C G A A A C A A A C G G A G A A A C A G G A G A A A U C G U C U G G G A C A A G G G A A G A G A C U U C G C A A C A G U C A G A A A G G U C C U G A G C A U G C C G C A G G U C A A C A U C G U C A A G A A G A C A G A A G U C C A G A C A G A G G A U U C A G C A A G G A A A G C A U C C U G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C U G A U C G C A A G A A A G A A G G A C U G G G A C	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 2 6】

	CCGAAGAAGUACGGAGGAUUUGGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCC UGGUCGUCGCAAGGUCGAAAGGGAAAGAGCAAGAGCUGAAGAGCGU CAAGGAACUGCUGGGAUUCACAAUCUUGGAAGAGAGCAGCUUCGAAAGG AACCCGAUCGACUCCUGGAAGCAAGGGAUACAGGAAGUCAAAGAGG ACCUGAUCAACAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAAACUGGAAAACGG AAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCCAGGAGAACUGCAGAGGGAACGAA CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUUAUCCUGGCAAGCCACU ACGAAAGCUGAAGGGAGGCCCGGAGACACGAAACAGAGCAGCUGUU CGUCGAAACAGCACAGCACUACCUUGGACGAAAUCAUCGAAACAGUACAGC GAUUUCAGCAAGAGAGUACAUCUUGGCAGACGCAACCUUGGACAAAGGUCC UGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUUCAGAGAACAGGCAGA AAACAUCAUCCACCUUGUUCACACUGACAAACCUUGGAGCACCGGCAGCA UUCAAGUACUUCGACACACAACAAUUCGACAGAAAGAGAUACACAAAGCACAA AGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUACACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCCAGCCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGCGGAAGC CCGAAGAGAGAGAAAGGUCCGACGGAGCCCGAAGAGAGAGAGAAAGG UCGACAGCGGAUAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 2 7】

表3に列挙される最小ウリジンコドンを使用した、配列番号25をコードするCas9ニッカ--ゼコード配列(開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である)	GACAAAGAAAGUACAGCAUCCGGACUUGGC AAAUCGGAAACAAAACAGCCGUCGGAU GGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAAGGUCCCGAGCAAGAAAGUUCAAAGGU CCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUACAGAAAGAAACCUAGUUCGGAGCA CUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAGCAGAAACAGACUGAAGAGAA CAGCAAGAAAGAAUACACAAGAAAGAAAGAAACAGAAUUCUGCUACCCUGCA GGA AUUCUUCAGCAACGAAAUUGGCAAGGUCGACGACAGCUUCCUCCAC AGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAAGAGACAAAGAACGAAAGAC ACCCGAUCUUCGGAAACAUCCGUCGACGAAAGUUGCAUACACGAAAGUA CCCGACAUCUACCAACUGAGAAAGAGCUGGUCGACAGCAAGCAAGCAAG GCAGACCUAGAGACUGAUUACCUUGGACUUGGACACACAUGAUCAAGUUC GAGGACACUUCUUGAUCCGAAAGGAGACCUGAAACCCGGACAACAGCGAGCU CGACAAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAAGCUUGUUCGAA GAAACCCGAUCAAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAGGCAUCCUGAGCG CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAAACCUUGAUCCGACAGCUGCC GGGAGAAAGAAAGAACGGACUUGUUCGGAAACCUGACUCCAGUCCGAGCCUG GGACUGACACCGAAACUUAAGAGCAACUUCGACCUCCAGAAAGACCGAA AGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGACGACGACCUUGGACAAACUUGCU GGCACAGAUCCGGAGACCAUAACGACAGACCUUGUCCUGGACAGCAAGAAAC CUGAGCGACGCAUCCUGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAAAC UCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAAAC CCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGACUUGGUCAGACAGCAGCUCCCG GAAAGUACAAGGA AUUUUUUCCGACCAAGCAAGAAAGAAAGAAAGAAAG GAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 2 8】

GCCGAUCCUGGAAAAAGAUGGACGGAAACAGAAAGAACUGCUGGUCAAAGCUG AACAGAGAAAGACCUGCUGAGAGAAAGCAGAGAAACAUUCGACAAACGGAAAGCA UCCGGCAACAGAUCCACCCUGGGAGAACUGCAACGCAUCCUGAGAAAGACA GGAAAGACUUCUACCCGUCUGAACGACACACAGAGAAAGAUCCGAAAG AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGACCCGUCGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCCGAUUGGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAACACACC GUGGAACUUCGAAAGAUUGCUGGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCUUC AUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAAGAACCCUGCCGAAAGAAAGGUCC UCCGAAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAAACGAAACU GACAAAGGUCAGUACGUCACAGAAAGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUUG AGCGGAGAACAGAAAGAGGCAUCCUGGACCCUGCUGUUCAGACAACA GAAAGGUCAACAGUCAAAGCAGCUGAAGGAAAGACUACUUCAGAAAGAUCCA AUGCUCGACAGCGUCGAAAUACAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAAACGCA AGCCUGGGAAACAUACCAAGACCCUGCUGAAGAUCAUCAAAGGACAAAGGACU UCCUGGACAAAGAAAGAAACCAAGACAUCCUGGAGACAUCCGUCUUGAC ACUGACACUGUUCGAAAGACAGAGAAAUAGAUCCGAAAGAAAGACUGAAGACA UACGCACACCCUGUUCGAGACGACAAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAAGAA GAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCCAG AGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUCCUGAAGAGCGGACGGA UUCGCAAAACAGAAACUUCUAGCAGCUGAUCCAGCAGCAGCAGCUGACAU UCAAGGAAGACAUCCAGAAAGGCACAGGUACAGCGGACAGGAGACAGCCU GCACGAAACACAUCCGCAAAACUUGGACAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAAGGGA AUCCUGCAGACAGUCAAAGGUCCGUCGACGAAACUGGUCAAAGGUCAUGGGAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 2 9】

	GACACAAGCCGGAAAAACAUCGUCAUUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGAC AACACAGAAAGGGACAGAAAGAACAGCAGAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCCGAA GAAGGAUUCAGGAUUCUGGGAGGCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCG AAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUUACCUACGACAGAA CGGAAGAGACAUUACCUCCAGCAGGACUUGGACAUCAACAGACUGAGC GACUACGACGUCGACCCACAUCCGUCGCCGAGCCUCCUGAAGGACGACA GCAUCGACAAACAAGGUCCUGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGGAAAGAG CGACAAAGUCCCGAGCGAAGAAAGUCCGUCAAAGAAAGUAGAAACUACUGG AGACAGCUGCUGAACGCAAAAGCUGAUACACAGAGAAAGUUCCGACAAAC UGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCCGACUUGGACAAAGCAGGAUU CAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGCA CAGAUCCUGGACAGCAGAAUAGAAACACAAAGUACGACGAAACGACAAAGC UGAUCAGAGAAAGUCAAAGGUCAUCACACUGAAAGAGCAAGCUGGUCAGCGA CUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUACAGAGAAAUCAACAACUAC CACCAAGCACACGACGCAUACCUGAACGCGAGUCGCGAACAGCACUGA UCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUUACGAGACUACAA GGUCUACGACGUCAGAAAGAUAGUUCGCAAAAGAGCGAAACAGGAAAUCCGGA AAGGCAACAGCAAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUA AGACAGAAAUCAACACUGGCAAAACGGAGAAAUCAAGAAAGAGACCGCUGAU CGAAACAACCGGAGAAACAGGAGAAAUCCGUUCUGGGACAAAGGAAAGAGAC UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUCCGCGAGGUCAACAUCGUC AGAAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAGCAUCCUGCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAAGGACUGGGACCCG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 3 0】

	AAAGAAUACGGAGGAUUUCGACAGCCCGACAGUUCGCAUACAGCGUCCUGG UCGUCGCAAAAGGUCGAAAAGGAAAAGAGCAAGAAAGCUGAAGAGCGUCA GGAACUGCUGGGAUUCACAAUUCUUGGAAAGAGCAGCUUCGAAAAGAAC CCGAAUCGACUUCUGGAAGCAAGGGAUACAGGAAGUACAGAGAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUUGAAACUGGAAACGGAA AAAGAGAAUUCUGGCAAGCGCAGGAGAAACUGCAGAAAGGAAACGAAACUG GCACUGCCGAGCAAGUACGUACACUCCUGUACCUUGGCAAGCCACUACG AAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACACGAAACAGAAAGCAGCUUUCGU CGAACAGCACAAAGCACUACCUUGGACGAAAUCAUCGAAACAGAUACAGCGAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACCGCAAAACCUGGACAAAGUCCUGA GGCAUACAAACAAGCACAGACAAAGCCGAUCAGAGAAACAGGCAGAAAA CAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUUGGAGCACCGGCAGCAUUC AAGUACUUCGACACAAACAUCCGACAGAAAGAGAUACACAGCACAAAGG AAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACAGAGCAUACAGGACUGUACGA AACAAAGAAUCCGACCUAGCCAGCUUGGAGGAGACCGGAAGCGGAAAGCCCG AAGAAAGAGAGAAAGGUCCGACGGAGCCCGAAGCCCGAAGAGAAAGGCUCC ACAGCGGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 3 1】

2つの移局在化 シグナルをC末 端アミノ酸とし て有するdCas9の アミノ酸配列	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF IRLEESFLVEEDKKIHERIPIFGNIVDEVAYIEKYPTIYILRKKLVDSTD KADRLIYLAIAIMIKFRGIHFLIEGDLNPDNSDVKLFILQVQTYNQFLF EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENIAQLPGEKKNGLFGNLIAALS LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDLDNLALQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVRQQL PEYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPHIILGELHAILRRQEDFYFLLKDNREKIE KILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSHLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLK TYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD GFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGSLSHEHIANLAGSPAIAKK GILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSREFMKRI EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYVDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKNY WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKIIIV AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFYKVVREINN YHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMKIAKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD	22 8

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 3 2】

PKKYGGFDSP TVAYS VLVAKVEKGSKKLKSVKELLGITIMERSSEK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNF LYLASHIYEKLKGSPEQKQLFVEQIHKIYLDDEIIEQIS EFSKRVI LADANLDKVL SAYNKIIRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGS PKKKRKVDGSPKKKRKVDSG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 3 3】

開始コドンおよび終止コドンを示す、表 3 に列挙される最小オリジンコドンを使用した、配列番号 28 をコードする dCa s 9 mRNA ORF	AUGGACAAAGAAAGUACAGCΔUCGGACUCGGCAΔUCGGAAΔCAAΔCAGCGUCG GAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAAGGUCCCGAGCAAGAAAGUUCAA GGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAGAAAGAACCCUGAUCGGGA GCAUCGUGUUGGACAGCGGAGAAACAGCAGAGCAACAGACUGAAGA GAACAGCAAGAAAGAAAGAAUACACAAAGAAAGAAACAGAAUUCUACCU GCAAGAAAUUCUACGCAACGAAAUUGCAAAGGUCCGACGACAGCUUCUUC CACAGACUGGAAAGAAAGCUUCUGGUCGAAAGAAAGACAAAGACACGAAA GACACCCGAUUCUGGAAACAUUCGUCGACGAAAGUCCAUACCAAGAAAA GUACCCGACAAUCUACCAACUGAGAAAGAGCGUGGUCGACAGCAGAC AAGGCAGACCUAGACUAGAUCCUACCGGACUUGGCACACAUAGAUCAAAGU UCAGAGGACACUUCUGAUCCGAAAGGAGACCUGAACCCGGACAAACGGA CGUCGACAAAGCUGUUCUCCAGCUGGUCAGACAUACAAACAGCUGUUC GAAGAAAACCCGAUCAAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAGGCAUCCUGA GCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAACUGGAAACCUAGUCCGACAGCU GCCGGAGAAAGAAAGAACGGACUUGUCCGAAACCUGAUCCGACUAGGC CUGGACUGACACCCGAACUUCAGACAAUCCGACUUGGACAGAAAGCG CAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGACGACGACCCUGGACAAACCU GCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGACGACCUUGUCCUGGACAGCAAG AACCUAGCGGACGCAUUCUGCUGAGCGACUCCUGAGAGUCCACACAG AAAUACAAAGGCAACCGCUGAGCGCAAGCAUAGAUCAAAGAUACGAGCA ACACCACAGGACCUGACACUGCUGAAGGCAUUGGUCAGACAGCAGCUG CCGGAAGUACAAAGAAAUUUUUUCCAGCAGACAGAAACGGAUACG CAGGAUACAUCCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUUUAACAGUUCAU

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 3 4】

CAAGCCGAUCCUGGAAAAAGAUUGGACGGAAACAGAAAGAACUGCUGGUCAAAG CUGAACAGAGAAAGACCUUGCUGAGAAAGCAGAGAAACAUUCGACAAACGGAA GCUUC CCGCACCAGAUCCACUGGGAGAACUGCACGC AAUCCUGAGAAAG ACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAAACAGAGAAAAGAUCCGAA AAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGACCCGUCGCAAGAG GAAACAGCAGAUUCGCAUGGAGUACAAGAAAGAGCGGAAGAAACAAUCAC ACCGUGGAAACUUCGAAAGAAAGUCCGUCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGC UUCAUCCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAAGAACCUGCCGAAACGAAAGG UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAAACGA ACUGACA AAGGUCAGUACGUCACAGAAAGAAUGAGAAAGCGGCAUUC CUGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGGCAUCCGUCGACCUUGUUAAGACAA ACAGAAAGGUACACAGUCAAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUC AAGAAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGGUCGAAAUACAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAAC GCAAGCCUGGGAACAUACCAAGCAGCCUGCUGAAGAUCAUACAGGACAAAG ACUUCUGGACAACGAAAGAAACGAAAGCAUCCUGGAAAGACAUCCUCCU GACACUGACACUUGUCCGAAAGACAGAGAAAUUGAUCCGAAAGACUCGAAAG ACAUA CCGCACACCUGUUUCGACGACAAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAA GAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAU CAGAGCAAGCAGAGCGGAAAGACAUCCUGGACUUCUUGAAGAGCGAC GGAUUCGC AAACAGAAACUUCUUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGA CAUUC AAGGAAGACAUCCAGAAAGGACAGGU CAGCGGACAGGGAGACAG CCUGCACGAAACACAUCCGCAACCUUGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAAG GGAAUCCUGCAGACAGUCAAAGGUCCUGCAGCAACUGGUCAAAGGUCAUGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 3 5】

GAAGACACAAGCCGGAAAAACAUCCGUCAUCGAAAUUGGCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAAACAGCAGAGAAAGAAUAGAAAGAAUUC GAAAGAAAGAAUCAAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAAGAAACACCCGG UCCAAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAGAAAGCUGUACCUUACUACCUUGCA GAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCCAGGAAACUGGACAUAACAAGACUG AGGACUACGACGUCGAGGCAUCCUCCCGCAGACUUCUUGAAGGACG ACAGCAUCGACAAACAAAGGUCCUGACAAAGAAAGCAAAAGAAACAGAGGAAA GAGCGACAAACGUCCCGAGCGAAGAAAGUCCGUCAAAGAAAGUAGAAACUAC UGGAGACAGCUGCUGAAACGCAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACA ACCUGACAAAGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAAACUGGACAAGGCAGG AUUCAUCAAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAAGACAGAUCAAAAGCACGUC GCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUAGAAACACAAAGUACGACGAAACGACA AGCUGAUCAGAGAAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAG CGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAAGUACAGAGAAUCAAACAAAC UACCAACACGACACAGACGCAUACCUGAACGACGUCGUCGAAACAGCAC UGAUCAAAGAAUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUUACCGGAGACUA CAAGGUUCUACGACGUCAGAAAGAUAGUCCGCAAGAGCGAACAGGAAAUUC GGAAGGCAACAGCAAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUAUGAACUUCU UCAAGACAGAAUACACACUGGCAACCGGAGAAUACAGAAAGAGACCGCU GAUCGAAACCAACCGAGAAACAGGAGAAAUUCGUUCCUGGACAAAGGAAAG GACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCUAGCAUCCGACAGUCAAACAUCCG UCAAGAGACAGAAUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCU GCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCUGAUCGCAAGAAAGAGACUUGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 3 6】

	CCGAAAGAAAGUACGGAGGAAUUCGACACAGCCCGACACAGUCCGCAUAACAGCGUCC UGGUCGUCGCAAAAGGUUCGAAAGGAAAGAGCAAGAAAGCUGAAGAGCGGU CAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUACUUGGAAAGAAAGCAGCUUCGAAAGG AACCCGATCCGACUUCUUGGAAGCAAGGGAAUACAAAGGAAGUCAGAAAGG ACCUGAUCACAAAGCUCCGAAAGUACAGCCUGUUCGAAACUGGAAACGG AAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAAGGAAACGAA CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUUGGCAAGCCACU ACGAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAAGAAACAGAAAGCAGCUUU CGUCGAAACAGCAACAGCACUACCUUGGACGAAAUCAUCGAAACAGAUAGC GAAUUCAGCAAGAGAGUACAUCUUGGACAGACGCAAAACUUGGACAAAGGUCC UGAGCCCAUACAAACAAAGCACAGAGACAAAGCCGAUCAGAGAAACAGGCAGA AAACAUAUCCACCUUUCACACUGACAAACCUUGGAGCACCGGCAGCA UUCAAAGUACUUCGACACAACAAUUCGACAGAAAGAGAUACACAAAGCACAA AGGAAAGUCCUGGACGCAACACUUGAUCCACAGAGCAUACAGGACUGUA CGAAACAAGAAUCCGACCUAGCCAGCUGGAGGAGACGGAACGGGAAGC CCGAAGAAAGAGAAAGGUCCACGGAAGCCCGAAGAAAGAGAGAAAGG UCCACAGCGGAUAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 3 7】

表3に列挙されるような最小ウリジンコードンを使用した、配列番号28をコードするdCas9コード配列（開始コードまたは終止コードなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）	GACAAAGAAAGUACAGCAUCGGACUUGGCAAUUCGGAACAAACAGCGUCCGGAU GGGCAGUCAUCAAGACGAAUACAAGGUCCGAGCAAGAAAGUUCAGGU CCUGGGAAACACAGACAGACAGCAUCAGAAAGAAACCUUGAUCGGAGCA CUGCUUUCCAGACAGCGAGAAACAGCAGAAAGCAACAGACUAGAAAGAA CAGCAAGAAAGAAUACAGAAACAGAAAGAAAGAAACAGAAUCUGCUACCUCA GAAAUUUUCAGCAACGAAAUUGGCAAGGUCGACGACUUCUUCAC AGACUGGAAAGAAAGCUUCUGGUCGAAAGAAAGCAAGCAAGCAAGAC ACCGAUUCUUGGAAACAUUCGUCGACGAAAGUCCAUACCGAAAGUA CCGACAAAUUACCCACUGAGAAAGAAAGCUUGGUCGACAGCACAGCAAG GCAGACCUGAGACUGAUUACCUUGGCAUCUGGCAACAUCAAGUUCA GAGGACAUUCCUGAUUCGAAAGGAGACCUGAAACCGGACAAAGCGAGU CGACAGCUGUUCAUUCAGCUGGUCAGACAUACAAACAGCUUGUUGAA GAAACCCCGAUUACCGCAAGCGGAGUCGACGCAAGGCAAUCCUGAGCG CAAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAAACCUGAUCCGACAGCUGCC GGAGAAAGAAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGACUGGACUGAGCCUG GCACUGACACCGAACUUCAGAGCAAUUCGACCUUGGACAGACGCA AGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUUGGACAAACCUUGCU GGCACAGAUCCGGAGACCAAGUACGACAGACCUUGUCCUGGACAGCAAGAAC CUGAGCGACGCAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAAACACAGAAA UCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAAACA CCACCAGGACCUGACAUUGGUAAGGACUUGGUCAGACAGCAGCUGCCG GAAAGUACAAAGGAAAUUUUUUCCGACAGACAGCAAGAAACGGAAUACGGCAG GAUACAUCCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAAGAAUUUCAAAGUUCAUCAA	23 0

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 3 8】

GCCGAUCCUGGAAAAAGAUGGACGGAAACAGAAAGAACUGCUGGUC AAGCUG AACAGAGAAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAAACA UUCGACAAACGGAAAGCA UCCGCAACAGAUCCACCCUGGGAGAACUGCAACGC AAUCCUGAGAAAGACA GGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAAACAGAGAAAAGAUCCGAAAAG AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCCGACCCUGGCAAGAGGAA ACAGCAGAUUCCGAUUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAADACACAC GUGGAACUUCGAAAGAAUGUGUGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCUUC AUCGAAAAGAAUGACAAACUUCGACAAAGAACCUUGCCGAAACGAAAAGGUCC UCCGAAAGCACAGCCUGCUGUAACGAAUAUACUUCACAGUCUACAAAGAAAU GACAAAGGUCAGUACGUACAGAACAGAAAGAAUGAGAAACCGGCAUCCUG AGCGAGAACAGAAAGAGGCAAUCCGUCCAGCCUGCUGUUCAAAGACAAACA GAAAAGGUACACAGUCAAAGCAGCUUGAAAGGAAAGACUACUUCAAAGAAAGUCCA AUGCUCGACAGCGUCGAAAUAACAGCGGAGUCGAAAGACAGAUUCAAACGCA AGCCUGGGAAACAUAACACGACCCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAAGGACU UCCUGGACAAAGAAAGAAACGAGACAUCUCCUGGAAAGACAUCGUCCUGAC ACUGACACUGUUCGAAAGACAGAGAAAUAGAUCCGAAAGAAAGACUAGAGACA UACGCACACCCUGUUCGACGACAAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAAGAA GAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAAACGGAAUACAG AGACAAGCAGAGCGGAAAGACAUAUCCUGGACUUCUUGAAGAGCGACGGA UUCGCAACACAGAAACUUC AUGCAGCUUGAUCCACGACGACAGCCUGACAU UCAAGGAAGACAUCACAGAAAGGCACAGGUACAGCGGACAGGGAGACAGCCU GCACGAAACACAUCGCAAAACUUGGCAGGAAGCCCGCAAUCAAAGAAAGGA AUCCUGCAGACAGUCAAGGUCCUGCAGACGAAACUGGUCAAGGUCAUGGGAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 3 9】

	GACACAAAGCCGGGAAAAACAUCGUCACUCCGAAAAUUGGCAAAGAGAAAAACCAGAC AACACAGAAAGGGACAGAAAGAACAGCAGCAGAGAAAGAAUUGAAGAGAAUUCGAA GAAGGAAUACAAGGAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGAAACACCCGGUCG AAAAACACAGCUCGAGAACGAAAGCCUGUACCCUGUACUACCCUGCAGAA CGGAAGAGACAUUAGGUCGACCGAGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCC GACUACGAGCUCGACCGCAAUCCGUCGCCGACAGACUCCUGAAGGACGACA GCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAAGCGACAAAGAACAGAGGAAAGAG CGACAACGUCCCCGAGCGAAGAAAGUCGUCACAGAAAGAAUGAAGAACUACUGG AGACAGCUCUGAACCGCAAGCGUGAUCACACAGACAGAAAGUUCGACAAAC UGACAAGGCGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUUGGACAAAGGACAGGAUU CAUCAAGAGACAGCUCGUGCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGCA CAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAAACACAAAGUACGACGAAAAACGACAAGC UGAUCAGAGAAAGUCAAGGUCAUCACAUCUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGA CUUCAGAAAGGACUUCACAGUUCUACAGGUACAGGAAUACAACUAC CACCAAGCACACGACGCAUACUCCUGAAACGAGUCCUGGAAACAGCACUGA UCAAGAAUACCCGAAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUACCGGAGACUACAA GGUCUACGACGUCAGAAAGAUAGUACGCAAAAGAGCGAACAGGAAAUCCGA AAGGCAACAGCAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAAAUUCUUC AGACAGAAAUCAACUGGCAAACGGAGAAAUCAAGAAAGAGACCGUGAU CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCCGUCUGGGACAAAGGAAAGAGAC UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUCCCGCAGGUCAACAUCGUCA AGAACAGAGAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAGCAUCCUGCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCUGAUCCGCAAGAAAGAAAGGACUGGGACCCG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 4 0】

	AAGAAUAACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCCGCAUACAGCGUCCUUGG UCGUCGCAAAAGGUUCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAAGCUUAGAAAGCGUCAA GAAACUGCCUGGGAUUCACAAUCAUUGGAAGAAAGCAGCUUCGAAAAGAAC CCGAUCCGACUUCUGGAAGCAAAAGGGAUACAAAGAAAGUCAAAGAGGACC UGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUGCAACUGGAAAACGGAAAG AAAGAAUUCUGGCAAGCCAGGAGAACUGCAGAAAGGAAACGAAACUG GCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUUGUACUGGCAAGCCACUACG AAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGAACAGAAAGCAGCUUUCGU CGAACAGCACAAAGCACUACCCUGGACGAAAUCAUCCGAACAGAUACGGAA UUCAGCAAGAGAGUACAUCUUGGAGAGCGCAACCCUGGACAAGGUCCUGA GGCAUACAAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUACAGAGAACAGGCGAGAAA CAUCAUCCACCUGUUACACUGACAAACCCUGGGAGCACCCGCGACAUUC AAGUACUUCCGACACAAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAAGCACAAAGG AAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACAGAGCAUACAGGACUGUACGA AACAAGAUCCGACCUAGGCCAGCCUGGGAGGAGACGGAAAGCCCG AAGAAAGAGAGAAAGGUCCGACCGGAAGCCCGAAGAAAGAGAAAGGUUG ACAGCGGA	2 3 1
T 77 プロモーター	TAATACGACTCACTATA	2 3 2
ヒト β-グロブリン 5' UTR	ACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGCAACCTCAAAACAGACAC C	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 4 1】

ヒトベータ-グロビン 3' UTR	GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAAATTTCATATTAAGGTTCCCTTTGTTCCTA AGTCCAACTACTAAACTGGGGATATTAAGAGGCTTGAGCATCTGG ATTCTGCCCTAATAAACAATTATTTTCATTGC	23 3
ヒトアルファ-グロビン 5' UTR	CATAAACCCCTGGCGGCTCGCGGCCCGGCACTCTTCTGGTCCCCACAGA CTCAGAGAGAACCCACC	23 4
ヒトアルファ-グロビン 3' UTR	GCTGGAGCCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTTGGGCCCTCCCCCAGC CCCTCCTCCCTTCTCTGCACCCGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTC TGAGTGGGGGC	23 5
Xenopus laevis ベータ-グロビン 5' UTR	AAGCTCAGAAATAAACGCTCAACTTTGGCC	23 6
Xenopus laevis ベータ-グロビン 3' UTR	ACCAAGCCTCAAGAACACCCGAAATGGAGTCTCTAAGCTACATAATACCAA CTTACACTTTACAAAAATGTTGTCCCCCAAAATGTAGCCATTCTG CTCCTAAATAAAAGAAAGTTTCTTCACATTCT	23 7
ウシ成長ホルモン 5' UTR	CAGGGTCCCTGTGGACAGCTCACCAGCT	23 8
ウシ成長ホルモン 3' UTR	TGCCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCCCTCCCCGTGCCCTTCCCTTGACCCCTG GAAGGTGCCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCAT CGCA	23 9

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 4 2】

Mus mus culusヘモ グロビンアルブ ア、成人鎖1 (Hb a-a 1)、3' UT R	GCTGCCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTCTGGCCCATGCCCTTCTTCTCTCCCT TGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAG	24 0
IIISD17B4 5' UTR	TCCCGCAGTCGGGGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTTGTGTGTCGTTG CAGGCCCTATTC	24 1
TTRを標的と するG282が イ/FRNA	mU*mU*mA*CAGCCACGGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGCUAGUCCGUUAUCAAcmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	24 2

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 4 3】

HSDの5' U	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTCG	24
TR、配列番号	TTGCAGGCCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGATCAGCATCG	3
4に対応するO	GACTGGACATCGGAACAACAGCGTCGGATGGCAGTCATCACAGACGA	
RF、Kozak	ATACAAGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAAGTCTCTGGAAACAACAGACGA	
k配列、および	CACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGGAG	
ALBの3' U	AAACAGCAGAAAGCAACAAAGACTGAAGAGAAACAGCAAGAAAGATACAC	
TRを有するC	AAGAAAGAAAGAACAGAAATCTGCTACCTGCAGGAAAATCTTCAGCAACGAA	
as9転写産物	ATGGCAAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAAGCTTCC	
	TGGTCGAAGAGACAAAGAAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCCGAAACAT	
	CGTCGACGAAGTGGCATACCAAGAAAGTACCCGACAAATCTACCACTG	
	AGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGACAGACCTGAGACTGATCT	
	ACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCCTGATCGA	
	AGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAG	
	CTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAAACCCGATCAACGCCAA	
	GGGAGTCGACGGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGACGACG	
	AAGACTGGAAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAAGACGA	
	CTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCCGAACTTCA	
	AGAGCAACTTCGAACTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGA	
	CACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGATCGGAGACCCAG	
	TACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAGAACTTGAGCGACGCAATCTCTGC	
	TGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCAACCGCTGAG	
	CCCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCAACAGGACCTGACACTG	
	CTGAAGGCCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAGAAAGTACAAAGCAAAATCT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 4 4】

TCTTCGACCAGAGCAAGAAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGC AAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCTACAAGCCGATCCTGGAAAAGATG GACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGA GAAAGCAAGAAACATTCGACAAAGGAAGCATCCCGCACCAAGATCCACCT GGAGAACTGCACGCCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTG CTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCC CGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCCATGGAT GACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAAATCACACCGTGGAACTTCGAAAGAACTC GTCGACAAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAATGACAAACT TCGACAAAGAACCTGCCGAAGCAAAAGGTCTGCCGAAGCACAGCCCTGCT GTACGAAATACCTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAAGTCAAGTACCTC ACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGAGG CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAAGACAAACAGAAAGGTCAACAGTCAAGCA GCTGAAGGAAGACTACTTCAAAGAAAGATCGAAATGCTTCGACAGCGTCGAA ATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACCGCAAGCCTGGAAACATACCAAG ACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAAGAAA CGAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGTTTCGAAGAC AGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACG ACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAAAGATACACAGGATGGGGAAG ACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAG ACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGGACGGATTGGCAACAGAAACTTCA TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCCTGACATTCAAAGGAAGACATCCAGAA GGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCCTGCACGAACACATCGCAAAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 4 5】

CTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGG TCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACACAAGCCGGAAAAACAT CGTCATCGAATATGGCAAGAGAAACAGACAAACAGAAAGGACAGAAAG AACAGCAGAGAAAGAAATGAAAGAAATCGAAGAAAGGAATCAAGGAATCTGG GAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACACAGCTGCAGAA CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACCGAAGAGAGACATGTACGTC GACCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACA TCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAAGGACGACAGCATCGACAAACAAAGTCCCT GACAAAGAACGCAACAAAGAACAGAGGAAGAGCGACAAAGTCCCGAGCGAA GAAGTCGTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAA AGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCGACAACTCACAAGCCAGACAGACAGG AGGACTGAGCGAACTGGACAAAGGACAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTC GAAACAAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCAACAGATCCTGGACACAGAA TGAAACACAAAGTACGACGAAACAGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGT CATCACACTGAAGACCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAAGGACTTCCAG TTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACACCAACCAAGCACACGACCGCAT ACCTGAACGCACTCGTCGGAAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCGAAAGCT GGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAAGGTCTACGACGTCAGAAAG ATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAGGCAACAGCAAAAGTACT TCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGC AAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGAGACTTCGCAACACAGTCAGAAAGG TCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 4 6】

	AGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACACAGCGACAAAG CTGATCGCAAGAAAGAGGACTGGGACCCGAAAGTAGCGGAGGATTCCG ACAGCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAA GGAAAGAGCAGAGCTGAAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGAAATCACA ATCATGGAAAGAGCAGCTTCGAAAGAAACCCGATCGACTTCCTGGAAAG CAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA GTACAGCCTGTTCTGAACCTGGAACCGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGC GCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACG TCAACTTCCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAGCTGAAGGGAAGCCC GGAAGACAACGAACAGAAAGCAGCTGTTCTCGAACAGCACAGCACTAC CTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGATCATCC TGGCAGACGCAAAACCTGGACAAAGTCCCTGAGCGCATACAAACAAAGCACAG AGACAAAGCCGATCAGAGAAACAGGCAGAAACATCATCCACCTGTTCAACA CTGACAAACCTGGGAGCACCCGCCAGCATTCAAAGTACTTCGACACAAACAA TCGACAGAAAGAGATACACAGCACAAAGGAAGTCCCTGGACCGCAACACT GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAAGAAATCCACCTGAGC CAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAAGAAAGAAAGGTCT AGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCCTACCATGAGAAATAAGAG AAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTTCATCTCTTTTCTTTTCTGTTG GTGTAAGCCAAACACCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTT TGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGA
	G

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 4 7】

HSDの5' U TR、配列番号 4に対応するO RF、およびA LHの3' UT Rを有するC a s 9転写産物	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTCTCG TTGCAGGCCCTTATTCGGATCCATGGACAAGAGTACAGCATCGGACTGG ACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAA GGTCCCGAGCAAGAAAGTTCAAGTCCCTGGGAACACAGACACAGACAGC ATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCCAGACGGAGAAACAG CAGAAACAACAAAGACTGAAGAGAAACAGCAAGAGAGATACACAAAGAG AAAGAACAGAAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCA AAGTCCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGCTCG AAGAAACAAAGAAAGCAAGAAAGCAACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGA CGAAGTCGCATACCAACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAG AAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGG CACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTGTATCGAAGGAGA CCTGAACCCGGACAAACAGCGACGTGACAAAGCTGTTCATCCAGCTGGTC CAGACATACAAACCAAGCTGTTCCGAAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAG TCGACGCCAAAGGCAATCCTGAGCCCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACT GGAACACCTGATCCACAGCTGCCGGGAGAAAGAAAGACGGACTGTTTC GGAACACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGGAACCTCAAGAGCA ACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATA CGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCA GACCTGTTCTCCGGCAGCAAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCG ACA'TCCTGAGAGTCAACACAGAAA'TCACAAGGCAACCGCTGAGCGCAAG CATGATCAAGAGATACGACGAAACACACACAGGACCTGACACTGCTGAAG GCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCCGAAAAGTACAAAGGAAATCTTCTTCG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 4 8】

ACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCA GGAAGAAATTCACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGA ACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGC AGAGAACATTCGACAAACGGAAAGCATCCCGCAACAGATCCACCTGGGAGA ACTGCACGGCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAG GACAAACAGAGAAAAAGATCGAAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACT ACGTGGGACCCGCTGGCAAGAGAGAAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAAG AAAGAGCGAAGAAACAAATCAACCCGTGGAACTTCGAAAGAAAGTCGTGCAAC AAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCTATCGAAAGAAATGACAACTTCTCGACA AGAACCTGCCGAACGAAAGGTCTCTCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGA ATACTTCACAGTCTACAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTACACAGAA GGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGCAATCG TCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTACACAGTCAAGCAGCTGAA GGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGC GGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCAAGACCTGC TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAAAGAAAGAAACGAAAGA CATCCTGGAAGACATCGTCTGTGACACTGACACTGTTCGAAAGACAGAGAA ATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGG TCATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAG CAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATC CTGGACTTCTGAAGAGCGAGCGGATTCCGCAACAGAAACTTCATGACAGC TGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACA GGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAACACATCGCAAACTGGCA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 4 9】

GGAAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCTG ACGAATCTGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAAGCCGGAATAACATCGTCAAT CGAATTGGCAAGAGAAACCAAGACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGC AGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAAGGAATCAAGGAATCTGGGAAGCC AGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAACACACAGCTGCAGAACGAAAA GCTGTACCTGTACTACCTGCAGAAACGGAAGAGAGACATGTACGTCCGACCAAG GAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCCGACCAATCGTCC CGCAGAGCTTCTGTGAAGACGACAGCATCGACAAACAAAGTCCCTGACAAAG AAGGACAAAGAACAGAGGAAGAGCGGACAACTCCCGAGCGAAGAAAGTCTC GTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAGCTGA TCACACAGAGAAAGTTCCACAACTGACAAAGGCAGAGAGAGAGGAGCT GAGCGAATCTGGACAAAGGCAGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAATAACA AGACAGATCACAAAGCACTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACA CAAAGTACGACGAAACCGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCAC ACTGAAGAGCAAGCTGGTCCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTAC AAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCAACCGCACACGACGCAATACCTGA ACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCGAAAGCTGGAAAG CGAATTCGTCTACGGAGACTACAAAGTCTACGACGTCAGAAAGATGATC GCAAAGAGCGAACAAGGAATTCGGAAAGGCACAAAGCAAAAGTACTTCTCT ACAGCAACATCATGAATCTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAAACGG AGAAATCAGAAAGAGACCCGCTGATCGAAACAAACCGAGAAACAGGAGAA ATCGTCTGGGACAAAGGAAGAGACTTCGCCAACAGTCAGAAAGTCCCTGA GCA TGCCCGCAGGTCACCATCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGG	

10

20

30

40

50

ATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAAGAGAAACACAGCGACAAGCTGATC GCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAAGATACGGAGGATTTCGACAGCC CGACAGTCGCATTACAGCGTCTCTGGTCGTGCGAAGAGTCCGAAAAGGGAAA GAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATG GAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAAAG GATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAATACAG CCTGTTCGAACTGGAACCGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGA GAACTCGAGAAAGGAAACGAACCTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACT TCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCCGGAAGA CAAGCAAGAAAGCAGCTGTTCTGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGAC GAAATCATCGAACACAGATCAGCGAAATTACGCAAGAGAGTCAATCCTGGCAG ACGCAAACTTGGACAAAGTCTCTGAGCGCATACAAACAAAGCACAGAGACAA GCCGATCAGAGAAACAGGCAGAAAACATCATCCACCCTGTTCCACACTGACA AACCTGGGAGCACCGGCAGCATTC AAGTACTTCGACACAAACAAATCGACA GAAAGAGATACACAAAGCACAAAGGAAGTCTCTGACCGCAACACTGATCCA CCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTG GGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAAGAAAGAGAAAGGTCTAGCTAG CCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAGAAAGAA AATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTCTTTTCTTTAATCATTTTGCCTC AGCCAAACACCCCTGTCTAAAAAAACATAAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTC TTTTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAATGGAAGAACCTCGAC

50

【表 4 3 - 1 5 1】

2 f	3 ~	4 f	9
未使用			

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 5 2】

スプライス接合部を除いたC a s 9 OR F、1 2. 7 5%のU含有量	ATGGACAAAGTAACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCG GATGGGCAGTCAATCACAGACGAATACAAAGTCCCGAGCAAGAGTTCAA GGTCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAACCTGTATCGGA GCACCTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAGACTGAAGA GAACAGCAAGAAAGATACACAAGAAAGAAAGCAACAGAAATCTGCTACCT GCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCCGACGACAGCTTCTTC CACcgCTGGAAAGAAAGCTTCTCTGGTCGAAAGAAAGCAAGACAGAAA GACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAAGTCGCATACCAAGAAAA GTACCCGACAAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGAC AAGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCTGTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACGGA CGTCGACAAAGCTGTTCTATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACCAAGCTGTC GAAGAAACCCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGA GGCAAGACTGAGCAAGCAGAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCT GCCGGAGAAAGAAAGAAACGGAATGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGC CTGGGACTGACACCCGAACCTTCAAGAGCAACATTCGACCTGGCAGAAAGACG CAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGACGACCTGTTCCTGGCAGCAAG AACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAG AAATCACAAAGGCAACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGA ACACCAACGAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTG CCGGAAAAGTACAAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGCAACCGATACG CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATCTACAAAGTTCAT	2 5 0

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 5 3】

CAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGGAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAG CTGAACACAGAGAAAGACCTGTCTGAGAAAAGCAGAGAAACATTCTGACAAACGGAA GCATCCCCGCACAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAACTCTGAGAAAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAA AAGATCCTGACATTACAGATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAAGAGCCGAAACAAATCAC ACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGC TTCATCGAAAAGAAATGACAAAACCTTCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAAAGG TCCTGCCGAAGCACAGCCCTGCTGTACGAAATACCTCACAGTCTACAAAGCA ACTGACAAAGGTCAAAGTACGTCACAGAAAGGAAATGAGAAAACCCGGCAATC CTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAA ACAGAAAAGTCAACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGAT CGAATGCTTCGACACAGCTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAC GCAAGCCTGGGAACATACACGACCTGCTGAAAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCCTGGACAAACGAAAGAAAACGAAAGACATCCTGAAAGACATCGTCCCT GACACTGACACTGTTCTGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAG ACATACGCACACCTGTTCTGACGACAAAGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA GAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGGAAT CAGAGACAAAGCAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCTGAAAGAGCGAC GGATTCTGCAAAACAGAAACTTCAATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCCTGA CATTCAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAGCCGACAGGGAGACAG CCTGCACGGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAG GGAACTCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAGGTCAATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 5 4】

	GAA GAC A C A A A G C C G G A A A A A C A T C G T C A T C G A A A T G G C A A G A G A A A A C C A G A C A A C A C A G A A G G G A C A G A A G A A C A G C A G A G A A A G A A T G A A G A G A A T C G A A G A A G G A A T C A A G G A A C T G G G A A G C C A G A T C C T G A A G G A A C A C C C G G T C G A A A A C A C A C A G C T G C A G A A C G A A A G C T G T A C C T G T A C C T G C A A A C G G A A G A G A C A T G T A C G T C G A C C A G G A A C T G A C A T C A A C A G A C T G A G C G A C T A C G A C G T C G A C C A C A T C G T C C C G C A G A C T T C C T G A A G G A C G A C A G C A T C G A C A A A A G G T C C T G A C A A A G A A G C G A C A A G A A C A G A G A A A G A G C G A C A A C G T C C C G A G C G A A G A A G T C G T C A A G A A G A T G A A G A A C T A C T G G A G A C A G C T G C T G A A G C C A A A G C T G A T C A C A C A G A A A G T T C G A C A A C C T G A C A A A G G C A G A G A G A G A G A C T G A C G A A C T G G A C A A G G C A G G A T T C A T C A A G A G A C A G C T G G T C G A A A C A A G A C A G A T C A C A A A G C A C G T C G C A C A G A T C C T G G A C A G C A G A A T G A A C A C A A A G T A C G A C G A A A A C G A C A A G C T G A T C A G A G A A G T C A A G G T C A T C A C A C T G A A G A G C A A G C T G G T C A G C G A C T T C A G A A A G G A C T T C C A G T T C T A C A A G G T C A G A G A A A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C A C A G A C G C A T A C C T G A A C G C A G T C G T C G G A A C A C A C A C T G A T C A A G A A G T A C C C G A A G C T G C A A A G C G A A T T C G T C T A C G G A C A C T A C A A G G T C T A C G A C G T C A G A A A G A T G A T C G C A A A G A G C G A A C A G G A A A T C G G A A A G G C A A C A G C A A A G T A C T T C T T A C A G C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C A G A A A T C A C A C T G G C A A A C G G A G A A A T C A G A A A G A G A C C G C T G A T C G A A A C A A A C G G A G A A A C A G G A G A A A T C G T C T G G G A C A A G G G A A G A G A C T T C G C A A C A G T C A G A A A G G T C C T G A G C A T G C C G C A G G T C A A C A T C G T C A A G A A G A C A G A A G T C C A G A C A G G A G G A T T C A G C A A G G A A G C A T C C T G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C T G A T C G C A A G A A A G A A G G A C T G G G A C

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 5 5】

CCGAAAGAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCCGATACAGCGGTCC TGGTCGTCCGCAAAAGGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAGCTGAAAGAGCGGT CAAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAAAG AACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAAGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAAC TGGAACACGG AAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAA CTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACT ACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAAGCAAGCAAGCAGCTGTT CGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGC GAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGGCAACCTGGACAAGGTCC TGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGA AAACATCATCCACCCTGTTCACTACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCA TTCAAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAA AGGAAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTA CGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC CCGAAAGAGAGAGAAAGGTCTAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 5 7】

TCTTCGACCAAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGAGC AAGCCAGGAAGAAATTCTACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAAGATG GACGGAAACAGAAAGAACTGCTGCTAAGCTGAACAGAGAAAGCCTGCTGA GAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAAAGCATCCCGCACAGATCCACCT GGGAGAACTGCACCCAAATCCTGACAAGACAGAGAACTTCTACCCGTTT CTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCC CGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAAACAGCAGATTCGCATGGAT GACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAAATCACACCGTGGAACTTCGAAAGAAATC GTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAATGACAAACT TCGACAAGAAACCTGCCGAACGAAAAGGTCTCTGCCGAAGCACAGCCCTGCT GTACGAAATACTTCACAGTCTACAAACGAACTGACAAAGGTCAAAGTACGTC ACAGAAAGGAAATGAGAAAGCCCGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAG CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAACAGTCAAGCA GCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAAATGCTTCGACAGCGTCGAA ATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACAATACCACG ACCTGCTGAAAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAAAGAAA CGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTCGAAGAC AGAGAAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACG ACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGATACACAGGATGGGGAAAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAAGCAGCGGAAAG ACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAACTTCA TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAGGAAGACATCCAGAA GGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAACATCGCAAAAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 5 8】

CTGGCAGGAAGCCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAAGG TCGTGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAAGCCGGAAAAACAT CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAAACAGAAAGGACAGAAAG AACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACCTGG GAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAA CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAAAACGGAAAGAGACATGTACCTC GACCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCCACA TCGTCCCCGACAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAAGGTCCT GACAAGAAGCGACAAAGAACAGAGGAAGAAGCGGACAAAGTCCCCGAGCGAA GAAGTCGTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAA AGCTGATCACACAGAGAAAAGTTGGACAAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGG AGGACTGAGCGAACTGGACAAAGGCAGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTC GAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAA TGAACACAAAGTACGACGAAACGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGT CATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAAGGACTTCCAG TTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCAAGCACACGACCGCAT ACCTGAACGCCAGTCGTCGGAAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCT GGAAGCGGAAATTCGTCTACGGAGACTACAAAGGTCTACGACGTCAGAAAG ATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAATTCGGAAAGGCACAGCAAGTACT TCCTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCAACACTGGC AAACGGAGAAATCAGAAAAGAGACCCGCTGATCGAAACAAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGAGACTTCGCCAACAGTCAGAAAGG TCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 5 9】

AGGAGGATTTCAGCAGGAGGAAAAGCATCCTGCCGAAAGAGAAAACAGCGACAAAG CTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAAGAAAGTACGGAGGATTTCG ACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCCAAAGGTCGAAAA GGAAAGAGCAGAAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACA ATCATGGAAAGAACAGCCTTCGAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAAG CAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA GTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGC GCAGGAGAACTGCAGAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACG TCAACTTCCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCC GGAAGACAACGAACAGAAAGCAGCTGTTGCTCGAAACAGCACAAAGCACTAC CTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAAATTCAGCAAGAGATCATCC TGGCAGACGCAAAACCTGGACAAAGTCTCTGAGCGCATACAAACAAAGCACAG AGACAAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCCTGTTCA CTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAGTACTTCGACACAAACAA TCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAAAGGAAGTCTCTGGACGCAACACT GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAAGATCGACCTGAGC CAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAGCCCGAAGAAAGAGAAAGGTCT AGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAG AAAGAAAATGAAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTCTTTTCTCGTTG GTGTAAGCCAAACACCCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTT TGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAGAACCTCGA	G

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 6 0】

一般的にヒトで 頻繁に使用され る最小ウリジン コドンを示す C a s 9 OR F、1 2、7 5%のU含有量	2 5
	2
ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCCTGGACATCGGCACCCAAACAGCGTGG GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCCAGCAAGAAAGTTCAA GGTGCTGGGCAACACCGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACTGATCGGC GCCCTGCTGTTGGAACAGGGCGAGACCGCGAGGCCACCAAGACTGAAGA GAACCGCCAGAAAGATACACCAAGAAAGAAAGAAATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGGTGGACGACGCTTCTTC CACAGACTGGAGGAGAGCTTCTGTTGGAGGAGGACAAAGAACACGAGA GACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGCCCTACCAAGAGAA GTACCCCACTCTACCACTGAGAAAGAGCTGGTGGACAGACCCGAC AAGGCCGACCTGAGACTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAAGT TCAGAGGCCACTTCTGATCGAGGGGACCTGAACCCCGACAAACAGCGA CGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTTT GAGGAGAACCCATCAACGCCAGCGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGA GCGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAGAACCTGATCGCCAGCT GCCCGCGAGAAAGAAACGGCCCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGAGC CTGGGCCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG CCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGCGCCCAAG AACCTGAGCGACGCCATCTGCTGAGCGACATCTGAGAGTGAAACACCG AGATCACCAAGGCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGAGATACGACGA GCACCAACAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGACACAGCAGCTG CCCGAGAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGCAAGAACGGCTAGG CCGGCTACATCGACCGCGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTTCA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 6 1】

CAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCCGAGGAGCTGCTGGTGAAG CTGAACAGAGAGGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACTTCGACAAACGGCA GCATCCCCACCAAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAAG ACAGGAGGACCTTCTACCCCTTCTGAAAGGACAAACAGAGAAAGATCGAG AAGATCCTGACCTTCAGAAATCCCTACTACCTGGGCCCCCTGGCCAGAG GCAACAGCAGATTCCGCTGGATGACCAAGAAAGAGCCGAGAGACCATCAC CCCCTGGAACCTCGAGGAGGTGGTGGACAAAGGCGCCAGGCCAGAGC TTCATCGAGAGAAATGACCACTTCGACAAAGAACCTGCCCAAACGAGAAAG TGCTGCCCAAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCGTGTACAAACGA GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGCCATGAGAAAGCCGCCCTTC CTGAGCGGCGAGCAGAAAGAGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCA ACAGAAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGAT CGAGTGCTTCGACACGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATTCAAC GCCAGCCTGGGCACCTACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCCTGGACAAACGAGGAGAACGAGACATCCTGAGGACATCGTGCT GACCTGACCCCTGTTCCAGGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAG ACCTACGCCCACTGTTGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAA GAAGATACACCGGCTGGGCGAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACCGGCAT CAGAGACAAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAGAGCGAC GGCTTCGCCAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG CCTGCACGAGACATCGCCAAACCTGGCCGGCAGCCCGCCATCAAGAAAG GGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 6 2】

	GCAGACACAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAGAACCA GACCACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACAGCAGAGAGAGAAATGAAGAGAAATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCTCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACTCTGCA GAACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAAGGAGCTGGACATCAACAGACTG AGGACTACGACCTGGACCAACATCGTGCCCCAGAGCTTCCCTGAAGGACG ACAGCATCGACAAACAAGGTGCTGACCAAGAAGCGACAAAGAACAGAGGCAA GAGCGACAAACGTGCCCAAGCAGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAAGAACTAC TGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGAGAAAGTTGACACA ACCTGACCAAGGCCGAGAGAGAGCGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAAGCCCG CTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAGACCAAGACAGATCACCAAGCACGTG GCCAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACA AGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAG CGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAGATCAACCAAC TACCACCAAGCCCAAGACCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGCCACCCGCC TGATCAAGAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCCGTGTACGGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAAGAGCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGACCGCGGAGATCGTGTGGGACAAAGGCGAGA GACTTCGCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCT GCCCAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCCAGAAAGAGACTGGGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 6 3】

	CCCAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGC TGGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAAGAGCGT GAAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGTGAGAGAAAGCAGCTTCGAGAAAG AACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCCAAGTACAGCCCTGTTCCAGCTGGAGAACGG CAGAAAGAGAAATGCTGGCCAGCGCCGGGAGCTGCAGAAAGGCCAAGGAG CTGGCCCTGCCCAAGCAAGTACGTGAACCTTCCCTGTACCTGGCCAGCCACT ACGAGAAAGCTGAAGGCCAGCCCCGAGGACAAACGAGCAGAAAGCAGCTGTT CGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGAGAGTGTATCCTGGCCGACGGCCAACTGGACAAAGTGC TGAGCGGCTACAACAAGCACAGAGACAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGA GAAACATCATCCACCCTGTTCAACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCGCC TTCAAAGTACTTCGACACCCACCATCGACAGAAAGAGATACACCAGCACCA AGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAAGAGCATCACCGGCCCTGTA CGAGACCAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGGCAGC CCCAGAAGAGAGAAAGGTGTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 6 4】

HSDの5' U TR、配列番号 5 2に対応する ORF、Koz ak配列、およ びALBの3' UTRを有する Cas 9転写産 物	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCG TTGCAGGCCCTTATTTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCG GCGTGGACATCGGCACCCACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCAGCGA GTACAAAGGTGCCACGACAGAAAGTTCAAGGTGCTGGGCCAACACCGACAGA CACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGGGCCCTGCTGTTCCGACAGCGGGG AGACCCCGAGGCCACAGACTGAGAGAAACCGCAGAAAGATACAC CAGAAAGAAAGAACAGAACTCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAG ATGGCCAAAGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGGAGGCTTCC TGGTGGAGGAGGACAAAGAACGACAGAGACACCCCATCTTCGGCAACAT CGTGACGAGGTGGCTTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACTG AGAAAGAAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAAGCCGACCTGAGACTGATCT ACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCAGAGGCCACTTCCTGATCGA GGCGACCTGAACCCCGACAAACAGCGACGTGGACAAAGCTGTCTATCCAG CTGGTGACAGACCTACAAACAGCTGTTCCGAGGAGAACCCCATCAACGCCA GCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCCCGACACTGAGCAAGACAG AAGACTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAGAAAGGCC CTGTTGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCCTGACCCCACTTCA AGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGA CACCTACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCCCATGCGGCGACCCAG TAGCCGACCTGTTCTCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGC TGAGCGACATCCTGAGAGTGAAACACCGAGATCAACAAAGGCCCTGAG CGCCAGCATGATCAAGAGATACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCCTG CTGAAGGCCCTGGTGAGACAGCAGCTGCCCGAGAAAGTACAAAGGATCT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 6 5】

TCTTCGACCAAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGGC CAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCAATCAAGCCCATCCTGGAGAAAGATG GACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGA GAAAGCAAGAAACCTTCGACAAAGGCAAGCATCCCCCAACAGATCCACCT GGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTC CTGAAGGACAAACAGAGAGAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAAATCC CCTACTAGTGGCCCCCTGGCCAGAGGCAACAGCAGATTGCGCTGGAT GACCAAGAAAGACGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAGGTG GTGGACAAAGGGGCCAGCGCCCAAGACTTCATCGAGAGAAATGACCAACT TCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGTGCTGCCCAAGCACAGCTGCT GTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACCTG ACCGAGGGCATGAGAAAGCCCGCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAAGAGG CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAAAGCA GCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAG ATCAGCGCGCTGGAGGACAGATTCAACGCCAGCCTGGCCACCTACCAAG ACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCTGGACAAACGAGGAGAA CGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCTGACCTGTTTCGAGGAC AGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTACGCCCACTGTTCGACG ACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAGATACACCGCTGGGGCAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGCATCAGAGACAAAGCAGAGCGGCAAG ACCATCCTGGACTTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCCAACAGAACTTCA TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAA GGCCCAAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 6 6】

CTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCCGTGAAGG TGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCAGACACAAAGCCCGAGAACAAT CGTGATCGAGATGGCCAGAGAGAACCCAGACCACCCAGAAAGGCCAGAAAG AACAGCAGAGAGAGAAATGAAGAGAAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGG GCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCCAGAA CGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCCAGAACGGCAGAGACATGTACGTG GACCAGGAGCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACACACA TCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAAGGTGCT GACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGCGGACAACTGCCCCAGCGAG GAGGTGGTGAAGAAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAAGGCCA AGCTGATCAACCCAGAGAGAAAGTTCCGACAACTGACCAAGGCCGAGAGAGG CGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTG GAGACCAGACAGATCACCAAGCACGTGGCCCCAGATCCTGGACAGCCAGAA TGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGT GATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAAGGACATTCAGAAAGGACTTCCAG TTCTACAAGGTGAGAGAGATCAACAACACTACCACCCAGCCCAAGGCCCT ACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCT GGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGAGAAAG ATGATCGCCAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAGAGCCACCGCCAAAGTACT TCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGC CAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACC GGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCAGAGACTTCGCCACCGTGAGAAAGG TGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACAATCGTGAAGAAAGACCGAGGTGCAGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 6 7】

CGGCGGCTTCAGCAAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGAGAAAACAGCGACAAAG CTGATCGCCAGAAAAGAAAGGACTGGGACCCCAAGAAAGTACGGCGGCTTCG ACAGCCCAACCGTGGCTACAGCGTGCTGGTGGCCAAAGGTGGAGAA GGCAAAGAGCAAAGAAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACC ATCATGGAGAGAAAGCAGCTTCGAGAAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGG CCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA GTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGAGAAATGCTGGCCAGC GCCGGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACG TGAACCTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAAGCTGAAGGGCAGCCC CGAGGACAAACGAGCAGAAAGCAGCTGTTCTGGAGCAGCACAAGCACTAC CTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAAGCAAGAGAGTGATCC TGGCCGACGCCAACCTGGACAAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAAGCACAG AGACAAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCCTGTTCCACC CTGACCAACCTGGGGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCCACCA TCGACAGAAAGAGATACACAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCCT GATCCACCAAGAGCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCAGAAATCGACCTGAGC CAGCTGGGCGGCGACGGCGGGCGGCGAGCCCCAAGAAAGAAAGAGTGT GACTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAG AAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTCTTTTCTGTTG GTGTAAAAGCCAAACCCCTGTCTAAAACATAAAATTTCTTTAATCATTT TGCCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGA	G

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 6 8】

一般的にヒトで ほとんど使用さ れない最小ウリ ジンコドンを含む C a s 9 ORF、1 2、 7 5 %のU含有 量	2 5 4
	ATGGACAAAAATACAGCATAGGGCTAGACATAGGGACGAAACAGCGTAG GGTGGCGGTAAATAACGGACGAATACAAAGTACCGAGCAAAAATTCAA AGTACTAGGGAAACAGGACCGACACAGCATAAAAAACCCTAATAGGG GCGCTACTATTTCGACAGCGGGGAAACCGGGAAAGCGACGCGACTAAAAAC GAACGGCGGACGACGATACACCGGACGAAACCGAATAATGCTACCT ACAAGAAATATTGAGCAACGAAATGGCGAAAGTAGACGACGCTTCTTC CACCGACTAGAAAGAAAGCTTCTCTAGTAGAAGAAAGACAAAAACACGAAAC GACACCCGATATTTCGGGAACATAGTAGACGAAGTAGCGTACCACGAAAA ATACCCGACGATATACCACCTACGAAAAAATACTAGTAGACAGCACGGAC AAAGCGGACCTAGGACTAATATACCTAGCGCTAGCGCACATGATAAAAT TCGAGGGCACTTCCCTAATAGAAAGGGACCTAAACCCGGACAAACGCGA CGTAGACAAAACCTATTCTATACAACTAGTACAAACGTACAAACCACTATTTC GAAGAAAAACCCGATAAACGGGAGCGGGGTAGACGGGAAAGCGATACATA GCGGCGACTAAGCAAAAGCGGACGACTAGAAAACTAATAGCGCAACT ACCGGGGAAAAAAACCGGGCTATTTCGGGAACCTAATAGCGCTAAGC CTAGGGCTAACGGCGAACTTCAAAAGCAACTTCGACCTAGCGGAAAGACG CGAAACTACAACTAAGCAAAAGACACGTAACGACGACGACCTAGACAACT ACTAGCGCAATAGGGGACCAATACGCGGACCTATTCTAGCGGGGAAA AACCTAAGCGACGGATACTACTAAGCGACATACTACGAGTAAACACGG AAATTAACGAAGCGCGCTAAGCGGAGCATGATAAAACGATACGACGA ACACCAACCAAGACCTAACGGCTACTAAAAGCGCTAGTAGACAAACAACTA CCGGAAAAATACAAAGAAATATTCTTCGACCAAGCAAAAAACGGGTACG CGGGGTACATAGACGGGGGGCGAGCCAAAGAAATTTCTACAAATTCTAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 6 9】

AAAAACCGATAC TAGAAAAAAATGGACGGGACGGAAAGAACTACTAGTAAAA CTAAACCGAGAAAGACCTACTACGAAAAACAACGAAACGTTTCGACAAACGGGA GCATACCGCACCAAAATACACCTAGGGGAACTACACGCGATACTACGACG ACAAAGAGACTTCTACCCGTTCTCTAAAGACAAACCGAGAAAAATAGAA AAAACTACTAACGTTCCGAATACCGTACTACGTAGGCGCTAGCGCGAG GGAACAGCCGATTCCGCTGGATGACGCGGAAAAAGCGAAGAAACGATAAC GCCGTGGAACCTCGAAGAAAGTAGTAGACAAAGGGCGGAGCGCGCAAAAGC TTCATAGAACGAATGACGAACCTTCGACAAAAACCTACCGAACGAAAAAG TACTACCGA AACACAGCCTACTATACGAATCTTCAAGGTATACAAACGA ACTAACGAAAGTAAAAATACGTAAACGGAAGGATCGGAAAAACCGCGCTC CTAAGCGGGGAACAAAAAAAGCGATAGTAGACCTACTATTCAAAACGA ACCGAAAAAGTAACGGTAAAAACAACATAAAGAAAGACTACTTCAAAAAAAT AGAA TGCTTCGACAGCGTAGAAATAGCGGGGTAGAAAGACCGATTCAAC GCGAGCCTAGGGACGTACCACGACCTACTAAAAATTAATAAAGACAAAG ACTTCCTAGACAAACGAAGAAAAACGAAGACATAGTAAGACATAGTACT AACGCTAACGCTATTTCGAAGACCGAGAAA TGATAGAGAACGACTAAAA ACGTACGGCGACCTATTTCGACGACAAAGTAATGAAACAACTAAAAACGAC GACGATACACGGGTGGGGCGACTAAGCCGAAAACTAAATAAACGGGAT ACGAGACAAACAAAGCGGAAACGATACTAGACTTCCTAAAAAGCGAC GGGTTCCGGAACCGAAACTTCATGCAACTAATACACGACGACAGCCTAA CGTTCAAAGAAAGACATACAAAAAGCGCAAGTAAGCGGGCAAGGGGACAG CCTACACGAACACATAGCGAACCTAGCGGGGAGCCGGCGGATAAAAAA GGGATACTACAAACCGTAAAAAGTAGTAGACGAACTAGTAAAAAGTAAATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 7 0】

GGCGACACAAAACCGGAAAAACATAGTAATAGAAATGGCGCGAGAAAAACCA AACGACGCAAAAAGGGCAAAAACAGCCGAGAACGAATGAAAACGAATA GAAGAAGGGATAAAAGAACTAGGGAGCCAAATACTAAAAAGAACACCCGG TAGAAAAACACGCAACTACAAAAACGAAAACTATACCTATACTACCTACA AAACGGGCGAGACATGTACGTAGACCAAGAACTAGACATAAAACCGACTA AGCGACTACGACGTAGACCAACATAGTACCGCAAAAGCTTCCTAAAAGACG ACAGCATAGACAAACAAAGTACTAACCGGAAGCGACAAAAACCGAGGGA AAGCGACAACGTACCGAGCGAAGAAAGTAGTAAAAAAAATGAAAAACCTAC TGGCGACAACCTACTAAACGGGAACCTAATAACGCAACGAAATTCGACA ACCTAACCGAAACGGAAACGAGGGGGCTAAGCGAACTAGACAAAGCCGG GTTTCATAAAACGACAACTAGTAGAAACGGGACAAATAACGAAACACGTA GGCAAAATACTAGACAGCCGAATGAACACGAAATACGACGAAAAACGACA AACTAATACGAGAAGTAAAAGTAATAACGCTAAAAAGCAAACTAGTAAG CGACTTCGAAAAGACTTCCAAATTCTACAAAGTACGAGAAATAAACAAAC TACCAACCAACGGCAACGACGGGTACCTAAACGGCGTAGTAGGGACGGCGC TAATAAAAAAATACCCGAAACTAGAAAGCGAATTCGTATACGGGACTA CAAGGTATACGACGTACGAAAAATGATAGCGAAAAAGCGAACAAAGAAATA GGGAAAGCGACGGCGAAAATACTTCTCTACAGCAACATAATGAACCTCT TCAAAACGGAAATTAACGCTAGCGAACGGGGAATACGAAAACGACCCGCT AATAGAAAACGAAACGGGGAACCGGGGAATATAGTATGGGACAAAGGGCGA GACTTCGGACCGGTACGAAAAGTACTAAGCATGCCCAAGTAAACATAG TAAAAAAACCGGAAGTACAAACGGGGGGTTACGCAAAAGAAACATACT ACCGAAAACGAAACACGACAACTAATAGCGCGAAAAAAGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 7 1】

	CCGAAAAAATACGGGGGGTTCCGACAGCCCCGACGGTAGCGTACAGCGTAC TAGTAGTAGCGAAAAGTAGAAAAAAGGGAAAAAGCAAAAACATAAAAAGCGT AAAAAGAACTACTAGGGATAACGATAATTGGAAACGAAGCAGCTTCGAAAAA AACCCGATAGACTTCCTAGAAAGCGAAAGGGTACAAAGAAAGTAAAAAAG ACCTAATAATAAACTACCGAAATACAGCCTATTTCGAAC TAGAAAACGG GGAAAAACGAATGCTAGCGAGCGGGGGAAC TACAAAAGGGAACGAA CTAGCGCTACCGAGCAAAATACGTAAACTTCCCTATACCTAGCGAGCCACT ACGAAAAAATCTAAAAAGGAGCCCGGAAAGACAAAGCAAAAACAACTATT CGTAGAACAAACACAAACACTACCTAGACGAAATATAGAACAAATAAAGC GAATTCAGCAACCGAGTAATACTAGCGGACCGCAACCTAGACAAAAGTAC TAAGCGCGTACAAACAAACACCGAGACAAACCGGATACGAGAACAAAGCGGA AAACATAATACACCTATTCAAGCTAACGAACTAGGGGCGCGCGGCGCG TTCAAATACTTCGACACGACGATAGACCGAAACGATACACGAGCACGA AAGAAGTACTAGACGGGACGCTAATACACCAAAAGCATACGGGGCTATA CGAAACCGGAATAGACCTAAGCCAACTAGGGGGGACGGGGGGGGGAGC CCGAAAAAAACGAAAAGTATGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 7 2】

HSDの5' U TR、配列番号 5 4に対応する ORF、K o z a k配列、およ びA L Bの3' UTRを有する C a s 9転写産 物	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTCTG TTGCAGGCCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAAAATACAGCATAG GGCTAGACATAGGGACGAAACAGCGTAGGGTGGCGGTAAATAACGGACGA ATACAAAGTACCGAGCAAAAATTCAAAGTACTAGGGAACACGGACCGA CACAGCATAAAAAAACCTAATAGGGCGCTACTATTCCGACAGCGGGG AAACGGCGGAAGCGACCGGACTAAACGAACGGCGGACGATACAC GCGACGAAAAAACCGAATATGCTACCTACAAAGAAATATTACGCAACGAA ATGGCGAAAGTAGACGACAGCTTCTTCCACCGACTAGAAAGAAAGCTTCC TAGTAGAAGAAAGCAAAAACGAAACGACACCGGATATTCCGGGAACAT AGTAGACGAAGTAGCGTACCGGTAACGAGAAAAATACCGGACGATATACCACTA CGAAAAAACCTAGTAGACAGCACGGACAAAGCGGACCTACGACTAATAT ACCTAGCGCTAGCGCACATGATAAAATTCGAGGGGCACTTCCCTAATAGA AGGGACCTAAACCGGACAAACAGCGACGTAGACAACTATTCTATACAA CTAGTACAAACGTACAAACCACTATTTCGAAAGAAACCCGATAAACGCGA GCGGGGTAGACGCGAAAGCGATACTAAGCGCGGACTAAGCAAAAGCGG ACGACTAGAAAAACCTAATAGCGCAACTACCGGGGGAAAAACCGGG CTATTCGGGAACCTAATAGCGCTAAGCCTAGGGCTAACGCCGAACTTCA AAAGCAACTTCGACCTAGCGGAAGACGCGAAACTACAACTAAGCAAAAG CACGTACGACGACGACCTAGACAACTACTAGCGCAAAATAGGGGACCAA TACGGGGACCTATTCTTAGCGGCGAAAAACCTAAGCGACGCGGATACCTAC TAAGCGACATACTACGAGTAACACGGAATAACGAAAGCGCGCTAAG CGGAGCATGATAAAACGATACGACGAACACCAACGACCTAACGCTA CTAAAAAGCGCTAGTACGACAAACAACTACCGGAAAAAATACAAAGAAATAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 7 3】

TCTTCGACCACAAAGCAGAAAGCGGGTACGCGGGGTACATAGACGGGGGGC GAGCCAGAGAAATTCACAAATTCATAAAACCGATACTAGAAAAAATG GACGGGACGGAGAACTACTAGTAAACTAAACCGAGAGACCTACTAC GAAACACAGAACGTTCCGACACCGGGAGCATACCGCACCAATACACCT AGGGAACTACACCGGATACTACGACGACAAAGACTTCTACCCGTTCC CTAAAAAGACAAACCGAGAAAAAATAGAAAAAATACTAACGTTCCGAAATAC CGTACTACGTAGGGCCCTAGCGCGAGGGAACAGCCGATTCCGCGTGGAT GACGGGAAAAAGCGAAGAAACGATACCGCCGTGGAACTTCGAAGAAAGTA GTAGACAAAGGGCGAGCGCGCAAGCTTCATAGAACGAATGACGAACT TCGACAAAAACCTACCGAACGAAAAAGTACTACCGAAACACAGCCCTACT ATACGAAATACTTCACGGGTATACAAACGAACTAACGAAAGTAAAAATACGTA ACGGAAGGGATGCGAAAAACCGCGGTTCCCTAAGCGGGGAACAAAAAAG CGATAGTAGACCTACTATTCAAAAACGAAACGAAAAAGTAAAGTAAACA ACTAAAAAGAACTACTTCAAAAAAATAGAAATGCTTCGACAGCGTAGAA ATAAGCGGGGTAGAAAGACCGATTCAACCGGAGCCTAGGGACGTACCAAG ACCTACTAAAAATAATAAAGACAAAGACTTCCTAGACAAACGAAAGAAA CGAAGACATACTAGAAAGACATAGTACTAACGCTAACGCTATTCGAAGAC CGAGAAATGATAGAAAGAACGACTAAAAACGTACGGCACCTATTCCGACG ACAAAGTAAATGAAACAACTAAACCGGATACGAGACAAACAAAGCGGAAA ACTAAGCCGAAAACTAATAACGGGATACGAGACAAACAAAGCGGAAA ACGATACTAGACTTCCTAAAAAGCGACGGGTTCCCGAACCGAAACTTCA TGCAACTAATACAGGACGACAGCCTAACGTTCAAGAAAGACATACAAAA AGCGCAAGTAAGCGGGCAAGGGGACAGCCCTACACGAAACATAGCGAAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 7 4】

CTAGCGGGGAGCCCGGGCGATAAAAAAAAAGGGATACTACAAAACGGTAAAAAG TAGTAGACGAAC TAGTAAAAAGTAAATGGGCGGACACAAAACCGGAAAAACAT AGTAATAGAAATGGCGGAGAAAAAACCAAAACGACGCAAAAAGGGCAAAAA AACAGCCGAGAACGAATGAAAACGAATAGAAAGAGGGATAAAAAGAACTAG GGAGCCAAATACTAAAAAGAACACCGGTAGAAAAACACGCAACTACAAAA CGAAAAAATAACCTATACCTATACCTACAAACGCGGAGACATGTACGTA GACCAAGAACTAGACATAAACCGACTAAGCGACTACGACGTAGACCAACA TAGTACCGCAAAAGCTTCCTAAAAGACGACAGCATAGACAAACAAGTACT AACGGGAAGCGACAAAACCGAGGGAAAAGCGACAACTACCGAGCGGA GAAGTAGTAAAAAAAATGAAAAAATACTGGCGACAACTACTAAACGGGA AACTAATAACGGCAACGAAAAATTCGACAACTAACGAAAGCGGAACGAGG GGGCTAAGCGAACTAGACAAAAGCGGGGTTCATAAAACGACAACTAGTA GAAACGGACAAATAACGAAACACGTAGCGCAAACTACTAGACAGCGGAA TGAAACAGAAATACGACGAAAACGACAACTAATACGAGAAGTAAAAGT AATAACCGCTAAAAAGCAAACTAGTAAGCGACTTCGGAAGAAAGACTTCGAA TTCACAAAAGTACGAGAAATAAACAACTACCACCGCGCACGACGGCT ACCTAAAACGGGTAGTAGGGACGGCGCTAATAAAAAATACCGGAACT AGAAAGCGAATTTCGTATACGGGACTACAAAGTATACGACGTACGAAAA ATGATAGCGAAAAGCGAACAAAGAAATAGGGAAAGCGACGGCGAAATACT TCTTCTACAGCAACATAATGAACCTCTTCAAAAACGGAAATAACGCTAGC GAACGGGGAATACGAAAACGACCGCTAATAGAAACGAACGGGGAACG GGGAAAATAGTATGGGACAAAGGGCGAGACTTCGGGACGGTACGAAAAAG TACTAAGCATGCCGCAAGTAAACATAGTAAAAAAAACGGAAAGTACAAAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 7 5】

GGGGGGGTTTCAGCAAAAGAAAAGCATACTACCGAAAACGAAAACAGCGACAAA CTAATAGCGCGAATAAAGAAAGACTGGGACCCGAAAAAATAACGGGGGTTTCG ACAGCCCGACGGTAGCGTACAGCGTACTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAGTAG AGGAAAAAGCAAAAACTAAAAAGCGTAAAAAGAACTACTAGGGATAAACG ATAATGGAAAGCAAGCAGCTTCGAAAAAACCAGATAGACTTCCTAGAAAG CGAAGGGTACAAAGAAAGTAAAAAAGAACCTAATAATAAACTACCGAA ATACAGCCTATTTCGAACTAGAAAAACGGCGAAAAACGAATGCTAGCGAGC GCGGGGAACCTACAAAAAGGGAACGAACCTAGCGCTACCGAGCAAAATACG TAAACTTCCTATACCTAGCGAGCCACTACGAAAAAATAAAAGGGAGCCC GGAAGACAAAGCAAAACAACTATTTCGTAGAACAAACAAACACTAC CTAGACGAAATAATAGAACAAATAAGCGAATTTCAGCAAAACGAGTAATAC TAGCGGACGGAACCTAGACAAAGTACTAAGCGCGTACAAACAAACACCG AGACAAACCGATACGAGAACAAAGCGGAAAAACATAATACACCTATTCCAG CTAACGAACCTAGGGGCGCGCGCGGTTCAAACTACTTCGACACGACGA TAGACCGAAAAACGATACACGAGCACGAAAGAACTACTAGACCGGACGCT AATACACCAAAAGCATAACGGGGCTATACGAAACCGGAATAGACCTAAGC CAACTAGGGGGGACGGGGGGGGGAGCCCGAAAAAACAAGAAAGTAT GACTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAG AAAGAAAAATGAAAGATCATAGCTTATTTCATCTCTTTTCTTTCTTTG GTGTAAGGCCAACACCCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTT TGCCTCTTTTCTCTCTCTCTCAATTAAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGA G	

10

20

30

40

50

5	
2	6

CleanCap (商標) とともに使用するための最初の3個のヌクレオチドとしてのAGG、HSDの5' UTR、配列番号4に対応するORF、Kozak配列、およびALBの3' UTRを有するCas9転写産物	AGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTCTGTTGCAGGCCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAAGATACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAACAGCGTCGGATGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCGAGCAAGAAAGTTCAAAGTCTCTGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAACACAGCAGAAAGCAACAGACTGAAGAGAAACAGCAAGAAAGATACACAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCTGCAGGAAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGGTCCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGTGTCGAAGAGACAAAGAACGACGAAAGACACCCGATCTTCCGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCAAGAAAAGTACCCGACAACTCTACCACTGAGAAAAGCTGGTCGACAGCACAGGACAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGACTCGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCCGAAGAAAACCCGATCAACGCCAAGGGAGTCGACGGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGACGAAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAAGACGGACTGTTCCGAAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCCAGTACGCAGACCTGTTCCCTGGCAGCAAGAACCCTGAGCGACGCAATCCCTGTGAGCGACATCCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCCGAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCAAGGACCTGACACTGTGAAGGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAGAAAGTACAAAGGAAAATCT	25 6

50

【表 4 3 - 1 7 7】

TCTTCCGACCCAGAGCAAGAAACGGATACGCCAGGATACATCGACCGGAGGAGC AAGCCAGGAAGAAATTCTACAAGTTCAATCAAGCCGATCCTGGAAAAAGATG GACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGA GAAAGCAGAGAAACATTTCGACAAACGGAAGCATCCCCGACCCAGATCCACCT GGAGAACTGCACGGCAATCCTGAGAAACAGGAAGACTTCTACCCGTTCC CTGAAAGGACAAACAGAGAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCC CGTACTACGTCGGACCCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGAT GACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAAATCACACCCGTGGAACTTCGAAGAAAGTC GTCGACAAGGGAGCAAGGCCACAGAGCTTCATCGAAGAAATGACAAACT TCGACAAGAAACCTGCCGAACGAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCCTGCT GTACGAAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTC ACAGAAAGGAATGAGAAAGCCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAAGAGG CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCA GCTGAAGGAAGACTACTTCAGAGAAAGATCGAAATGCTTCGACAGCGTCGAA ATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCCAAGCCCTGGGAACATACACCG ACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCTGGACAAACGAAGAAAA CGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGTTTCGAAGAC AGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACG ACAAAGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGATACACAGGATGGGGAAAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACCGGAATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAG ACAAATCCTCGGACTTCTGAAAGAGCGACGGATTCCGCAACAGAAACTTCA TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAA GGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCCTGCACGAAACACATCGCAAAAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 7 8】

CTGGCAGGAAGCCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCCTGCAGACAGTCAAGG TCGTGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAAGCCGGGAAAACAT CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCCAGACACACACAGAAAGGACAGAAAG AACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAAGGAATCAAGGAACCTGG GAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAA CGAAAAGCTGTACCCTGTACTACCTGCAGAACCGAAGAGACATGTACGTC GACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCCACA TCGTCCCCGACAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAGGTCCCT GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAGAAGCGGACAAAGTCCCGAGCGAA GAAGTCGTCAAGAAATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAA AGCTGATCACACACAGAGAAAGTTCCACAACTGACAAAGGCAGAGAGAGG AGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTC GAAACAAGACAGATCACAAAAGCACCGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAA TGAACACAAAAGTACGACGAAAACGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGT CATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAAGGACTTCCAG TTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCAACACGACACGACGACGCAAT ACCTGAAACGCAGTCGTCCGAAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCGAAGCT GGAAGCGGAAATTCGTCTACGGAGACTACAAAGTCTACGACGTCAGAAAAG ATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAGGCAACAGCAAGTACT TCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCAACCTGGC AAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCCGCTGATCGAAAACAAACGGGAGAAACA GGAGAAAATCGTCTGGGACAAAGGGAAGAGACTTCGCCAACAGTCAGAAAGG TCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 7 9】

	AGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAAGAGAAACACAGCGACCAAG CTGATCGCAAGAAAGAGGACTGGGACCCGAAAGTAACGGAGGATTTCG ACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTGCAAGGTCCGAAAA GGAAAGAGCAAGAAAGCTGAAAGCGTCAAGGAACTGCTGGAAATCACA ATCATGGAAAGAACAGCCTTCGAAAGAAACCCGATCGACTTCCTGGAAAG CAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA GTACAGCCTGTTCGAACTGGAAACCGAAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGC GCAGGAGAACTGCAGAGAGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACG TCAACTTCCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAGCTGAAAGGAAAGCCC GGAAGACAAAGAACAGAAAGCAGCTGTTCGTCGAAACAGCACAGCACTAC CTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAAATTCAGCAAGAGATCATCC TGGCAGACGCAAAACCTGGACAAAGTCCCTGAGCGCATACAAACAAAGCACAG AGACAAAGCCGATCAGAGAAACAGGCAGAAACATCATCCACCCTGTTCAACA CTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAAGTACTTCGACACAAACAA TCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAAAGGAAAGTCCCTGGACGCAACACT GATCCACCAAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAAGATCGACCTGAGC CAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAAGCCCGAAGAAAGAAAGAAAGGTCT AGCTAGCCCATCACATTAAAAAGCATCTCAGCCCTACCATGAGAAATAAGAG AAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCACTCTCTTTTCTTTTCGTTG GTGTAAGCCCAACACCCCTGCTAAAAAACATAAAATTTCTTTAATCATTT TGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGA
	G

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 8 0】

CMV由来の 5' UTR、配 列番号4に対応 するORF、K ozak配列、 およびA L Bの 3' UTRを有 するC a s 9 転 写産物	GGGCAGATCGCCCTGGAGACGCCCATCCACGCTGTTTGTGACCTCCATAGAA GACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGCGCGGGAACGGTGCAATTGGAAAC GCGGATTCCCGTGCCCAAGAGTGACTCACCGTCTTGACACGGCCACCA TGGACAAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGG ATGGGCAGTCATCACAGACCAATACAAGTCCCGAGCAAGATTCAAG GTCCCTGGGAAACACAGACAGACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAG CACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGAG AACAGCAAGAAAGATACACAAAGAAAGAAAGAAACAGAACTCTGCTACCTG CAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCC ACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGCTCGAAGACAGAAAGACAAAGACGAAAG ACACCGGATCTTCGGAAACA TCGTCGACGAAAGTCGCATACCAAGAAAG TACCCGACAAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCAAGACA AGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTT CAGAGGACACTTCCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGAC GTGGACAAGCTGTTCA TCCAGCTGGTCCAGACATACAACAGCTGTTCC AAGAAAACCCGATCAACGCAAGCCGAGTCGACGCAAAAGCAATCCCTGAG CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTG CCGGGAGAAAAGAAAGAACGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCC TGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGC AAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTG CTGGCACAGATCCGAGACCAAGTACGACAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAGA ACCTGAGCGGACGCAATCCCTGCTGAGCGGACATCCTGAGAGTCAACACAGA AATCACAAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 8 1】

CACACACAGGACCTGACACTGCTGTAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGC CGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGC AGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCACAAATTTCATC AAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAGC TGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAAG CATCCCGCACAGATCCACCTGGGAGAACTGCACCGCAATCCTGAGAAAGA CAGAAAGACTTCTACCCCGTTCTGTAAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAA AGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCCGACCCGCTGGCAAGAGG AAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAAGAAAGCGAAAGAAACAAATCACA CCGTGGAACTTCGAAGAAAGTCGTGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCT TCATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACTGCCGAACGAAAAGGT CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAAATAC TTCACAGTCTACAAACGAA CTGACAAAGGTCAAAGTACGTACACAGAAAGGAAATGAGAAAGCCGGCAATTC TGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGCAATCGTGCACCTGCTGTTCAAGACAAA CAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATC GAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCCGAGTCGAAAGACAGATTCAACG CAAAGCCTGGGAAACATACCACGACCTGCTGAAAGATCATCAAGGACAAAGGA CTTCCTGGACAAACGAAAGAAACGAAAGACATCCTGAAAGACATCGTCCCTG ACA CTGACACTGTTTCGAAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAGA CATACGCACACCTGTTTCGACGACCAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAAG AAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGGAATC AGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCTGAAAGAGCGACG GATTCGCAAAACAGAAACTTCATGACGCTGATCCACGACGACAGCCTGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 8 2】

ATTC AAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGC CTGCACGAAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAAGG GAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGG AAGACACAAGCCGGAAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAACCCAG ACAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCG AAGAAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGT CGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAG AACGGAAGAGACATGTACGTGACCAAGAACTGGACATCAACAGACTGA GGACTACGACGTGACCAATCGTCCGCAAGCTTCTGTGAAAGGACGA CAGCATCGACAAACAAGGTCTGTACAAGAAAGCGACAAAGACAGAGGAAAG AGGACAACCGTCCCGAGCGAAGAACTCGTCAAGAAAGATGAAGAACTACT GGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAA CCTGACAAAAGGCAGAGAGAGAGGAGCTGAGCGAACTGGACAAAGCAGGA TTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCAACAAAGCACGTCCG CACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACAGACAA GCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGC GACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACT ACCACCAAGCACAGACGCAATACCTGAACGCAAGTCGTGGAACAGCACT GATCAAGAAAGTACCCGAAAGCTGGAAAGCGAAATTCGTCTACGGAGACTAC AAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATCG GAAGGCCAACAGCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAATCTCTT CAAGACAGAAATCACACTGGCAACCGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTG ATCGAAACAAACCGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGAG	

10

20

30

40

50

A C T T C G C A A C A G T C A G A A A G G T C C T G A G C A T G C C G C A G G T C A A C A T C G T C A A G A A G A C A G A A G T C C A G A C A G G A G G A T T C A G C A A G G A A A G C A T C C T G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C T G A T C G C A A G A A A A G A A G G A C T G G G A C C C G A A G A A G T A C G G A G G A T T C G A C A G C C G A C A G T C G C A T A C A G C G T C C T G G T C G T C G C A A A G G T C G A A A G G G A A A G A C A A G A A G C T G A A G A G C G T C A A G G A A C T G C T G G G A A T C A C A A T C A T G G A A A G A A G C A G C T T C G A A A A G A A C C C G A T C G A C T T C C T G G A A G C A A A G G G A T A C A A G G A A G T C A A G A A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C G A A G T A C A G C C T G T T C G A A C T G G A A A A A C C G G A A G A A A G A G A A T G C T G G C A A G C G C A G G A G A A C T G C A G A A G G G A A A C G A A C T G G C A C T G C C G A G C A A G T A C G T C A A C T T C C T G T A C C T G G C A A G C C A C T A C G A A A A G C T G A A G G A A G C C G G A A G A C A C G A A C A G A A G C A G C T G T T C G T C G A A A C A G C A C A A G C A C T A C C T G G A C G A A A T C A T C G A A C A G A T C A G C G A A T T C A G C A A G A G A G T C A T C C T G G C A G A C G C A A A C C T G G A C A A G G T C C T G A G C G C A T A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A T C A G A G A A C A G C A G A A A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C A C T G A C A A A C C T G G G A G C A C C G G C A G C A T T C A A G T A C T T C G A C A C A A C A A T C G A C A G A A A G A G A T A C A C A A G C A C A A A G G A A G T C C T G G A C G C A A C A C T G A T C C A C C A G A G C A T C A C A G G A C T G T A C G A A C A A G A A T C G A C C T G A G C C A G C T G G G A G G A G A C G G A G G A G A A G C C C G A A G A A G A A G A A A A G G T C T A G C T A G C C A T C A C A T T T A A A A A G C A T C T C A G C C T A C C A T G A G A A T A A G A G A A A A A A A T G A A G A T C A A T A G C T T A T T C A T C T C T T T T T C T T T T T C G T T G G T G T A A A G C C A C A C C C T G T C T A A A A A A C A T A A A T T T C T T T A T C A T T T T G C C T C T T T T C T C T G T G C T T C A A T T A A T A A A A A T G G A A A G A A C C T C G A G

50

【表 4 3 - 1 8 4】

HB B由来の 5' UTR、配 列番号4に対応 するORF、K ozak配列、 およびHB Bの 3' UTRを有 するCas9転 写産物	GGGacatttgccttctgaacacaaactgtgttcaactagcaaacctcaaaacaga caecggatctgecaacATGGACAAAGTAAGTACAGCATCGGACTGGACATC GGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCAACACAGACGAAATACAAAGGTCC CGAGCAAGAAAGTTCAAGGTCTCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAA GAAAGAACCTGATCGGAGCACCTGCTGTTCCAGACGGGAGAAACAGCAGAA GCAACAAAGACTGAAGAGAACACAGCAAGAAAGATACACAAAGAAAGAA ACAGAAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGGT CGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGGTCGAAAGAA GACAAAGAACGAAAGAACACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAAG TCGCATACCAAGAAAGTACCCGACAAATCTACACCTGAGAAAGAAAGCT GGTCGACAGCACAGACAAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTG GCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGACCTGA ACCCGGACAAACAGCGACGTCGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGAC ATACAAACAGCTGTTCCGAAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGAC GCAAGGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGACAGCAAGACTGGAAA ACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAGAAAGAAAGAAAGCTTTCGGAAA CCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCCGAACTTCAAGAGCAACTTC GACCTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACG ACGACCTGGACAACTGCTGTCGACAGATCGGAGACCAAGTACGCAAGCCT GTTCTGGCAGCAAAAGAACCTGAGCGACGCAATCTCTGCTGAGCGGACATC CTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCCGCTGACCGCAAGCATGA TCAAGAGATACGACGAAACACCAAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACT GGTCAGACAGCAGCTGCCGGGAAAAAGTACAAAGGAAATCTTCTTCGACCCAG	25 8

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 8 5】

AGCAAGAAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAG AATTCTACAAGTTTCAATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGA AGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAAGAGA ACATTCGACAAACGGAAGCATCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGC ACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAAGGACAA CAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACCTC GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAAGATTGCAATGGATGACAAAGAAAAGA GGGAAAGAAACAAATCACACCGTGGAACTTCGAAAGAAAGTCGTCGACAAAGGG AGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAAC CTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACT TCACAGTCTACAACGAACCTGACAAAAGGTCAAGTACGTCAACAGAAAGGAAT GAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAAACAGAAAGAAAGGCAAATCGTCGAC CTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAG ACTACTTCAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGT CGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCAAGACCTGCTGAAG ATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAAAGAAACGAAACATCC TGGAAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGTTGAAAGACAGAGAAATGAT CGAAGAAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGGTCATG AAGCAGCTGAAGAGAAAGAAATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAA AGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGAACAAATCCTGGA CTTCCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAACTTCATGCAAGCTGATC CACGACGACAGCCCTGACATTCAGGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCA GCGGACAGGGAGACAGCCTGCAACGAAACACATCGCAAACTTGGCAGGAAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 8 6】

CCCCGCAATCAAGAAAGGGAATCCTGCAGACACAGTCAAGGTCTGTCGACGAA CTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACACAAAGCCGGAAACATCGTCAATCGAAA TGGCAAGAGAAACACAGACAAACACAGAAAGGACAGAAACAGCAGAGA AAGAAATGAAAGAAATCGAAGAAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATC CTGAAGGAACACCCGGTCGAAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAAGCTGT ACCTGTACTACCTGCAGAACCGAAGAGAGACATGTACGTCCACCAAGAACT GGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCATCATCGTCCCCGAG AGCTTCCGTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAAAGGTCTGACAAAGAACG ACAAAGAACAGAGGAAGAGCGACAAAGTCCCCGAGCGAAGAAAGTCGTCAA GAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACA CAGAGAAAGTTGGACAACTGACAAAGGCAGAGAGAGAGGAGACTGAGCG AACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACA GATCACAAAGCACGTCGCCACAGATCCTGGACACAGCAAGATGAACACAAAG TACGACGAAACAGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAAGTCAATCACACTGA AGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAAGGACTTCCAGTCTTACAAGGT CAGAGAAATCAACAACCTACCAACAGGCACACGACGCATACCTGAACGCA GTGTCGGAAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCGAAAGCTGGAAGCGAAT TCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAA GAGCGAACAGGAAATCGGAAGGCACACAGCAAAAGTACTTCTCTACAGC AACATCATGAACCTTCTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAA TCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGT CTGGGACAAAGGAAAGAGACTTCGGCAACAGTCAGAAAAGTCTGTAGCATG CCGCAGGTCAAACATCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 8 7】

	GCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAAG AAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAAGAAAGTACGGAGGATTCCGACAGCCCGACA GTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAAGGTCGAAAAGGAAAGAGACA AGAACTGAAGAGCGTCAAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAG AAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAAAGGATAC AAGGAAGTCAAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGT TCGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACT GCAGAAGGGAAACGAACCTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTG TACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACG AACAGAAAGCAGCTGTTGGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAAT CATCGAAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCACTCTGGCAGACGCA AACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAAACAAGCACAGAGACAAGCCGA TCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACTGACAAACCT GGGAGCACCGGCAGCATTCAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAG AGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTCTGACCGCAACACTGATCCACAGAG GCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGG AGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAAGAAAGAAAGGTCTAGctagcctc gctttcttgctgtccaaatttctatttaaagggttccctttgttccctaaagtc caactactaaacctgggggataattattgaaggcccttgaagcaatctggatctc tgcctataataaaaaacatttatttcaattggcctcgag	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 8 8】

XBG由来の 5' UTR、配 列番号4に対応 するORF、K o z a k配列、 およびXBGの 3' UTRを有 するC a s 9転 写産物	GGGaa g c t c a g a a t a a a c g c t c a a c t t t g g c c g g a t c t g c c a c C A T G G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G A C T G G A C A T C G G A A C A A C A G C G T C G G A T G G G C A G T C A T C A C A G A C G A A T A C A A G G T C C C G A G C A A G A A G T T C A A G G T C C T G G G A A A C A C A G A C A G A C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G A G C A C T G C T G T T C G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C T G A A G A G A A C A G C A A G A A G A T A C A C A A G A A G A A A C A G A A T C T G C T A C C T G C A G G A A A T C T T C A G C A A C G A A A T G G C A A A G T C G A C G A C A G C T T C T T C C A C A G A C T G G A A G A A A G C T T C C T G T C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C G G A T C T T C G G A A A C A T C G T C G A G A A G T C G C A T A C C A C G A A A A G T A C C C G A C A A T C T A C C A C C T G A C A A A G A A G C T G G T C G A C A G C A C A G A C A A G C C A G A C C T G A G A C T G A T C T A C C T G G C A C T G G C A C A C A T G A T C A A G T T C A G A G G A C A C T T C C T G A T C G A A G G A G A C C T G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G T C G A C A A G C T G T T C A T C C A G C T G G T C C A G A C A T A C A A C C A G C T G T T C G A A G A A A A C C C G A T C A A C G C A A G C G G A G T C G A C G C A A A G G C A A T C C T G A G C G C A A G A C T G A C C A A G A C A G A A G A C T G G A A A A C C T G A T C G C A C A G C T G C C G G G A G A A A G A A G A A C G G A C T G T T C G G A A A C C T G A T C G C A C T G A G C C T G G G A C T G A C A C C G A A C T T C A A G A G C A A C T T C G A C C T G G C A G A A G A C G C A A A G C T G C A G C T G A G C A A G G A C A C A T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T G G C A C A G A T C G G A G A C C A G T A C G C A G A C C T G T T C C T G G C A G C A A A G A A C C T G A G C G A C G C A A T C C T G C T G A G C G A C A T C C T G A G A G T C A A C A C A G A A A T C A C A A A G G C A C C G C T G A G C C A A G C A T G A T C A A G A G A T A C G A C G A A C A C C A C C A G G A C C T G A C A C T G C T G A A G G C A C T G G T C A G A C A G A C A G C T G C C G G A A A A G T A C A A G G A A A T C T T C T T C G A C C A G A G C A A G A A C G G A T A C G C A G G A

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 8 9】

TACATCGACGGAGGAGCCAAAGCCAGGAAGAATTCTACAAAGTTTCATCAAGC CGATCCTGGAAAAGATGGACCGGAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAA CAGAGAAAGACCTGTGTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAAAGGAAAGCATC CCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGCAAGCAATCCTGAGAAAGACAGG AAGACTTCTACCCCGTTCTGAAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAGAT CCTGACATTTCAGAAATCCCGTACTACTGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAAC AGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGT GGAACCTCGAAGAAAGTCCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCAT CGAAAGAAATGACAACTTCGACAAAGAACTGCGCAACGAAAGGTCCTG CCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAAATACCTCACAGTCTACAAACGAACTGA CAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAG CGGAGAACAGAAAGAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAAGCAAAACAGA AAGTCAACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAAGACTACTTCAAAGAAAGATCGAAT GCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAACGCAAG CCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAGGACAAAGGACTTC CTGGACAACGAAGAAACGAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCTGACAC TGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA CGCACACCTGTTCGACGACAAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAGA TACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAG ACAAGCAGAGCGGAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATT CGCAAAACAGAAACTTCATGCACTGATCCACGACGACAGCCTGACATTTC AAGGAAGACATCCAGAAAGCACAGGTCAGCGGACAGGAGACAGCCCTGC ACGAACACATCGCAAACTGCGCAGGAAGCCCCGGCAATCAAGAAAGGAAT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 9 0】

	CCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGA CACAAAGCCGGAAAACATCGTCAATCGAATATGGCAAGAGAAAACAGACAA CACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAAAGAAATGAAAGAAATCGAAGA AGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAA AACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACG GAAGAGACATGTACGTCGACCAAGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGA CTACGACGTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGC ATCGACAAACAAAGGTCTGTACAAAGAAAGCGAACAAAGAACAGAGAAAGAGCG ACAAAGTCCCGAGCGAAGAAAGTCTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGGAG ACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCGACAACTG ACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCA TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCACAAAAGCAGTCGCACA GATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACGACAAAGCTG ATCAGAGAAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACT TCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGTCAAGATCAGAGAAATCAACAACTACCA CCACGCACACGACGCATACCTGAACCGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATC AAGAAGTACCCGAAAGCTGGAAGCGAAATTCGTCTACGGAGACTACAAAG TCTACGACCGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAATTCGGAAA GGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTCAAG ACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCG AAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGACAAAGGCAAGAGACTT CGCAACAGTCAGAAAGGTCCGTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAG AAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 9 1】

	AGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAAGAAAGGACTGGGACCCGAA GAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTC GTGCAAAAGTCCGAAAAGGAAAAGAGCAAGAGCTGAAGAGCGTCAAGG AACTGCTGGGAAATCACAAATCATGGAAGAAAGAGCTTCGAAAAGAAACCC GATCGACTTCCTGGAAGCAAAAGGATACAAAGAAAGTCAAGAAAGGACCTG ATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAACCTGGAACCGGAAGAA AGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAAACGAACTGGC ACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAA AAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGAAACAGAAAGCAGCTGTTCTCG AACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATT CAGCAAGAGAGTCACTCCTGGCAGACGCAACCTGGACAGGTCCTGAGC GCATACAACAAGCACAGAGACAAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACA TCATCCACCCTGTTCACTACTGACAAACCTGGGAGCACCCGCAGCATTCAA GTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATCACAAAGCACAAAGGAA GTCCTGGACCGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAA CAAGAA'TCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAAAGCCGAA GAAGAAAGAGAAAGGCTTAGctagcaaccagccctcaagaaacccgaaagg agtctctaaagctacataatacccaacttaacactttacaaaaatgttgtccc ccaaaaatgtagcccaattctgtatatctgtctctctaaataaaagaagtttcttc acattctctctcgag

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 9 2】

CleanCap (商標) とともに使用するための最初の3個のヌクレオチドとしてのAGG、XBG由来の5' UTR、配列番号4に対応するORF、Kozak配列、およびXBGの3' UTRを有するCas9転写産物	AGGaagctcagaataaaacgcctcaactttggccgggatttgcccaacCATGGACAAAGAAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCAATCACAGACGAATACAAAGTCCCGAGCAAGAAAGTTCAAAGGTCC TGGGAAAACACAGACAGACAGACAGCATCAAGAAAGAAACCTGATCGGAGCAC T GCTGTTCCGACAGCGGAGAAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGAGAAACA GCAAGAAAGAAAGTACACAAGAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCTGCAGG A AATCTTCAGCAACGAAATGCGAAAGGTGAGCAGACAGCTTCTTCCACAG ACTGGAAAGAAAGCTTCCCTGGTCGAAGAAAGACAAAGACGAAAGACAC CCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCAAGAAAGTACC CGACAACTCTACCACCTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGC AGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCAACACATGATCAAAGTTCAGA GGACACTTCCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGACGTCG ACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACCAAGCTGTTCCGAAGA AAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGCA AGACTGAGCAAGACAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCAAGCTGCCGG GAGAAAAGAAAGAAAGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGG ACTGACACCCGAACCTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAG CTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAAACCTGCTGG CACAGATCGGAGACCAAGTACCGACAGCTGTTCTCTGGCAGCAAGAACCT GAGCGACGCAATCTCTGCTGAGCGACATCTCTGAGAGTCAACACACAGAAATC ACAAGGCAACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACAC ACCAGGACCTGACACTCTGTAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGA AAAGTACAAAGGAAAATCTTCTTCGACCCAGAGCAAGAAACGGATACGCAGGA	26 0

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 9 3】

TACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAAGTTTCATCAAGC CGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAA CAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAACATTCGACAAACGGAAAGCATC CCGACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCCACGCCAATCCTGAGAAAGACAGG AAGACTTCTACCCGTTCCGTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAAGAT CCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTGGACCGCTGGCAAGAGGAAAC AGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAAATCACACCGT GGAACCTTCGAAGAAAGTCGTCCGACAAAGGGAGCAAGCCGACAGAGCTTCAT CGAAAGAATGACAAAACCTTCGACAAAGAACCTGCCGAAACGAAAAGGTCCTG CCGAAGCACAGCCTGCTGTACGGAATACTTCACAGTCTACAAAGGAACCTGA CAAAAGGTCAAAGTACGTACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCAATTCCTTGAG CGGAGAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAAACAGA AAGTCAACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAAT GCTTCGACAGCGTCGAAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCACACGCAAG CCTGGGAACATACCCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACTTC CTGGACACAGAAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTGACAC TGACACTGTTCGAAGACAGAGAAAATGATCGAAGAAAAGACTGAAGACATA CGCACACCTGTTCCAGCACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAGA TACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAG ACAAAGCAGAGCGGAAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAAGCGACGGATT CGCAAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGGAAGACATCCAGAAAGGACAGGTCAAGCGGACAGGAGACAGCCCTGC ACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCCGGCAATCAAGAAAGGAAT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 9 4】

CCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCA TGGGAAGA CACAAAGCCGGAAAAACATCGTCATCGAAAAATGGCAAGAGAAAAACAGACAA CACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAAGAAATCGAAGA AGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAAGAAACACCCGGTCGAA AACACACAGCTGCAGAAAGCAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACG GAAGAGACATGTACGTCGACCCAGGAAC TGGACATCAACAGACTGAGCGA CTACGACGTCGACCCACATCGTCCCGCAGAGCTTCC TGAAGGACGACAGC ATCGACAAACAAAGGTCCTGACAAAGAACGACAAAGAACAGGAAAGAGCG ACAAAGTCCCGAGCGAAAGAAAGTCGTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGGAG ACAGCTGCTGAACGCAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCACAAACCTG ACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAAC TGGACAAGGCAGGATTCA TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCA CAAAGCACGTCGCACA GATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAAACGACAAAGCTG ATCAGAGAAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACT TCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCA CCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAAACAGCACTGATC AAGAAGTACCCGAAAGCTGGAAAGCGAAATTCGTCTACGGAGACTACAAAG TCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAAACAGGAAATCGGAAA GGCAACAGCAAGTACTTCTCTACAGCAACATCATGAAC TCTTCAAAG ACAGAAATCACACTGGCAACCGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCG AAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGCGACAAAGGGAAGAGACTT CGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGAGGTCAACATCGTCAAG AAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 9 5】

	AGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAA GAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTC GTGGCAAGGTGGAAGGAAAGGAAAGAGCAAGCTGAAGCGTCAAGG AACTGCTGGGAATCACTATCATGGAAGAAAGCAAGCTTCGAAAGAAACCC GATCGACTTCCTGGAAGCAAGGATACAAGGAAGTCAAGAAAGGACCTG ATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCCAACTGGAACCGGAAGAA AGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAAACTGCAGAAAGGAAACGAACTGGC ACTGCCGAGCAAGTACGTCACTTCTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAA AAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAAGAAAGCAAGCAAGCAAGCAAGGAA AACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATT CAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCCAAACCTGGACAAGTCCCTGAGC GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAACA TCATCCACCTGTTCACTACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCAGCATTCAA GTACTCGACACAACTCACTGACAGAAAGATACACAGCACAAAGGAA GTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAA CAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACCGAGGAGGAGCCCGAA GAAGAAAGAAAGGTCTAGctagcaccagcctcaagaaacacccgaaatgg agtctctaaagctacataataaccaacttacaactttacaaaaatgttgtccc ccaaaaatgtagcccatctcgatatctgctcctataataaaaaagaagtttcttc acattctctctcgag	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 9 6】

CleanCap (商標) とも に使用するた めの最初の3個 のヌクレオチド としてのAG G、HSD由来 の5' UTR、 配列番号4に対 応するORF、 Kozak配 列、およびΔL Bの3' UTR を有するCas 9転写産物	AGGTCCCGCAGTCCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTCTG TTGCAGGCGCTTATTCCGGATCCGCCACCATGGACAAAGATACAGCATCG GACTGGACATCCGGAAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCAATCAACAGACGA ATACAAAGGTCCCGAGCAAGAAAGTTCAAAGTCTCTGGAAACACAGACAGA CACAGCATCAAGAAAGAACTGATCGGAGCACCTGCTTTCGACAGCGGAG AAACAGCAGAGCAACAAAGACTGAGAGAAACAGCAAGAAAGATACAC AAGAAAGAAAGAACAGAAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAA ATGGCAAAAGGTCCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCC TGGTCGAAAGAAAGACAAAGAACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACAT CGTCGACGAAAGTCGCATACCACGAAAGTACCCGACAACTACCACTG AGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCT ACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCCTGATCGA AGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGACGTCGACAAAGCTGTTCATCCAG CTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTTCGAAAGAAACCCGATCAACGCAA GCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCCAAAGACTGAGCAAGAGCAG AAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAGAAACGGA CTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCCGAACTTCA AGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGA CACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGATCGGAGACCCAG TAGGCAGACCTGTTCCCTGGCAGCAAGAACTGAGCGGACGCAATCCTGC TGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGACCGCTGAG CGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACACACAGGACCTGACACTG CTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAGTACAAAGAAATCT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 9 7】

TCTTCGACCCAGAGCAAGAACGGGATACGCCAGGATACATCGACGGAGGAGC AAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATG GACGGAAACAGAAAGAACTGTGTGCTCAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGA GAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAAGCATCCCGCACCCAGATCCACCT GGGAGAACTGCACCGCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTC CTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCC CGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGAT GACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAAATCACACCGTGGAACTTCGAAAGAAAGTC GTCGACAAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAAGATGACAAACT TCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCTCTCCGAAGCACAGCCTGCT GTACGAAATACTTCAAGTCTACAAAGAACTGACAAAAGGTCAAGTACGTC ACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAAACAGAAAGAGG CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAAGACAAAACAGAAAGGTCAACAGTCAAGCA GCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAA ATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACCGCAAGCCTGGGAACATACCAAG ACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAAAGAAA CGAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCTGTGACACTGACACTGTTCGAAAGAC AGAGAAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACG ACAAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAGAAAGATACACAGGATGGGGAAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAAGCAGCGGGAAG ACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCCGAAACAGAAACTTCA TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAAGGAAGACATCCAGAA GGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACCGAAACACATCGCAAAAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 9 8】

CTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGG TCGTCGACGAACCTGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAAGCCGGGAAAAACAT CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAAACAGAAAGGACACAGAAAG AACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAAGGAATCAAGGAACCTGG GAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAA CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACCGAAGAGACATGTACGTC GACCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCCACA TCGTCCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAAAGGTCT GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAGAGCGGACAAAGTCCCCGAGCGAA GAAGTCGTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAA AGCTGATCACACAGAGAAAGTTGGACAACTGACAAAGGCAGAGAGAGG AGGACTGAGCGAATCTGGACAAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTC GAAACAAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAA TGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGT CATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAAGGACTTCCAG TTCTACAAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCAACGACACGACCGACCAT ACCTGAACGCAGTCGTGGAAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCGAAAGCT GGAAGCGGAAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAAG ATGATCGCAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAGGCAACAGCAAGTACT TCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAAATCAACACTGGC AAACGGAGAAAATCAGAAAAGAGACCGCTGATCGAAAACAAAACGGAGAAACA GGAGAAAATCGTCTGGGACAAAGGGAAGAGACTTCGCCAACAGTCAGAAAAGG TCTTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 1 9 9】

AGGAGGATTTCAGCAAGGAAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAAG CTGATCGCAAGAAAAGGACTGGGACCCGAAGAAAGTACGGAGGATTTCG ACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAAGGTCGAAAA GGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACCTGCTGGGAATCACA ATCATGGAAAAGAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAAG CAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA GTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGC GCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACG TCAACTTCCTGTACTCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGAAAGCCC GGAAGACAACGAAACAGAACGAGCTGTTGGTCGAACAGCACAAAGCACTAC CTGGACGAAAATCATCGAAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCAATCC TGGCAGACGCAAACTGGACAAAGGTCCTGAGCGCATACAAACAAGCACAG AGACAAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCAACA CTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAGTACTTCGACACACAACA TCGACAGAAAAGAGATACACAAGCACAAAAGGAAGTCTGTGACGCAACACT GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAAATCGACCTGAGC CAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAAGCCCGAAGAAAGAGAAAGGTCT AGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAG AAAAGAAAATGAAAGATCAATAGCTTATTCACTCTCTTTTCTTTTCTGTTG GTGTAAGGCCAACACCCCTGTCTAAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTT TGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGA	G

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 0 0】

30 / 30 / 3 9ボリア配列	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAACCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	26 2
ポリA100配 列	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	26 3
	未使用	26 4

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 0 1】

Neisseria meningitidis Cas9をコードするORF	ATGGCAGCATTCAAGCCGAACTCGATCAACTACATCCTGGGACTGGACA	26
	TCGGAAATCGCATCGGTGGATGGGCAATGGTCGAAATCGACGAAAGAGA	5
	AAACCCGATCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCA	
	GAAGTCCCGAAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAACTGGCAA	
	GATCGGTCAGAAAGACTGACAAGAAAGAGACACACAGACTGCTGAGAAC	
	AAGAAGACTGCTGAAGAGAGAGGAGTCCCTGCAGGCAGCAAACTTCGAC	
	GAAACGGACTGATCAAGTCGCTGCCGAAACACACCGTGGCAGCTGAGAG	
	CAGCAGCACTGGACAGAAAGCTGACACCGCTGGAATGGTCGGCAGTCCT	
	GCTGCACCTGATCAAGCACAGAGGATACCTGTCCAGAGAAAGAACGAA	
	GGAGAAACAGCAGACAAAGGAACCTGGGAGCACTGCTGAAGGAGTCGCAG	
	GAAACGCACACGCCACTGCAGACACAGGAGACTTCAGAAACACCGGCAGAACT	
	GGCACTGAACAAAGTTCGAAAGGAATCGGGACACATCAGAAACCAAGAGA	
	TCGGACTACTCGCACACATTCTCGAGAAAGGACCTGCAGGCAGAACTGA	
	TCCGTGTTTCGAAAGCAGAAAGGAATTCGGAAACCCGCACGTCTCGGG	
	AGGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCTGATGACACAGAGACCGGCA	
	CTGTCGGGAGACGCAGTCCAGAAAGATGCTGGGACACTGCACATTTCGAAC	
	CGGCAGAACCCGAAGGCAGCAAGAAACACATACACAGCAGAAAGATTTCAT	
	CTGGCTGACAAAGCTGAACAACTGAGAAATCCTGGAACAGGGATCGGAA	
	AGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACACTGATGGACGAAACCGTACA	
	GAAAGTCGAAAGCTGACATACGCACAGGCAGAAAGAACTGCTGGGACTGGA	
	AGACACAGCAATTCCTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACACGCAGAA	
	GCA TCGACACTGATGGAAATGAAGGCATACCAACCAATCTCGAGAGCAC	
	TGGAAGGGAAGGACTGAAGGACAAAGAACTCGCCGCTGAACCTGTGCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 0 2】

	GGAACTGCAGGACGAAATCGGAACAGCATTCCTCGCTGTTCAAAGACAGAC GAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAAATCCAGCCGGAATCCTGG AAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAAGTTCTGTCAGATCTCGCT GAAAGCACTGAAGAAATCGTCCCGCTGATGGAAACAGGGAAAGAGATAC GACGAAGCATGCGCAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAAGAAAGACA CAGAAAGAAAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGAAATCAGAAA CCCGTCTGCTGAGAGCACTGTCTGCAGGCAAGAAAGTCAACACGGA GTCGTCAGAAAGATAAGGATCGCCGGCAAGAAATCCACATCGAAACAGCAA GAGAAGTCCGAAAGTCTGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAAAGAGACA GGAAGAAAACAGAAAGGACAGAGAAAGGCAGCAGCAAGTTCAAGAA TACTTCCCGAATTCGTCCGAGAACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGC TGAGACTGTACGAAACAGCAGCACGGAAGTGCCTGTAATCGGGAAGGA AATCAACCTGGGAAGACTGAACGAAAGGATACGTGAAATCGACCAAC GCACCTGCCGTTCTCGAGAACATGGGACGACTCGTTCAACAAAGGTCC TGGTCTCTGGATCGGAAACCAAGAACAGGAAACAGACACCGTACGA ATACTCAACGGAAAGGACAACTCGAGAGAAATGGCAGGAATTCAGGGCA AGAGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGATCGAAGAAAGCAGAGAAATCCTGC TGCAGAAAGTTCGACGAAAGACGGATTCAAGGAAAGAAACCTGAACGACAC AAGATACGTCAACAGATTCTGTGCCAGTTCGTGCGACAGCAATGAGA CTGACAGGAAAGGAAAGAAAGAGAGTCTTCGCATCGAACGGACAGATCA CAAACTGCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAAGTCAAGGCAGAAAA CGACAGACACCAAGCACTGGACGCACTCGTCTCGCATGCTCGACAGTC GCAATGCAGCAGAAAGATCAACAGATTCTGTCAAGATACAAGGAAATGAACG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 0 3】

CATTGACGGAAAGACAAATCGACAAAGGAACACAGGAGAAAGTCCCTGCCACCA GAAAGACACACTTCCCGCAGCCGTGGGAATTCTTCGCACACAGGAAGTCAATG ATCAGAGTCTTCGGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAAATTCGAAAGAAAGCAG ACACACTGGAAAGCTGAGAAACACTGCTGGCAGAAAGCTGTCTCGTCCGAG ACCGGAAGCAGTCCACGAATACGTCAACCCGCTGTTCGTCTCGAGAGCA CCGAACAGAAAGATGTCGGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCCGG CAAAAGAGACTGGACGAAAGGAGTCTCGGTCTGAGAGTCCCGCTGACACA GCTGAAGCTGAAGGACCTGGAAAGATGGTCAACAGAGAAAGAGAAACCG AAGCTGTACGAAGCACTGAAGGCAAGACTGGAAAGCACACAAAGGACGACC CGGCAAAAGGCATTCCGAGAAACCGTTCTACAAAGTAGGACAAGGCAGGAAA CAGAACACAGCAGGTCAAGGCAGTCAAGTCCAGAGTCCAGAAAGACA GGAGTCTGGGTCAGAAACCAACCGGAATCGCAGACAAACGCAACAATGG TCAGAGTAGACGTCTTCGAAAGGGAGACAAAGTACTACCTGGTCCCGAT CTACTCGTGGCAGGTCCCAAGGGAAATCCCTGCCGGACAGAGCAGTCGTC CAGGGAAAGGACGAAGAGACTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACT TCAAGTTCTCGCTGCACCCGAAACGACCTGGTCCGAAGTCAACACAAAGAA GGCAAGAAATGTTCCGGATACTTCGCATCGTGCCACAGAGGAACAGGAAAC ATCAACATCAGAAATCCACGACCTGGACCCACAAAGATCGGAAGAACGGAA TCCGTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACAGCACTGTCTGTTCCAGAGTACCA GATCGACGAACTGGGAAAGGAAATCAGACCGTGCAGACTGAAAGAAAGGA CCGCCGGTCAAGATCCGGAAAGAGAAACAGCAGACGGATCCGAAATTCGAAAT CGCCGAAGAAAGAGAAAGGTCGAAATGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 0 4】

Neisseria meningitidis Cas9をコードするORF (開始コードまたは終止コードなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である)	GCAGCATTTCAAAGCCGAACTCGATCAAACTACATCCTGGGACTGGACATCG GAATCGCATCGGTCCGATGGGCAATGGTCGAAATCGACGAAAGAGAAAA CCCGATCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAGAA GTCCGAAAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAGACTGGCAAGAT CGGTCAAGAAAGACTGACAAAGAAAGAGACACACAGACTGCTGAGAAACAAG AAGACTGCTGAAGAGAGAGAAAGAGTCCCTGACGGCAGCAAACTTCGACGAA AACGGACTGATCAAGTCGCTGCCGAACACACCCGTGGCAGCTGAGAGCAG CAGCACTGGACAGAAAGCTGACACCCGCTGGAAATGGTCGGCAGTCCCTGCT GCACTGTATCAAGCACAGAGGATACCTGTGCGCAGAGAAACGAAAGGA GAAACAGCAGACAAAGGAACCTGGGAGCACTGCTGAAGGAGTCCGACGAA ACGCACACGCACCTGCAGACAGGAGACTTCAGAACACCCGCCAGAACTGGC ACTGAACAAGTTCGAAAGGAAATCGGGACACATCAGAAACCAAGAGATCG GACTACTCGCACACATTTCTCGAGAAAGGACCTGCAGGCAGAACTGATCC TGCTGTTCGAAAGCAGAAAGGAATTCGGAAACCCGCCACGTCTCGGGAGG ACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCTGATGACACAGAGACCCGCCACTG TCGGGAGACCGCAGTCCAGAAAGATGCTGGGACACTGCACATTCCGAACCGG CAGAACCGAAGGCAGCAAGAAACACATACACAGCAGAAAGATTCTCTG GCTGACAAAGCTGAACAACTGAGAAATCCTGGAACACAGGGATCGGAAAGA CCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACACTGATGGACGAACCGTACAGAA AGTCGAAGCTGACATACGCACAGGCAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAAGA CACAGCATTTCTTCAAGGACTGAGATACGGAAAGGACAAACGACAGCA TCGACACTGATGGAAATGAAGGCATACCAAGCAATCTCGAGAGCACTGG AAAAGGAAGGACTGAAGGACAAAGAGTCCGCCGCTGAACCTGTGCCCCGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 0 5】

ACTGCAGGACGAAAATCGGAAACAGCAATTCTCGCTGTTCAAAGACAGACGAA GACATCACAGGAAGACTGAAAGGACAGAAATCCAGCCGGAAATCCTGGAAAG CACTGCTGAAAGCACATCTCGTTCCGACAAAGTTCTGTCACAGATCTCGCTGAA GGCAGTGAAGAGAAATCGTCCCGCTGATGGAAACAGGGAAAGAGATACGAC GAAGCATGCCGAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAGAAAGAAACACAG AAGAAAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGAAATCAGAAACCC GGTCGTCCTGAGAGCACTGTGCGCAGGCAAGAAAGGTCAACAACGGAGTC GTCAGAAAGTACGGATCCCGGCAAGAAATCCACATCGAAACAGCAAGAG AAGTCGGAAAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAAAGAGACAGGA AGAAAACAGAAAGGACAGAGAAAGGACAGCAAGTTCAGAGAAATAC TTCCCGAACTTCGTCGGAGAACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGA GACTGTACGAACAGCAGCACGGAAGTGCCCTGTACTCGGGAAGGAAAT CAACCTGGGAAGACTGAACGAAAGGATACGTGAAATCGACCAAGCA CTGCCGTTCTCGAGAACATGGGACGACTCGTTCAACAAACAGGTCTCTGG TCCTGGGATCGGAAACCAAGAACAAAGGAAACCAAGACACCGTACGAATA CTTCAACGGAAAGGACAACTCGAGAGAAATGGCAGGAATCAAGGCAAGA GTCGAAACATCGAGATTCCCGAGATCGAAGAAAGCAGAGAAATCCTGCTGC AGAAAGTTCGACGAAAGACGGATTCAAGGAAAGAAACCTGAACGACACAAAG ATAAGTCAACAGATTCTGTGCCAGTTCTGTCGACAGACAGAAATGAGACTG ACAGGAAAGGGAAGAAAGAGAGTCTTCGCAATCGAACGGACAGATCACAA ACCTGCTGAGAGGAATTCCTGGGGACTGAGAAAGGTCAGAGCAGAAACGA CAGACACCAAGCACTGGACGACAGTCGTGCTCGCATGCTCGACAGTCGCA ATGCAGCAGAAAGATCACAAAGATTCTGTCAAGATACAAAGAAATGAACGCAT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 0 6】

TCGACGGAAAGACAAATCGACAAAGGAAACACAGGAGAAAGTCCCTGCACCAGAA GACACACTTCCGCAGCCCGTGGGAATTCTTTCGCACAGGAAGTCAATGATC AGAGTCTTTCGGAAAGCCGGACGGAAAGCCCGAAATTCGAAAGAAAGCAGACA CACTGGAAAGGCTGAGAAACACTGCTGGCAGAAAGGCTGTCGTCGAGACCC GGAAGCAGTCCACGAATACGTCACACCCGCTGTTCTGTCGAGAGCACCCG AACAGAAAGATGTCCGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCCGGCAA AGAGACTGGACGAAAGGAGTCTCCGGTCTCTGAGAGTCCCGCTGACACAGCT GAAAGCTGAAGGACCTGGAAAGAGATGGTCAACACAGAGAAAGAAACCGAAG CTGTACGAAGCACCTGAAGGCAAGACTGGAAAGCACACACAGGACGACCCCG CAAAGGCAATCCGACAGACCGTTCTACAAGTACGACAAAGGCAGGAACAG AACACAGCAGGTCAAAGGCAGTCAAGTCCAGTCCAAACAGGTCACAGAAACAGGA GTCTGGGTCAGAAACCAACACCGGAATCGCAGACAAACGCAACAAATGGTCA GAGTAGACGTCTTCGAAAGGGAGACAAAGTACTACCTGGTCCCAGATCTA CTCGTGGCAGGTCCCAAGGGGAATCCTGCCGGACAGAGCAGTCGTCCAG GAAAGGACGAAGAAGACTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACTTCA AGTTCTCGCTGCACCCGAACGACCTGGTCCGAAGTCAACACAAAGAACGC AAGAATGTTTCGGATACTTCGCATCGTGCCACACAGAGGAACAGGAACATC AACATCAGAAATCCACGACCTGGACCAACAGATCGGAAAGAACGGAAATCC TGGAAAGGAATCGGAGTCAAGACAGCACTGTCGTTCCAGAAAGTACCAGAT CGACGAACCTGGGAAAGGAATCAGACCGTGCAGACTGAAAGAAAGAGACCG CCGGTCAGATCCGGAAAGAGAAACAGCAGACGGATCCGGAATTCGGAATCCG CGAAGAAAGAGAAAGGTCCGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 0 7】

配列番号65を 含む転写産物 (N e i s s e r i a m e n i n g i t i d i s C a s 9 をコードする)	26 7	GGGAGACCCAAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGATCCGGCCACC ATGGCAGCATTCAAAGCCGAACTCGATCAACTACATCCTGGGACTGGACA TCGGAAATCGCATCGGTCCGATGGGCAATGGTCGAAATCGACGAAGAAGA AAACCCGATCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCA GAAATCCCGAAGACAGGAGACTCGCTGGCAAATGGCAAGAAAGACTGGCAA GATCGGTTCAGAAAGACTGACAAAGAAGAAGACACAGACTGCTGAGAAC AAGAAGACTGCTGAAGAGAGAAAGAGTCTGTCAGGCAGCAAACTTCGAC GAAACCGGACTGATCAAGTCGCTGCCGAACACACCCGTGGCAGCTGAGAG CAGCAGCACTGGACAGAAAGCTGACACCCGCTGGAATGGTCGGCAGTCTT GCTGCACCTGATCAAGCACAGAGGATACCTGTCGCAGAGAAAGAACGAA GGAGAAACAGCAGACAAAGGAACCTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTCCGAG GAAACGCACACGCACCTGCAGACAGGAGACTTCAGAACACCCGGCAGAACT GGCAGTGAACAAGTTCGAAAAGGAATCGGGACACATCAGAAACCAAGAGA TCGGACTACTCGCACACATTCCTCGAGAAAGGACCTGCAGGCAGAACTGA TCCTGCTGTTCCGAAAAGCAGAAAGGAATTCGGAAACCCGACCTCTCGGG AGGACTGAAGGAAGGAATCCGAAACACTGCTGATGACACAGAGACCCGGCA CTGTCGGGAGACGCAGTCCAGAAAGATGCTGGGACACTGCACATTCGAAC CGGCAGAACCCGAAGGCAGCAAGAACACATACACAGCAGAAAGATTCTAT CTGGCTGACAAAGCTGAACCACTGAGAAATCCTGGAACAGGGATCGGAA AGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACACTGATGGACGAACCGTACA GAAAGTCGAAGCTGACATACGCACAGGCAAGAAAGCTGCTGGGACTGGA AGACACAGCAATCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACAAACGACAGAA GCATCGACACTGATGGAAATGAAGGCATACCAAGCAATCTCGAGAGCAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 0 8】

TGGAAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAAGTCCGCGCTGAAACCTGTCCGCC GGAACTGCAGGACGAAATCGGAACAGCATTCCTCGCTGTTCAAGACAGAC GAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAAATCCAGCCGGAAATCCTGG AAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAAGTTCTGTCAGATCTCGCT GAAGGCACCTGAGAAAGAAATCGTCCCGCTGATGGAAACAGGGAAGAGATAC GACGAAGCATGCCAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAAGAAAGAAACA CAGAAAGAAAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGAAATCAGAAA CCCGGTCGTCCTGAGAGCACTGTCCGAGGCAAGAAAGGTCATCAACCGGA GTCGTCAGAAAGATACGGATCGCCGGCAAGAAATCCACATCGAAACAGCAA GAGAAAGTCGGAAAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGCAAGCAAAATCGAAAGAGACA GGAAAGAAACAGAAAGGACAGAGAAAGGCAGCAGCAAAATTCAGAGAA TACTTCCCGAACTTCGTCGGAGAACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGC TGAGACTGTACGAAACAGCAGCACGGAAAGTGCCCTGTAAGTCCGGAAAGGA AATCAACCTGGGAAAGACTGAACGAAAGGGATACGTGGAATTCGACCAAC GCACTGCCGTTCTCGAGAAACATGGGACGACTCGTTCAACCAACAAAGGTCG TGGTCCTGGGATCGGAAACACAGAAACAGGAAACAGACACCGTACGA ATACTTCAACGGAAAGGACAACTCGAGAGAAATGGCAGGAATTCAGGGCA AGAGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGATCGAAGAAAGCAGAGAAATCCTGC TGCAGAAAGTTCGACGAAAGACGGATTCAAGGAAAGAAACCTGAACGACAC AAGATACGTCAACAGATTCTGTGTCAGTTCGTCGACAGCAGAAATGAGA CTGACAGGAAAGGAAAGAAAGAGAGTCTTCGCAATCGAACGGACAGATCA CAACCTGCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAAGGTCAGAGCAGAAAA CGACAGACACCAACGCACTGGACGCAGTCGTGTCGATGCTCGACAGTC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 0 9】

	GCAATGCAGCAGAAAGATCACAAAGATTTCGTCAGATACAAAGGAAATGAACG CATTCGACGGAAAAGACAAATCGACAAAGGAAACAGGAGAAGTCCCTGCACCA GAAACACACTTCCTCCGACGCGTGGGAATTCTTCGCACAGGAAGTCAATG ATCAGAGTCTTCGGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAATTCGAAGAAAGCAG ACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAGCTGTCGTCGAG ACCGGAAGCAGTCCACGGAATACGTCAACACCGCTGTTCTGTCGAGAGCA CCGAACAGAAAGATGTCCGGACAGGGACACATGGAAAACAGTCAAGTCGG CAAGAGACTGGACGAAGGAGTCTCGGTCTGTGAGTCCCGCTGACACA GCTGAAGCTGAAGGACCTGGAAGAGTGGTCAACAGAGAAAGAGAACCG AAGCTGTACGAAGCACGTGAAGGCAAGACTGGAAGCACACAAGGACGACC CGGCAAGGCATTCCGAGAACCGTTCTACAAAGTACGACAAAGGCAGGAAA CAGAACACAGCAGGTCAAGGCAGTCAAGAGTCAAGAGTCCAGAGTCCAGAAAGACA GGAGTCTGGGTCAGAAACCAACAACGGGAATCGCAGACAAACGCAACAATGG TCAGAGTAGACGTCTTCGAAGAAAGGGAGACAAAGTACTACCTGGTCCCGAT CTACTCGTGGCAGGTCGGCAAGGGAAATCCTGCCGGACAGAGCAGTCCGTC CAGGGAAGGACGAAGAAAGACTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACT TCAAGTTCTCGCTGCACCCGAACGACCTGGTCCGAAGTCAACACAAAGAA GGCAAGAAATGTTCCGGATACTTCGCATCGTGCCACAGAGGAACAGGAAAC ATCAACATCAGAAATCCACGACCTGGACCAACAAGATCGGAAGAAACGGAA TCCGTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACAGCACTGTGCTTCCAGAAAGTACCA GATCGACGAACTGGGAAAGGAAATCAGACCGTGCAGACTGAAGAAAGAGA CCGCCGGTCAGATCCGGAAAGAGAAACAGCAGACCGATCGGAATTCCGAAT CGCCGAAGAAAGAGAAAGGTCCGAATGATAGCTAGCTCGAGTCTAGAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 1 0】

	GGCCCGTTTAAACC CGCTGATCAGCCCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCA	
	GCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCTCGTGCCTTCTTGACCTGGAAAGGT	
	GCCACTCCCACTGCTCTTCCCTAATAAATGAGGAATTGCCATT	
	GTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAG	
	CAAGGGGAGGATTGGGAAGACAA TAGCAGGCATGCTGGGGATGCCGCTG	
	GGCTCTATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 1 1】

Neisseria meningitidis Cas9の アミノ酸配列	26 8	MAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRFERA EVPKTDSLAMARRLARSVRRLTRRRRAHRLLRTRRLKREGVLQAANFD ENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLIILIKIRGYLSQRKNE GETADKELGALLKGVAGNAIHALQTGDFRTPAELALNKFESGHIIRNQR SDYSHTFSRKDLQAEILLLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIEILLMTQRPA LSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTNNLRILEQGSF RPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQAARKLLGLEDTAFKGLRYGKDNAE ASTLMEMKAYIIAISRALEKEGLKDKKSPNLSPELQDEIGTAFSLFKTD EDITGRCLKDRIQPEILEALLKIIISFDKVFQISLKALRRIVPLMEQGKRY DEACAEIYGDHYGKKNTTEEKIYLPPIPADEIRNPVLRALSQARKVING VRRYGSPIRIHETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFRE YFPNFVGEPKSKDILKRLRYEQHGKCLYSGKEINLGRNLNEKGYVEIDH ALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENGKNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKA RVETSRFPRSKKQRILLQKFDDEGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADMR LTGKGGKKRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTV AMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKTHFPQWFEFFAQEVM IRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLLAEKLSRPEAVHEYVTPLFVSRA PNRKMSGQGHMETVKSARKLDEGVSVLRVPLTQLKLDLEKMVNRREP KLYEALKARLEAIKDDPAKAFAPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQKT GVVVRNIINGIADNATMVRVDVFEEKDKYYLVPIYSWQVAKGILPDRAVV QGKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMFQYFASCHRGTCN INIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFKQKYQIDELGKEIRPCRLKKR PPVRSRKRTADGSEFESEPKKKRKE

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 1 2】

	未使用	2 6 9
G 5 0 2 ガイ ド RNA	m A * m C * m A * C A A A U A C C A G U C C A G C G G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	2 7 0
G 5 0 9 ガイ ド RNA	m A * m A * m A * G U U C U A G A U G C C G U C C G G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	2 7 1
G 5 3 4 ガイ ド RNA	m A * m C * m G * C A A A U A U C A G U C C A G C G G U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m U m G m C m U * m U * m U * m U	2 7 2

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 1 3】

eGFPのDN Aコ-ド配列	TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCC GGAGACGGTCACAGCTTGTCGTAAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCC CGTCAGGGCGGTCAGCGGCTGTTGGCGGCTGTCGGGGCTGGCTTAACCT ATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCCATATGCGGTGTGA AATACCGCACAGATCCGTAAAGAGAAAAATACCGCATCAGCGGCCATTCC CCATTACGGCTGCCCAACTGTTGGCAAGGGCATCCGTGCGGGCTCTT CGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGCGGATTAAAG TTGGGTAAAGCCAGGGTTTCCCAAGTCAAGACGTTGTAAACGACGGCC AGTGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGTCCCGAGTCGGCGTCCAGC GGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTTGCCAGGCCATTATCGGATCCAT GGTAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACGGGGTGGTGGCCATCCTGGTC GAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAAGCTGTCCGGCGAGG GCGAGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCACTCTGCAC CACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCAACCTCGTGACCAACCTGACC TACGGCGTGCACTGCTTCAGCCGCTACCCGACCAATGAAGCAGCACG ACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACCAT CTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCCGCGGAGGTGAAGTTC GAGGGCGACACCTGGTGAAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCA AGGAGGACGGCAACATCCGTGGGGCACAAAGCTGGAGTACAACACAG CCACAACGCTATATCATGGCCGACAAAGCAGAAAGAACGGCATCAAGGTG AACTTCAAGATCCGCCACAAATCCGAGGACGGCAGGTGCAGCTCGCCG ACCACTACCAGCAGAAACCCCAATCGGGGACGGCCCGCTGCTGCTGCC CGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCCGCCCTGAGCAAGACCCCAAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 1 4】

	GAGAAAGCGCGATCACATGGTCCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGA TCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATAGGAATTAATGCAGTCT AGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGATTAAGAGAAAG AAAATGAAGATCAATAGCTTATTCTCTCTCTTTTCTTTTCTGTTGGTGT AAAGCCAAACACCCCTGTCTAAAAAACAATAAATTTCTTTAATCATTTTGGC TCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAGAAA AAAAAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANA AANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAAT CTAGACTTAAAGCTTGATGAGCTCTAGCTTGGCGTAAATCATGCTCATAGC TGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACACAATAGC AGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGTGCCCTAATGAGTGAGCTAA CTCACATTAAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAATACC TGTCGTGCCAGCTGCATTAAATGAATCGGCCAACCAGCGGGGAGAGGCGG TTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGGCG TCGGTCGTTCCGCTCGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAA TACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATACGCAGGAAGAACAATGTGAGC AAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAAGCCCGCTTGTGGCG TTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCT CAAGTCAGAGGTGGGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCGGACCCCTGCCGCTT ACCGGATACCTGTCCGGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTC ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTAGGTGCTTCCGCTCCAA GCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCCCTTA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 1 5】

TCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAAACCCGGTAAGACACGACTTATCGC CACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG CGGTGCTACAGAGTTCTTGAAAGTGGTGCCCTAACTACGGCTACACTAGA AGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAA AAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAACCCGCTGGTAGCGG TGGTTTTTTGTTTGCAAAGCAGCAGATTACGGGCAGAAAAAAGGATCT CAAGAAAGATCCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACG AAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAAGGATCTT CACCTAGATCCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGT ATATATGAGTAACCTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGG CACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTTCATCCATAGTTGCCCTGACT CCCCGTGCTGTAGATAAATACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT CAGCAATAAACAGCCAGCCGGAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGTCCTGC AACTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTATAATTGTTGCCGGGAAGCTAGA GTAAGTAGTTGCCCAAGTTAAATAGTTTGCCCAACGTTGTTGCCATTGCTA CAGGCATCGTGGTGTACCGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTC CGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAA AAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAAGAAGTAAGTTGG CCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTCTTAC TGTCATGCCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTCAACCC AAGTCATTTCTGAGAAATAGTGTAAGCGGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCCCG CGTCAATACGGGATAATACCGCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAAGTGCT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 1 6】

	CATCATTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCG CTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAAACCCACTCGTGACCCCAACTGATCTT CAGCATCTTTTACTTTCACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAG GCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAGGGCGACACGGAAATGTTGAATA CTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCAATTATCAGGGTTATT GTCTCATGAGCGGATACATAATTGAATGTATTAGAAAAATAACAAAT AGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAA ACCATTTATTATCATGACATTAACTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGC CCTTTCGTCG	27 4
	未使用	
CMV-1 5' UTR	CAGATCGCCTGGAGACGCCCATCCACGGCTGTTTTTGACCTCCAT	27 5
CMV-2 5' UTR	AGAAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGCGCCGGGAACGG	27 6
CMV-3 5' UTR	TGCAATTGGAACGCGGATTCCCCCGTGCCCAAGAGTGACTCACCG	27 7
SV40 NLS S	PKKKRKV	27 8
例示的nNLS 1	LAARKSRRTT	27 9
例示的nNLS 2	QAARKSRRTT	28 0

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 1 7】

例示的なNLS 3	P A P A K R E R T T	2 8 1
例示的なNLS 4	Q A A K R P R T T	2 8 2
例示的なNLS 5	R A A K R P R T T	2 8 3
例示的なNLS 6	A A A K R S W S M A A	2 8 4
例示的なNLS 7	A A A K R V W S M A F	2 8 5
例示的なNLS 8	A A A K R S W S M A F	2 8 6
例示的なNLS 9	A A A K R K Y F A A	2 8 7
例示的なNLS 1 0	R A A K R K A F A A	2 8 8
例示的なNLS 1 1	R A A K R K Y F A V	2 8 9
代替SV40 NLS	P K K K R R V	2 9 0
ヌクレオプテラス ミンNLS	K R P A A T K K A G Q A K K K K	2 9 1

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 1 8】

SV40 NLS の例示的なコード配列	CCGAAAGAAAGAGAAAGGTC	29 2
NLS1の例示 的なコード配列	CTGGCAGCAAAAGAGAAAGCAGAAACAACA	29 3
NLS2の例示 的なコード配列	CAGGCAGCAAAAGAGAAAGCAGAAACAACA	29 4
NLS3の例示 的なコード配列	CCGGCACCCGGCAAAAGAGAAAGAAACAACA	29 5
NLS4の例示 的なコード配列	CAGGCAGCAAAAGAGAAAGCAGAAACAACA	29 6
NLS5の例示 的なコード配列	AGAGCAGCAAAAGAGAAAGCAGAAACAACA	29 7

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 1 9】

NLS 6 の例示 的なコード配列	G C A G C A G C A A A A G A G A A A G C T G G A G C A T G G C A G C A	2 9 8
NLS 7 の例示 的なコード配列	G C A G C A G C A A A A G A G A G T C T G G A G C A T G G C A T T C	2 9 9
NLS 8 の例示 的なコード配列	G C A G C A G C A A A A G A G A A A G C T G G A G C A T G G C A T T C	3 0 0
NLS 9 の例示 的なコード配列	G C A G C A G C A A A A G A G A A A G T A C T T C G C A G C A	3 0 1
NLS 1 0 の例 示的なコード配 列	A G A G C A G C A A A A G A G A A A G G C A T T C G C A G C A	3 0 2
NLS 1 1 の例 示的なコード配 列	A G A G C A G C A A A A G A G A A A G T A C T T C G C A G T C	3 0 3

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 2 0】

代替SV40 NLSの例示的 なコード配列	CCGAAAGAAAGAAAGAAAGAGTC	30 4
例示的なKoz ak配列	g c c g c c R c c A U G G	30 5
	未使用	30 6

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 2 1】

開始コードおよび終止コードを有する、表 4 の長い半減期コードを使用した C a s 9 O R F	3 0 7	ATGGACAAAGAAAGTACTCTATCGGGTTTGGACATCGGTACCAACTCTGTCTG GTTGGGCGGTCAATCACCAGCGAATACAAAGGTCCCATCTAAGAAGTTCAA GGTCTTGGGTAAACCGACAGACACTCTATCAGAAGAATCTTGATCGGT GCCCTTGTGTCTCGACTCTGGTGAAACCGCCGAAAGCCACAGATTGAAGA GAACCGCCAGAAAGAAATACACACAGAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACTT GCAAGAAATCTTCTCTAACGAAATGGCCCAAGTCCAGCACTCTTCTCTTC CACAGATTGGAAGAAATCTTCTTGGTCGAAGAAGACAAAGAAAGCAAGAAA GACACCCAAATCTTCGGTAAATCTCGTCGACGAAGTCGCCATCCACGAAAA GTACCCCAACCACTCTACCACTTGAGAAAGAAAGTTGGTCGACTCTACCGAC AAGGCCGACTTGAGATTGATCTACTTGGCTTGGCCCAATGATCAAGT TCAGAGGTCACTTCTTGATCGAAGTGACTTGAAACCCAGACAACTCTGA CGTCGACAAAGTTGTTCAATCCAAATGGTCCAAACTACAACTTGTTC GAAAGAAACCCAAATCAACGCCCTCTGGTGTGACGCAAGGCCATCTTGT CTGCCAGATTGTCTAAGAGCAGAAAGATTGGAAGAACTTGATCGCCCAATT GCCAGGTGAAAGAAAGAACCGTTTGTTCGGTAACTTGATCGCCCTGTCT TTGGGTTTGACCCCAAACTTCAAGTCTAACTTCGACTTGGCCGAAAGCG CCAAAGTTGCAATTGTCTAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAACTT GTTGGCCCAATCGGTGACCAATACGCCGACTTGTCTTGGCCGCCAAG AACTTGTCTGACGCCATCTTGTGTCTGACATCTTGAGAGTCAACACCG AAATCACCAAGGCCCAATGTCTGCCCTCTATGATCAAGAGATACGACGA ACACCAACCAAGACTTGACCTTGTGAAAGCCCTTGGTCAGACAACTTG CCAGAAAAGTACAAAGGAAATCTTCTTCGACCAATCTAAGAACGGTTACG CCGGTTACATCGACGGTGGTGCCCTCTCAAGAAAGAAATCTACAAAGTTCAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 2 2】

CAAGCCAAATCTTGGAAAAGATGGACGGTACCGAAGAAATTGTTGGTCAAAG TTGAAACAGAGAAAGACTTGTGAGAAAAGCAAAAGAACTTCGACAAACGGTT CTATCCCAACACCAAAATCCACTTGGGTGAATTGCACGCCATCTTGAGAAAG ACAAGAAGACTTCTACCCATCTTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAA AAGATCTTGACCTTCAGAAATCCCATACCTACGTCGGTCCATTGGCCAGAG GTAACAGCAGATTCCGCTGGATGACCAGAAAGTCTGAAGAAACCAATCAC CCCATGGAACTTCGAAAGAAAGTCGTCGACAAAGGTGCCCTCTGCCCAAATCT TTCATCGAAAAGAAATGACCAACTTCGACAAAGAACTTGCCAAACGAAAAGG TCTTGCCAAAAGCACTCTTTGTTGTACGAATACTTCACCGTCTACAAAGCA ATTGACCAAGGTCAAGTAGGTCACCGAAGGTATGAGAAAGCCAGCCCTTC TTGTCTGGTGAACAAAAGAAAGGCCATCGTCGACTTGTGTTCAAAGACCA ACAGAAAAGGTCACCGTCAAGCAATTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGAT CGAATGCTTCGACTCTGTGCAAAATCTCTGGTGTGGAAGACAGATTCAAAC GCCTCTTTGGGTACCTACCAAGACTTGTGGAAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCTTGGACAAACGAAAGAAACGAAAGACATCTTGGAAAGACATCGTCTT GACCTTGACCTTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGATTGAAG ACCTACGCCCCACTTGTTCGACGACAAAGGTCAATGAAGCAATTGAAGAGAA GAAGATACACCGGTTGGGGTAGATTGAGCAGAAAAGTTGATCAACGGTAT CAGAGACAAAGCAATCTGGTAAGACCACTCTTGGACTTCTTGAAAGTCTGAC GGTTTCGCCAACACAGAAACTTCATGCAATTGATCCACGACGACTCTTTGA CCTTCAAGGAAGACATCCAAAAGGCCCAAGTCTCTGGTCAAGGTGACTC TTTGACCGAACACATCGCCCAACTTGGCCGGTCTCCAGCCCATCAAGAAAG GGTATCTTGCAAAACCGTCAAGGTCGTGACGCAATTGGTCAAGGTCATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 2 3】

GTAGACACAAAGCCAGAAAACATCGTCAATCGAAATGGCCAGAGAAAAACCA AAACACCCCAAAGGGTCAAAAAGAAACAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAAATC GAAGAAAGGTATCAAGGAATTTGGGTCTCAAAATCTTGAAGGAACACCCAG TCGAAAAACACCCCAATTGCAAAACGAAAAGTTGTACTTTGTACTACTTGCA AAACGGTAGAGACATGTACGTCGACCAAGAAATTGGACATCAACAGATTG TCTGACTACGACGTCGACCAACATCGTCCACAAATCTTTCTTGAAGGACG ACTCTATCGACAAACAAAGGTCTTGACCAAGATCTGACAAAGAACAGAGGTAA GTCAGACAAACGTCCCATCTGAAGAAGTCGTCAGAAGATGAAGAAGTAACTAC TGGAGACAAATTGTTGAACGCCAAGTTGATCACCCAAAGAAAGTTCGACA ACTTGACCAAGGCCGAAAGAGGTGGTTTGTCTGAAATTGGACAAGGCCGG TTTCATCAAGAGACAAATTGGTCGAAACCAAGACAAATCACCAAGCACGTC GCCCAAATCTTGACAGCAGAAATGAACACCAAGTACGACGAAAACGACA AGTTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACCTTGAAGTCTAAGTTGGTCTC TGACTTCAGAAAGGACTTCCAAATTTACAAAGTCAAGAGAAATCAACAAAC TACCAACACGCCCAAGACGCTACTTGAAACGCCGTCGTCGGTACCCCT TGATCAAGAAAGTACCCAAAGTTGGAATCTGAAATTCGTCTACGGTGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAAGATGATGCCCAAGTCTGAACAAAGAAATC GGTAAGGCCACGCCCAAGTACTTCTTCTACTCTAACATCATGAACCTCT TCAAGACCGAAATCACCTTGGCCAAACGGTGAAATCAGAAAGAGACCATTT GATCGAAACCAACGGTGAAACCGGTGAAATCGTCTGGGACAAAGGTTAGA GACTTCGCCACCGTCAGAAAGGTCTTGTCTATGCCACAAGTCAACATCG TCAAGAAAGACCGAAGTCCAAACCGGTGGTTTCTCTAAGGAATCTATCTT GCCAAAGAGAAACTCTGACAAAGTTGATCGCCAGAAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 2 4】

	CCAAAGAGAGTACGGTGGTTTCGACCTCTCCAAACCGTCGCCCTACTCTGTCT TGGTCGTCGCCAAGGTCGAAAAGGGTAAGTCTAAGAAAGTTGAAGTCTGT CAAGGAATTGTTGGGTATCACCATCATGGAAAGATCTTCTTTCGAAAAAG AACCCAAATCGACTTCTTTGGGAAGCCAAAGGTTACAAAGGAAGTCAAGAAAGG ACTTGATCATCAAGTTGCCAAAGTACTCTTTTGTTCGAAATTGGAAAAACGG TAGAAAAGAGAAATGTTGGCCCTCTGCCGGTGAAATTGCAAAAGGGTAACGAA TTGGCCCTTGCCCATCTAAGTACGTCAACTTCTTGTAAGTGGCCCTCTCACT ACGAAAAGTTGAAGGTTCTCCAGAAAGACAAACGAAACAAAGCAATTGTT CGTCGAAACAAACAAAGCACTACTTGGACGAAATCATCGAAACAAATCTCT GAAATTCCTAAGAGAGTCACTCTTGGCCGACGCCAACTTGGACAAAGTCT TGTCCTGCCCTACAACAAGCACAGAGACAAAGCCAAATCAGAGAAACAAGCCGA AAACATCATCCACTTGTTCACCTTGACCAACTTGGGTGCCCCAGCCGCC TTCAAAGTACTTCGACACCAACCATCGACAGAAAGAGATACACCTCTACCA AGGAAAGTCTTGGACGCCAACCTTGATCCACCAATCTATCACCCGGTTTGTA CGAAACCCAGAAATCGACTTGTCTCAATTGGGTGGTGACCGTGGTGTCT CCAAAGAGAGAGAGAAAGGTCTAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 2 5】

開始コドンおよび終止コドンを示す、表4のUリッヂコドンを使用したCa	ATGGA TAAAAA TATTCTAT TGGT TTAGATA TTTGGTACTAA TTTCTGTTG	30
s 9 ORF	GTGGGCTGTTAT TACTGATGAATATAAAGTTCCTTCTAAAAAATTTAA	8
	AGTTT TAGGTAATACTGATCGTCATTCATTAAAAAATTTAAATGGT	
	GCTTTATTA TTTGATTC TGGTGAAC TGTGAGCTACTCGTTTAAAAAC	
	G TACTGCTCGTCGTTAT TACTCGTGGTAAAAAATCGTATTTGTTATTT	
	ACAAGAAA TTTTCTCTAATGAAA TGGCTAAAGTTGATGATTCCTTTT	
	CATCGTTTAGAAGAATCTTTT TTAGTTGAAGAAGATAAAAAACATGAAC	
	GTCATCCTATTTT TGGTAATATTGTTGATGAAGTTGCTTATCATGAAAA	
	ATATCCTACTATTTATCATTTACGTAAAAAATTAGTTGATTCCTACTGAT	
	AAAGCTGATTTAGGTTTAA TTTATTTAGCTTTAGCTCATATGATTAAT	
	TTCGTGGTCA TTTTAA TTTGAAGGTGATTTAAATCCTGATAATTCGTA	
	TGTTGATAAAATTA TTTATTCAA TTAGTTCAAA CTTATAAATCAATTAAT	
	GAAGAAAA TCCTATTAATGCTTCTGGTGTGATGCTAAAGCTATTTTAT	
	CTGCTCGTTTATCTAAATCTCGTCGTTTAGAAAA TTTAAATTGCTCAATT	
	ACCTGGTGAAAA AAAAAATGCTTTATTTGGTAA TTTAAATGCTTTATCT	
	TTAGGTTTAACTCCTAAATTTTAAA TCTAA TTTGATTTAGCTGAAGATG	
	CTAAATTAACAATTA TCTAAAAGATAC TTTATGATGATGATTTAGATTAAT	
	ATTAGCTCAAA TTTGGTGATCAATA TGTGATTTATTTTAGCTGCTAAA	
	AA TTTATCTGATGCTATTTTATTA TCTGATATTTTACGTGTTAATAC TG	
	AAATTACTAAAGCTCCTTTTATCTGCTTCATGATTAACGTTATGATGA	
	ACATCATCAAGATTTAACTTTATTAAAAGCTTTAGTTGCTCAACAATTA	
	CCTGAAAAATATAAGAAA TTTTTTTTGTGATCAATCTAAAAATGGTTATG	
	CTGGTTATATTTGATGGTGGTCTTCTCAAGAAGAA TTTTATAAATTTAT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 2 6】

TAAACCTATTTTAGAAAAAATGGATGGTACTGAAAGAAATTATTAGTTAAA TTAAATCGTGAAAGATTTATTACGTAAACAAACGTACTTTTGTGATAAATGGTT CTATTCCCTCATCAAAATTCATTTAGGTGAATTACATGCTATTTTACGTCG TCAAGAAGATTTTATCCCTTTTAAAAAGATAATCGTGAAAAAATTGAA AAAATTTTAACTTTTCGTATTCCTTATTATGTTGGTCCTTTAGCTCGTG GTAATTCCTCGTTTTCGTGGATGACTCGTAAATCTGAAGAAACTATTAC TCCTTGGAATTTTGAAGAAGTTGTGATAAAAGGTGCTTCTGCTCAATCT TTTATTGAACGTATGACTAAATTTTGTATAAAAATTTACCTAATGAAAAAG TTTACCTAAACATTCCTTTATTATATGAATAATTTTACTGTTTATAATGA ATTAACTAAAGTTAAATAATGTTACTGAAGGTATGCGTAAACCTGCTTTT TTATCTGGTGAAACAAAAAAGCTATTGTTGATTTATTATTAAAACTA ATCGTAAAGTTACTGTTAAACAAATTAAGAAGAGATTATTTAAAAAAT TGAATGTTTGTGATTCGTGTGAAATTTCTGGTGTGAAGATCGTTTAAAT GCTTCTTTAGGTACTTATCATGATTTTATAAATAATTTTAAAGATAAAG ATTTTTTAGATAAATGAAGAAATGAAGATATTTTAGAAGATATTGTTTT AACTTTAACTTTATTTGAAGATCGTGAAATGATTGAAGAACGTTTAAAA ACTTATGCTCATTTATTTGTGATGATAAAGTTATGAACAAATTAACCGTC GTCGTTATACGTTGGGTCGTTTATCTCGTAAATTAATTAATGATAT TCGTGATAAACAAATCTGGTAAAACTATTTTAGATTTTAAAAATCTGAT GGTTTTCCTAATCGTAATTTTATGCAATTAATTCATGATGATTCCTTAA CTTTTAAAGAAGATATTCAAAAAAGCTCAAGTTTCTGGTCAAGGTGATTC TTTACATGAACATATTGCTAATTTAGCTGGTTCTCCTGCTATTAAAAA GGTATTTTACAAACTGTAAAGTTGTTGATGAATTAGTTAAAGTTATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 2 7】

	GTGTCATAAACCTGAAAAATATTGTTATTGAAATGGCTCGTGAAAAATCA AACTACTCAAAAAAGGTCAAAAAAATTCCTCGTGAAACGTATGAAACCGTATTT GAAGAAAGGTATTTAAAGAAATTAGGTTCTCAAAATTTTAAAGAACATCCTG TTGAAAAATACTCAATTTACAAAAATGAAAAATTTATATTTATATTTTACA AAATGGTCGTGATATGTATGTTGATCAAGAAATTAGATATTTAATCGTTTA TCGTGATTAATGATGTTGATCATAATTGTTCCCTCAATCTTTTAAAGATG ATTCTATTGATAAATAAAGTTTAAACTCGTTCTGATAAAAAATCGTGGTAA ATCTGATAAATGTTCCCTCTGAAGAAGTTGTTAAAAAATGAAAAATTTAT TGGCGTCAATTTAATAATGCTAAATTAATTACTCAACGTAAATTTGATA ATTTAACTAAAGCTGAACGTGGTGGTTTATCTGAATTAGATAAAGCTGG TTTTATTAAACGTCAAATTAGTTGAACCTCGTCAAAATTAATAACATGTT GCTCAAAATTTTAGATTCTCGTATGAATACATAAATATGATGAAAAATGATA AATTAATTCGTGAAGTTAAAGTTATTACTTTAAAAATCTAAATTAGTTTC TGATTTTCGTAAAGATTTTCAATTTTATAAAGTTCGTGAAATTTAATAAT TATCATCATGCTCATGATGCTTATTTAAATGCTGTTGTTGGTACTGCTT TAATTAAAAAAATATCCTAAAAATTAGAAATCTGAATTTGTTTATGGTGATTA TAAAGTTTATGATGTTTCGTAAAAATGATGCTAAATCTGAACAAAGAAAT GGTAAAGCTACTGCTAAATATTTTTTTTATTCTAATATTATGAATTTTT TTAAAACTGAAATTACTTTTAGCTAATGGTGAAATTCGTAAACGTCCTTT AATTGAAACTAAATGGTGAAACCTGGTGAAATTTGTTTGGGATTAAGGTCGT GATTTTGGCTACTGTTCTGTAAGTTTATCTATGCTCAAGTTAAATATTG TTAAAAAAACTGAAGTTCAAACCTGGTGGTTTCTCTAAAGAACTATTTT ACCTAAACGTAAATTCCTGATAAATTAATTGCTCGTAAAAAAGATTGGGAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 2 8】

CCTAAAAAATATGGTGGTTTTGATTCCTCCTACTGTGTGCTTATTCTGTTT TAGTTGTTGCTAAAGTTGAAAAAAGTAAATCTAAAAAAATTAATAATCTGT TAAAGAAATTATTAGGTATTACTATTATGGAAAGTTCTTCTTTTGAAAAA AATCCTATTGATTTTGTAGAAAGCTAAAGGTTATTAAGAAAGTTAAAAAAG ATTAAATTATTAAATTAACCTAAATATTCTTTATTGAAATTAGAAAAATGG TCGTAAACGTATGTTAGCTTCTGCTGGTGAAATTACAAAAAGGTAAATGAA TTAGCTTTACCTTCTAAATAATGTTAAATTTTATATTTTAGCTTCTCATTT ATGAAAAATTAAAAAGGTTCTCCTGAAGATAAATGAACAAAAACAATTATT TGTTGAACAAACATTAACATTTATTTAGATGAATTTATTGAAACAAATTTCT GAAATTTTCTAAACGTGTTATTTTAGCTGATGCTAAATTTAGATAAAAGTTT TATCTGCTTATAATAAACATCGTGATAAACCTATTTCGTGAACAAAGCTGA AAATATTATTGATTTATTACTTTAACTAATTTAGGTGCTCCTGCTGCT TTTAAATATTTTGATACCTACTATTGATCGTAAACGTTATACCTCTACTA AAGAAAGTTTLAGATGCTACTTTAAATTCATCAATCTATTACTGGTTTATA TGAAACCTCGTATTGATTTATCTCAATTAGGTGGTGATGGTGGTGTCT CCTAAAAAACAAGTTTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 2 9】

開始コドンおよび終止コドンを用いる、表 4 の低Gコドンを使用した C u s 9 OR F	ATGGACAAAAAATACTCCATCGGCCTCGACATCGGCACCAAACTCCGTCCG GCTGGGCCGTCAATCACCGAGGAATACAAAGTCCCTCCAAAAAATTCAA AGTCTCTGGCACAACCGACAGACACTCCATCAAAAAAACCCTCATCGGC GCCCTCCTCTTCGACTCCGGGGAACCGCCGAGCCACGACTCAAAA GAACCCCAAGAAAGATACACCAGAAAGAAAAACAGAAATCTGCTACCT CCAAGAAATCTTCTCCAAAGAAATGGCCAAAGTCGACGACTCCTCTTC CACAGACTCGAAGAAATCCTTCTCTCGTCGAAAGAGCAAAAAACAGAAA GACACCCCATCTTCGGCAACATCGTCGACGAAAGTCGCCATACACGAAAA ATACCCCAACATCTACCACTCAGAAAAAANAACCTCGTCGACTCCACCGAC AAAGCCGACCTCAGACTCATCTACCTCGCCCTCGCCACATGATCAAAAT TCAGAGGCCACTTCCTCATCGAAGGGACCTCAACCCCGACAACTCCGA CGTCGACAAAATCTTCTATCCAACTCGTCCAAACTTACAACTCATCTTC GAAGAAAAACCCCATCAACGCCCTCCGGCGTCGACGCCAAAGCCATCCTCT CCGCCAGACTCTCCAAATCCAGAAAGACTCGAANAACCTCATCGCCCAACT CCCCGGGAAAAAAGGCCCTCTTCGGCAACCTCATCGCCCTCTCC CTCGGCCTCACCCCAACTTCAAAATCCAACTTCGACCTCGCCGGAAGAG CCAAATCCAACTCTCCAAAGACACCTACGACGACGACCTCGACAACTCT CCTCGCCCAATCGGCACCAATACGCCGACCTCTTCTCGCCGCAAA AACCTCTCCGACGCCATCCTCTCTCCGACATCCTCAGAGTCAACACCG AAATCACCAAGCCCCCTCTCGGCCTCCATGATCAAAAGATACGACGA ACACCAACCAAGACCTCACCTCTCTCAAGCCCTCGTCAGACAACTC CCCGAAAAATACAAAGAAATCTTCTTCGACCAATCCAAAAACGGCTACG CCGGCTACATCGACGGCGGCCCTCCCAAGAAAGATTTCTACAAATTCAT
	30 9

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 3 0】

CAAAACCCATCCTCGAAAAAATGGACGGCACCGAAGAACTCCTCGTCAAA CTCAACAGAGAAAGACCTCCTCAGAAAACAAAAGAACCTTCGAGCAACGGCT CCATCCCCACCAAAATCCACCTCGGGGAACCTCCACGCCATCCTCAGAAAG ACAAAGAAAGACTTCTACCCCTTCTCAAAAGACAAACAGAGAAAAAATCGAA AAAAATCCTCACCCTTCAGAAATCCCCTACTACGTCCGCCCTCGCCAGAG GCAACTCCAGATTGGCTTGGATGACCCAGAAAAATCCGAAGAAACCATCAC CCCCTGGAACTTCGAAAGAAAGTCGTGACAAAAGGCCCTCGCCCAATCC TTCATCGAAAGAAATGACCAACTTCGACAAAACCTCCCCAACGAAAAAG TCCCTCCCCAAAACACTCCCTCCTCTACGAATACTTCAACGCTCTACAACGA ACTCACCAAAAGTCAAAATAGGTCACCGAAGGCATGAGAAAACCGGCTTC CTCTCCGGCGAACA AAAAAGCCATCGTCGACCTCCTTCAAAAACCA ACAGAAAAGTCAACCGTCAAAACAACTCAAAAGAAAGACTACTTCAAAAAAAT CGAATGCTTCGACTCCGTGGAATCTCCGGCGTCGAAAGACAGATTCAAC GCCCTCCCTCGGCACCTACCAAGACCTCCTCAAAATCATCAAAAGACAAAG ACTTCCTCGACAACGAAAGAAACGAAAGACATCCTCGAAGACA TCGTCCT CACCTCACCCCTCTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTCAAA ACCTACGCCCACTCTTCGACGACAAAGTCATGAAACCAACTCAAAAGAA GAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTCTCCAGAAAACCTCATCAACGGCAT CAGAGCAAAACAATCCGGCAAAACCATCCTCGACTTCTCAAAATCCGAC GGCTTCGCCCAACAGAAACTTCATGCAACTCATCCACGACGACTCCCTCA CCTTCAAAAGAAAGACATCAAAAAGCCCAAGTCTCCGGCCCAAGGCGGACTC CCTCCACGAAACACATCGCCCAAGCTCGCCGGCTCCCCCGCCATCAAAAAA GGCATCCTCCAAAACCGTCAAAAGTCGTGACGAACTCGTCAAAAGTCATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 3 1】

GCAGACACAAAACCCGAAAAACATCGTCAATCGAAATGGCCAGAGAAAAACCA AACCAACCAAAAAGGCCAAAAAATCTCCAGAGAAAAAAGAAATGAAAAAGAAATC GAAAGAGGCATCAAAAGAACTCGGCTCCCAAAATCCTCAAAAGAAACCCCG TCGAAAAACACCCAACTCCAAAACGAAAAAATCTACCTCTACTACCTCCA AAACGGCAGAGACATGTACGTCCGACCAAGAACTCGACATCAACAGACTC TCGGACTACGACGTCCAGCCACATCGTCCCCCAATCCTTCCTCAAGACG ACTCCATCGACAAACAAAGTCTCACCAGATCCGACAAAAACAGAGGCAA ATCCGACAACTCCCTCCGAAAGAAAGTCTCAAAAAAATGAAAAAATCTAC TGGAGACAACTCCTCAACGCCAAATCTCATCAACCAAAAGAAAAATTCGACA ACCTCACCAAAAGCCGAAAGAGAGCGGCTCTCCGAACTCCACAAAGCCGG CTTCATCAAAAAGACAACTCGTCGAAACCGAGACAAATCACCACAAACAGGTC GCCAAAATCCTCGACTCCAGAAATGAACACCAAAATACGACGAAAAACGACA AACTCATCAGAGAAATCAAAAGTCAATCACCTCAAAATCCAAACTCGTCTC CGACTTCAGAAAAAGACTTCCAAATTCACAAAGTCAGAGAAATCAACAAAC TACCAACACGGCCACGAGGCTACCTCAACGGCGTCTGGGCAACCCCG TCATCAAAAAAATACCCCAAACTCGAATCCGAAATTCGTCTACGGGACTA CAAAAGTCTACGACGTCAGAAAAAATGATCGCCAAATCCGAACCAAGAAATC GGCAAAAGCCACCGCCAAATACTTCTTCTACTCCAACTCATGAACCTCT TCAAAAACCGAAATCACCTCGCCAAACGGCGAAATCAGAAAAAAGACCCCT CATCGAAACCAACGGCGAAACCGGCGAAATCGTCTGGGACAAAGGCAGA GACTTCGCCACCGTCAGAAAAAGTCTCTCATGCCCCCAAGTCAACATCG TCAAAAAAACCGAAGTCCAAACCGGGGCTTCTCCAAAGAAATCCATCCT CCCCAAAAGAAACTCCGACAAACTCATCGCCAGAAAAAAGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 3 2】

CCCCAAAAATACGGGGGCTTCGGACTCCCCCAACGGTCGCCCTACTCCGGTCC TCGTGTCGCCAAAAAGTCGAAAAAAGGCAAAATCCAAAAAATCTCAAAATCCGT CAAAAGAACTCCTCGGCATCACCATCATGGAAGATCCTCCTTCGAAAAA AACCCCATCGACTTCCTCGAAGCCAAAGGCTACAAAGAAAGTCAAAAAAG AGCTCATCATCAAACTCCCCAAATACTCCCTCTTCGAACTCGAAAAACGG CAGAAAAAGAAATGCTCGCTCCGCCCGGGGAACTCCAAAAAAGGCAACGAA CTCGCCCTCCCTCCAAATACGTCAACTTCCCTCTACCTCGCCTCCCACT ACGAAAAACTCAAAAGGCTCCCCCGAAGACAAACGAAACAAAAACAACCTCT CGTCGAACAAACAAACACTACCTCGACGAAATCATCGAACAAATCTCC GAA'TTCTCCAAAAAGAGTCATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAAATCC TCTCCGCCCTACAAACAAACACAGAGACAAACCCATCAGAGAACAAAGCCGA AAACATCATCCACCTCTTCACCCCTCACCAACCTCGGCGCCCCCGCCGCC TTCAAATACTTCGACACACCATCGACAGAAAAAAGATACACCTCCACCA AAGAACTCCTCGACGCCACCTCATCCACCAATCCATCACCGGCCCTCTA CGAAACCAAGAAATCGACCTCTCCCAACTCGGCGGCGACGGCGGGGCTCC CCCCAAAAAAGAAAAAGTCTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 3 3】

開始コドンおよび終止コドンを示す、表4の低Cコドンを使用したCas9 ORF	ATGGATAAGAAAGTATAGTATTGGATTGGATATTGGAAACAATAAGTGTGGGATGGGCTGTGATTACAGATGAGTATAAGGTGCCCTAGTAAGAAGTTTAAAGTGTGGGAAAATACAGATAGACATAGTATTTAAGAAGAAATTTGATTGGA	310

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 3 4】

TAAGCCCTATTTTGGAGAAAGATGGATGGAACACAGAGGAGTTGTTGGTGAAAG TTGAAATAGAGAGGATTTGTTGAGAAAGCAGAGAAACATTTGATAAATGGAA GTATTCCTCATCAGATTCATTTGGGAGAGTTGCATGCTATTTTGAGAAAG ACAGGAGGATTTTATCCCTTTTGTGAAGGATAATAGAGAGAAAGATTGAG AAGATTTTGACATTTAGAAATTCCTTAATTAATGTTGGACCTTTGGCTAGAG GAAATAGTAGATTTGCTTGGATGACAAAGAAAGAGTGAGGAGACAAATTAC ACCTTGGAATTTTGAGGAGGTGGTGATAAAGGAGCTAGTGCTCAGAGT TTTATTGAGAGAAATGACAAATTTTGTATAAAGAAATTTGCCATAATGAGAAAGG TGTTGCCTAAGCATAGTTTGTGTATGAGTATTTTACAGTGTATTAATGA GTTGACAAAGGTGAAGTATGTGACAGAGGGAATGAGAAAGCCCTGCTTTT TTGAGTGGAGAGCAGAAAGGCTATTGTGGATTTGTGTTTAAAGACAA ATAGAAAGGTGACAGTGAAGCAGTTGAAGGAGGATTAATTTAAGAAAGAT TGAGTGTTTTGATAGTGTGGAGATTAGTGGAGTGGAGGATAGATTTAAT GCTAGTTTGGGAAACATATCATGTATTTGTTGAAAGATTTATTAAGGATAAGG ATTTTGTGGATAATGAGGAGAAATGAGGATATTTTGGAGGATATGTGTT GACATTGACATTTGTTGAGGATAGAGAGATGATTGAGGAGAGATTTGAAG ACATATGCTCATTTGTTTGATGATAAGGTGATGAAGCAGTTGAAGAGAA GAAGATATACAGGATGGGGAAGATTGAGTAGAAAGTTGATTAATGGAAAT TAGAGATAAAGCAGAGTGGAAAGACAAATTTTGGATTTTGAAGAGTGAT GGATTTGCTAATAGAAATTTTATGCAAGTTGATTCATGATGATAGTTTGA CATTTAAGGAGGATATTCAGAAAGGCTCAGGTGAGTGGACAGGAGATAG TTTGGCATGAGCATATTGCTAAATTTGGCTGGAAGTCCCTGCTATTAAAGAA GGAAATTTTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGATGAGTTGGTGAAGGTGATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 3 5】

	GAA GACA TAA GCC TGA GAA TAT TGT GAT TGA GAT GGC TAGAGAGAAATCA GAC AACACAG AAGGACAG AAGAA TAGTAGAGAGAGAAATGAAAGAGAAAT GAGGAGGGAATTAAAGGAGTTGGGAAGTCAGATTTTGAAGGAGCATCCCTG TGGAGAAATACACAGTTGCAGAAATGAGAAAGTTGTATTTGTATTTATTTGCA GAA TGG AAGAGATATGTATGTGGA TCAGGAGTTGGATATTAATAGATTG AGTGAT TATGATGTGGATCATATTGTGCCCTCAGAGTTT TTTGAAGGATG ATAGTATTGATAAATAAGGTGTTGACAAAGAAAGTGATAAGAAATAGAGGAAA GAGTGATAAATGTGCCCTAGTGAGGAGGTGGTGAAAGATGAAAGAAATTA TGGAGACAGTTGTTGAAATGCTAAGTTGATTACACAGAGAAAGTTTGATA ATTTGACAAAAGGCTGAGAGAGGAGGATTGAGTGAGTTGGATAAGGCTGG ATTTATTAAAGACAGTTGGTGGAGACACAGACAGATTACAAAGCATGTG GCTCAGATTTTGGATAGTAGAATGAATACAAAGTATGATGAGAAATGATA AGTTGATTAGAGAGGTGAAGGTGATTACATTTGAAGTGAAGATTAAGTTGGTGAG TGATTTTAGAAAGGATTTTCAGTTTATTAAGGTGAGAGAGATTAAATAAT TATCATCATGCTCATGATGCTTATTTGAATGCTGTGGTGGGAACAGCTT TGA'TTAAGAAAGTATCCTAAGTTGGAGAGTGAGTTTGTGTATGGAGATT TAAAGGTGATGATGTGAGAAAGATGATTGCTAAGAGTGAGCAGGAGATT GGAAGGCTACAGCTAAGTATTTT TTTATAGTAATATTAAGAAATTTT TTAAGACAGAGATTACATTGGCTAATGGAGAGATTAGAAAGAGACCTTT GATTGAGACAAATGGAGAGACAGGAGAGATTGTGTGGGATAAGGGAAAG GATTTTTCCTACAGTGAGAAAAGGTGTTGAGTATGCCTCAGGTGAATATTG TGAAGAAAGACAGAGGTGCAGACAGGAGGATTTAGTAAGGAGAGTATTTT GCCTAAGAGAAATAGTGATAAGTTGATTGCTAGAAAGAGGATTGGGAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 3 6】

	CCTAAGAAAGTATGGAGGATTTTGATAGTCCTACAGTGGCTTATAGTGTGT TGGTGGTGGCTAAGGTGGAGAAAGGAAAGAGTAAGAAAGTTGAAAGAGTGT GAAGGAGTTGTTGGGAATTACAAATTATGGAGAGAAAGTAGTTTGGAGAAAG AATCCTATTGATTTTGTGGAGGCTAAGGGATATAAGGAGGTGAAGAAAGG ATTTGATTATTAAAGTTGCCCTAAGTATAGTTTGTTTTGAGTTGGAGAAATGG AAGAAAGAGAAATGTTGGCTAGTGTCTGGAGAGTTGCAGAAAGGAAATGAG TTGGCTTTGCCCTAGTAAGTATGTGAAATTTTGTATTTGGCTAGTCATT ATGAGAAAGTTGAAGGGAAGTCCTGAGGATATATGAGCAGAAGCAGTTGTT TGTGGAGCAGCATAAAGCATTTATTGGATGAGATTATTGAGCAGATTAGT GAGTTTAGTAAGAGAGTGATTTTGGCTGATGCTAAATTGGCATAAAGGTGT TGAGTGCTTATAATAAGCATAGAGATAAGCCTATTAGAGAGCAGGCTGA GAATATTATTCAATTTGTTTACATTGACAAATTTGGGAGCTCCTGCTGCT TTTAAAGTATTTTGATACAACTAATTGATAGAAAGAGATATACAAGTACAA AGGAGGTGTTGGATGCTACATTGATTCATCAGAGTATTACAGGATTGTA TGAGACAAAGAAATTGATTTGAGTCAGTTGGGAGGAGATGGAGGAGGAAGT CCTAAGAAAGAGAGAAAGGTGTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 3 7】

開始コードおよび終止コードを用いる、表 4 の低 A コードを使用した Cas9 ORF	ATGGACAAAGTACTCCATCGGCCCTGGACATCGGCACCAACTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGTGCCCTCCAAGAAAGTTCAAAGTGCTGGGCAACAACGACCGGCACTCCATCAAGAAAGAACTGATCGGGCGCCCTGCTTCCGACTCCGGCGAGACCGCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCGGGGGTACACCGCGGGAAGAACCGGATCTGCTACCTCCAGGAGATCTTCTCCAAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCACCGGCTGGAGGAGTCCCTTCCCTGGTGGAGGAGGACAAGAACGACGAGCGACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCAAGAGAAATAACCCACCATCTACCACTGCGGGAAGAAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAAGCGGACCTGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGGACCTGAACCCGACAACTCCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTTCGAGGAACCCCATCAACGCCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCGGCTGCCAAGTCCCGGGGCTGGAGAACCTGATCGGCCAGCTGCCCGCGAGAAAGAACGGCCCTGTTCCGGCAACCTGATCGGCCCTGTCCCTGGCCCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCACAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCCCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGGGGTGAACACCGAGATCACCAAGCCCCCTGTCCGCCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGACCAACGAGACCTGACCCCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGGACGCTGCCGAGAAAGTAAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGTCCAAGAACCGGCTACGCCGCTACATCGACGGCGGCCCTCCACGAGGAGTTCTACAAGTTCAT	3 1 1

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 3 8】

C A A G C C C A T C C T G G A G A A G A T G G A C G G C A C C G A G G A G C T G C T G G T G A A G	
C T G A A C C G G A G G A C C T G C T G C G G A A G C A G C G G A C C T T C G A C A A C G G C T	
C C A T C C C C C A C C A G A T C C A C C T G G G C G A G C T G C A C G C C A T C C T G C G G C G	
G C A G G A G G A C T T C T A C C C T T C C T G A A G G A C A A C C G G G A G A A G A T C G A G	
A A G A T C C T G A C C T T C C G G A T C C C T A C T A C G T G G G C C C C C T G G C C C G G G	
G C A A C T C C G G T T C G C C T G G A T G A C C C G A A G T C C G A G G A C C A T C A C	
C C C C T G G A A C T T C G A G G A G T G G T G G A C A A G G G C G C C T C C G C C A G T C C	
T T C A T C G A G C G G A T G A C C A A C T T C G A C A A G A A C C T G C C C A A C G A A G G	
T G C T G C C C A A G C A C T C C C T G C T G T A C G A G T A C T T C A C C G T G T A C A A C G A	
G C T G A C C A A G G T G A A G T A C G T G A C C G A G G G C A T G C G G A A G C C G C C T T C	
C T G T C C G G C G A G C A A G A A G G C C A T C G T G G A C C T G C T G T T C A A G A C C A	
A C C G G A A G G T G A C C G T G A A G C A G C T G A A G G A G G A C T A C T T C A A G A A G A T	
C G A G T G C T T C G A C T C C G T G G A G A T C T C C G G C G T G G A G A C C G G T T C A A C	
G C C T C C C T G G G C A C T A C C A C G A C C T G C T G A A G A T C A T C A A G G A C A A G G	
A C T T C C T G G A C A A C G A G G A A C G A G A C A T C C T G A G G A C A T C G T G C T	
G A C C C T G A C C C T G T C G A G G A C C G G A G A T G A T C G A G G A C C G C T G A A G	
A C C T A C G C C C A C C T G T T C G A C G A C A A G G T G A T G A A G C A G C T G A A G C G G C	
G G C G T A C A C C G G C T G G G C C G G C T G T C C G G A A G C T G A T C A A C G G C A T	
C C G G A C A A G C A G T C C G G C A A G A C C A T C C T G G A C T T C C T G A A G T C C G A C	
G G C T T C G C C A A C C G G A A C T T C A T G C A G C T G A T C C A C G A C G A C T C C C T G A	
C C T T C A A G G A G A C A T C C A G A A G C C C A G G T G T C C G G C C A G G C G A C T C	
C C T G C A C G A G C A T C G C C A A C C T G G C C G G C T C C C C G G C A T C A A G A A G	
G G C A T C C T G C A G A C C G T G A A G G T G G T G G A C G A C G A C T G G T G A A G G T G A T G G	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 3 9】

GCCGGCACAAGCCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAACCA GACCACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCGGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCCTCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTG TCCGACTACGACGTGGACCAATCGTGCCCCAGTCCCTTCCCTGAAGGACG ACTCCATCGAACAAAGGTGCTGACCCCGTCCGACAAAGAACCCGGGCAA GTCCGACAAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAGATGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACA ACCTGACCAAGCCGAGCCGGGGGGGGCTGTCCGAGCTGGACAAGCCGG CTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTG GCCCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAAGCTGGTGC CGACTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCCGGGAGATCAACAA TACCACCAAGCCCAAGACGCTTACCCTGAACGCGGTGGTGGGCAACGCCC TGATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTGTACGGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCCAAGTCCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCGCCCAAGTACTTCTTCTACTCCAAACATCATGAACCTCT TCAAGACCGGATCACCCCTGGCCCAAGCGGAGATCCGGAGCGGCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGACCGGGGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGG GACTTCGCCACCGGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAGAACCGAGGTGCAGACCGGGGGCTTCTCCAAAGAGTCCATCCT GCCCAAGCGGAACCTCCGACAAAGCTGATCGCCCCGGAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 4 0】

	CCC AAG AAG TAC GGG GGC TTC GAC TCC CCA CCG TGG CCT ACT CCG TGC TGG TGG TGG CCA AGG TGG AGA AGG CAA GTCC AAG AAG CTGA AGT CCG T G AAG GAG CTG CTGG GCA TCA CCA TCA TGG AG CCG TCC CTTC GAG AAG A ACC CCA TCG ACTT CCTGG AGGCC AAG GCTACA AAG GGTGA AGA AGG ACC TGA TCA TCA AGCTGCC CAA GTACT CCA CTG TTC GAG CTG GAG AAC GG CCG GAA GCG GATGCTGG CCTCC GCG GCG GAG CTGC AGA AGG CCA ACG AG CTGG CCTG CCTCC AAG TAC GTGA ACTTCC TGTAC CTGG CCTCC CACT ACG AGA AGCTGA AGGCTCC CCG AGG ACA ACG AGC AGA AGC AGCTG TT CGTGG AGC AGC AAG CACTAC CTGG ACG AGATCA TCG AGC AGATCTCC GAG TTC CCA AGCG GTG ATCCTGG CCG ACG CCA ACTGG ACA AGGTGC TGTCC GCGCTACA ACA AGCAC CCGG ACAAG CCACTCC GGG AGC AGG CCGA GAA CATCATCC ACC TGTTC ACC CTG ACC AAC CTGG GCG CCG CCG CCG C TTC AAG TACTTCG ACAC CACC ATCG ACC GGA AGCG GTAC ACC TCC ACCA AGG AGGTGCTGG ACGCC ACC CTGATCC ACC AGTCC ATCAC CGG CCTGTA CGAG ACCCG GATCG ACC TGTCC CAGCTGG GCG GCG CCG ACC GCG CCG CTCC CCC AAG AAG AAG CCG AAG GTGTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 4 1】

開始および終止 コドンを含む る、表 4 の低 A ノコドンを使 用した C a s 9 ORF	3 1	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGG
	2	GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGATTCAA GGTGTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAGAGAGACCTGATCGGC GCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAGC GGACCGCCCGCGCGGTACACCGCGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTC CACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTGTGTGGAGGAGCAAGAGACGAGC GGACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACCAAGAGAA GTACCCCAACATCTACCACTGCGGAAGAGCTGGTGACAGCAACCGAC AAGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGT TCCGGGGCACTTCTGTATCGAGGGGACCTGAACCCCGACAACAGCGA CGTGACAAAGCTGTTCTATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTT GAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGA GCGCCGGCTGAGCAAGAGCGCGGCGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCT GCCCGCGAGAAAGAACCGCCCTGTTCCGCCAACCTGATCGCCCTGAGC CTGGGCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG CCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCGGACCTGTTCTGGCCGCAAG AACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGGGGTGAACACCG AGATCAACCAAGGCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGA GCACCAACAGGACCTGACCTGCTGAAGCCCTGGTGGGCGAGAGCTG CCCGAGAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGCTACG CCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAAGTTCTAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 4 2】

CAAGCCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAG CTGAACCGGGAGGACCTGCTGCCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCA GCATCCCCCACCCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCG GCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGTAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAG AAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGG GCAACAGCCGGTTCCGCTGGATGACCCGGAAAGCGAGAGACCATCAC CCCCGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAAGGCGCCAGCGCCCCAGAGC TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAG TGCTGCCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAAACGA GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGCGCATGCGGAAGCCCCCTTC CTGAGCGGGAGCAGAAAGAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAAGACCA ACCGAAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGAT CGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAAC GCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAG ACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCT GACCTGACCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAG ACCTACGCCCACTGTTCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCAT CCGGACAAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGAC GGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACGCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG CCTGCACGAGCACATCGCCCAACCTGGCCGCGCAGCCCCGCCATCAAGAAG GGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 4 3】

GCCGGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCA GACCACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTG AGCGACTACGACGCTGGACCAACATCGTGCCCCAGAGCTTCTGAAGGACG ACAGCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAAGAACCGGGCAA GAGCGACAAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGTTGAAGAAAGTGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCAACCAGCGGAAGTTCCGACA ACCTGACCAAGCCGAGCCGGGGCGGCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGG CTTCATCAAGCGGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCAACCAAGCACGCTG GCCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACCGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAG CGACTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGTGCCGGGAGATCAACAAAC TACCACCAAGCCCAAGACGCCCTACCTGAACGCCGTTGGTGGCCACCGCCC TGATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTA CAAGGTGTACGACGTCGCGAAGATGATCGCCCAAGAGCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCCAACGGCGAGATCCGGAAAGCGCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGAACCGGGGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGG GACTTCGCCACCGTGGCGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAGAAGACCGAGTGCAGACCGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCT GCCCAAGCGGAACAGCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 4 4】

CCCCAAGAAAGTACGGCGGGCTTCGACAGCCCCACCCGTGGCCTACAGCGTGC TGGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCCGT GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGGAAG AACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAAGGAGGTGAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCGAGCTGGAGAACGG CCGGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCCGGCGAGCTGCAGAAAGGCCAACCGAG CTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCAGCCACT ACGAGAAGCTGAAGGCGAGCCCCGAGGACAAAGAGCAGAAAGCAGCTGTT CGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAAGGTGC TGAGCGCCTACAAACAAGCACCGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGA GAACATCATCCACCTGTTCACTGCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCGCC TTCAAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAAGCACA AGGAGGTGCTGGACGCCACCTGATCCACCAAGAGCATCACCGGCTGT CGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGGACGGCGGCGGACGC CCCCAAGAAAGCGGAAGGTGTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 4 5】

2つのC末端N LS配列、なら びに開始および 終止コドンを含む、表4の低 Aコドンを使用 したCas 9 ORF	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCCTGGACATCGGCACCAACTCCGTGG GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAAGAAGTTCAA GGTGC TGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGC GCCCTGCTGTTCCGACTCCGGCGAGACCGCGGAGGCCACCCGGCTGAAAGC GGACCGCCCGGCGGCGGTACACCGCGGGAAGAACCGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCTCCAAAGAGATGGCCAAAGTGGACGACTCCTCTCTC CACCGGCTGGAGGAGTCTCTCCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGC GGACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACCAAGAGAA GTACCCCAACCATCTACCACTGCGGAAAGAAAGCTGGTGAATCCACCGAC AAGCGGACCTGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAATGATCAAGT TCCGGGGCCACTTCCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACTCCGA CGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACAGCTGTTT GAGGAGAACCCTCATCAACGCTCCGGCTGGACGCGCAAGGCCATCCTGT CCGCCGGCTGTCCAAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCT GCCCGCGAGAAAGAACGGCCCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGTCC CTGGGCCCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG CCAAAGCTGCAGCTGTCCAAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCCCAAGATCGGCGACCAAGTACGCGGACCTGTTCTGCGCCGCAAG AACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCGACATCCTGCGGGTGAAACACCG AGATCAACCAAGGCCCTGTCGCGCTCCATGATCAAGCGGTACGACGA GCACCAAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTCCGGCAGGCTG CCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGTCCAAAGAGCTACG CCGGCTACATCGACCGGCGGCTCCCAAGGAGGATTTCTACAAAGTTTCA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 4 6】

CAAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCCGAGGAGCTGCTGGTGAAG CTGAACCGGAGGACCTGCTGCGGAAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCT CCATCCCCACCAAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCG GCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAG AAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGCCCCCTGGCCCCGG GCAACTCCCCGTTCCGCTGGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCAATCAC CCCCTGGAACCTCGAGGAGGTGGTGACAAAGGCGCTCCGCCAGTCC TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAG TGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCAACGTGTACAACGA GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATCGGAAAGCCCCCTTC CTGTCCGGCGAGCAGAAAGAAAGCCATCGTGGACCTGCTTCAAGACCA ACCGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGAT CGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGAGGACCGGTTCAAC GCCCTCCCTGGGCACTACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAG ACTTCTGGACAAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGT GACCTGACCCCTGTTCCAGGACCCGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAG ACCTACGCCCCACCTGTTCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCAT CCGGGACAAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAAGTCCGAC GGCTTCGCCAACCCGGAACCTCATGCAGCTGATCCACGAGACTCCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC CCTGCACGAGCACATCGCCAAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAAG GGCATCCTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 4 7】

GCCGGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGAGAAACCA GACCAACCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTG TCCGACTACGACGTGGACCAACATCGTGCCCGAGTCCTTCTGAAGGACG ACTCCATCGACAAACAGGTGCTGACCCCGTCCGACAAAGAACCGGGGCAA GTCCGACAAAGTGCCTCCGAGGAGGTGGTGAAAGATGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAATTGACCA ACCTGACCAAGGCCGAGCGGGCGGCTGTCCGAGCTGGACAAAGGCCGG CTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTG GCCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGTGATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGTG CGACTTCCGGAAAGGACTTCCAGTTCTAAGGTGGGAGATCAACAAAC TACCACCAAGCCACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGACCGGCC TGATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGGGGAAGATGATCGCCAAAGTCCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACCTCT TCAAGACCGAGATCACCTGGCCCAACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGACCGGGGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGG GACTTCGCCACCGTGGGGAAGGTGCTGTCCA TGCCCGAGGTGAACATCG TGAAAGAACCGAGGTGCAGACCGGGGCTTCTCCAAGGAGTCCA TCTT GCCAAAGCGGAAC TCCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 4 8】

CCCAGAAGTACGGGGGCTTCGACTCCCCACCGTGGCCCTACTCCGTGC TGGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGTCCAAAGAAAGCTGAAGTCCGT GAAAGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCCTTCGAGAAAG AACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCCGAGCTGGAGAACGG CCGGAAGCGGATGCTGGCCCTCCGCCGGGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAG CTGGCCCTGCCCTCCAAAGTACGTGAACCTTCCCTGTACCTGGCCCTCCCACT ACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAAACGAGCAGAAAGCAGCTGTT CGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCC GAGTTCTCCAAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGC TGTCGGCCCTACAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGA GAAACATCATCCACCCTGTTCAACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCGCC TTCAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGGAAGCGGTACACCTCCACCA AGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAAGTCCATCACCGGCCGTGA CGAGACCCGGATCGACCTGTCCCAAGCTGGGCCGGCAGGCTCCGGCTCC CCCAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCTCCCCCAAGAAAGCGGAAGG TGGACTCCGGCTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 4 9】

開始コ ドンおよ び終止コ ドンを 右ずる、表 4 の 低 A コドンを使 用した C a s 9 ニックーゼ R F	3 1	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGGCTGGCCATCGGCACCAAACTCCGTGG
	4	GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGTGCCCTCCAAAGAAAGTTCAA
		GGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAGAAGAACTGATCGGC
		GCCCTGCTGTTCGACTCCGGGAGACCGCGAGGCCACCGGCTGAAGC
		GGACCGCCCGCGGGGTACACCGCGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCT
		GCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAAGTTGGACGACTCCTTCTTC
		CACCGGCTGGAGGAGTCTTCTCTGTGGAGGAGGACAAAGAACGAGC
		GGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGACGAGGTGGCCTACCACGAGAA
		GTACCCCAACCATCTACCACTGGCGAAGAAAGCTGGTGGACTCCACCGAC
		AAGCCGACCTGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGT
		TCCGGGCCACTTCTCTGATCGAGGGGACCTGAACCCGACAACTCCGA
		CGTGACAAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTGACAGACCTACAAACAGCTGTT
		GAGGAGAACCCCATCAACGCCCTCCGGCGTGACGCCAAGGCCATCCTGT
		CCGCCGGCTGTCCAAGTCCCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGT
		GCCCGCGAGAAAGAACGACCTGTTGGCAACCTGATCGCCCTGTCC
		CTGGGCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG
		CCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACT
		GCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAG
		AACCTGTCCGACGCCATCCTGTGTCGACATCCTGGGGTGAAACCCG
		AGATCAACCAAGGCCCTGTCCGCCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGA
		GCACCAACGAGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGTTGGGCGAGGCTG
		CCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGTCCAAGAACGGCTACG
		CCGGCTACATCGACGGCGGGCCTCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCAT

10

20

30

40

50

CAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAG CTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCT CCATCCCCCACCAGATCCACCTGGCGGAGCTGCACGCCATCCTGCCGGCG GCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAAGGACACCGGGAGAAAGATCGAG AAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACTGCTGGCCCCCTGGCCCCGGG GCAACTCCCGGTTCCGCTGGATGACCCGGAACTCCGAGGAGACCATCAC CCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGACAAAGGGCGCTCCGCCACGTCC TTCATCGAGCGGATGACCAAACCTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAG TGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCTGTACAAACGA GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCCTTC CTGTCCGGCGAGCAGAAAGAGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAAGACCA ACCGGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGGAAGAT CGAGTGTCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTC AAC GCCTCCCTGGGCACCTACCAAGCACCCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAG ACTTCTCTGGACAAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCT GACCCCTGACCCCTGTTCCAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAG ACCTACGCCCAACCTGTTGACAGCACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGAAAGCTGATCAACCGGCAT CCGGGACAAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTCTGAAGTCCGAC GGCTTCGCCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC CCTGCACGAGACATCGCCAAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAAG GGCATCCTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGACCGAGCTGGTGAAGGTGATGG

50

【表 4 3 - 2 5 1】

GCCGGCCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCA GACCACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGGAGCTGGACATCAACCGGCTG TCCGACTACGACGTGGACCAACATCGTGCCCCAGTCCTTCTGAAGGACG ACTCCATCGACAAACAAAGTGCTGACCCCGTCCGACAAAGAACCGGGGCAA GTCCGACAAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAAGATGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCAACCCAGCGGAAATTCCGACA ACCTGACCAAGGCCGAGCGGGCGGCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCCG CTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTG GCCCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGTGATCACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGT CGACTTCGGGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTGCGGGAGATCAACAA TACCACCAAGCCCAAGACGCTACCTGAACGCCGTGGTGCGCACCGCCC TGATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACCGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCCAAGTCCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTACTCCAACATCATGAACCTTCT TCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCAAACGGCGAGATCCGGAAAGCGCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGACCGGGGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGG GACTTCGCCACCGTGCCGGAAGTGCTGTCCA TGCCCCAGGTGAACATCG TGAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGGGGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCT GCCAAAGCGGAAC TCCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 5 2】

	CCCAAGAAAGTACGGGGGCTTTCGACTCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGC TGGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGTCCAAAGAAAGCTGAAGTCCGT GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCCTCGAGAAAG AACCCCATCGACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAGAACGG CCGGAAGCGGATGCTGGCTCCGGCGGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAG CTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTCCCTGTACCTGGCCTCCCACT ACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGACAAAGGAGCAGAAAGCAGCTGTT CGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGAGGAGATCATCGAGCAGATCTCC GAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGC TGTCGGCTACAAACAACACCGGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGA GAACATCATCCACCTGTTCACTCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCGCC TTCAAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCA AGGAGGTGCTGGACGCCACCTGTATCCACCAAGTCCATCACCGGCTGTAT CGAGACCGGGATCGACCTGTCCAGCTGGGCGGCGACCGCGCGGCTCC CCCAAGAAAGACCGGAAGGTGTGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 5 3】

開始および終止 コドンを含し、 NLSを含しな い、表4の低A コドンを使用し たCas9ニッ カーゼORF	31 5	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCCTGGCCATCGGCACCAACTCCGTGG GCTGGGCCGTGATCACCAGCAGTACAAAGGTGCCCTCCAGAAGTTCAA GGTGCTGGGCACACCGACCGGCACTCCATCAGAAGAACCTGATCGGC GCCCTGCTGTTGAGCTCGGGCGAGACCGCGAGGCCACCGGGCTGAAGC GGACCGCCCGGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAAGTGGACGACTCCTTCTTC CACCGCTGGAGGAGTCTTCTGTTGGAGGAGGACAAAGAACGAGC GGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACCAAGAGAA GTACCCCAACCATCTACCACTGCGGAAGAGCTGGTGGACTCCACCGAC AAGCCGACCTGGCGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAATGATCAAGT TCCGGGGCACTTCTGATCGAGGGGACCTGAACCCGACAACTCCGA CGTGGACAAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTT GAGGAGAACCCCATCAACGCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGT CCGCCCGGCTGTCCAAAGTCCCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCT GCCCGCGGAGAGAAGAACGGCTGTTGGCAACCTGATCGCCCTGTC CTGGCCCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG CCAAAGCTGCAGCTGTCCAAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCCCAAGATCGGGACCAAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCCAAG AACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGGGGTGAACACCG AGATCAACCAAGGCCCTGTCGGCTCCATGATCAAGGGTACGACGA GCACCAACAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGACGACCTG CCCGAGAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCCAGCAGTCCAAAGAACGGCTACG CCGGCTACATCGACGGCGGCCCTCCAGGAGGAGTTCTACAAAGTTCAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 5 4】

CAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAG CTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCT CCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGC GCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAAGGACAAACGGGAGAAATCGAG AAGATCCTGACCTTCCGGATCCCTACTACGTGGGCCCTGGCCCCGGG GCAACTCCCCGTTCCGCTGGATGACCCGGAAAGTCCGAGGAGACCATCAC CCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGACAAAGGGCGCTCCGCCCAGTCC TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAG TGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCCCGTGTACAAAGGA GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCCGCTTC CTGTCCGGCGGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCA ACCGGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGAT CGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAAC GCCTCCCTGGGCACCTACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAG ACTTCCTGGACAACGAGGAGAAACGAGACATCCTGGAGGACATCGTGCT GACCTGACCTGTTCCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAG ACCTACGCCACCTGTTGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAAGCTGATCAACGGCAT CCGGGACAAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAAGTCCGAC GGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC CCTGCACGAGCACATCCCAACCTGGCCGGCTCCCGCCCAATCAAGAAAG GGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 5 5】

GCCGGCACAAGCCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAACCA GACCACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCGGAGCGGATGAAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTG TCCGACTACGACGTGGACCAACATCGTGCCCCAGTCCCTTCC'TGAAGGACG ACTCCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAAGAACCCGGGGCAA GTCCGACAAAGTGCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACA ACCTGACCAAGCCGAGCCGGGGGGCCCTGTCCGAGCTGGACAAGCCCGG CTTCATCAAGCCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACCGTG GCCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGT CGACTTCCGGAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAAC TACCAACACGCCCAAGACCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCAACGCC TGATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCCGTGACGGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGTCCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACCTCT TCAAGACCGAGATCACCTGGCCAAACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCCGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGG GACTTCGCCACCGTGGGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGGGGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCT GCCAAGCGGAACTCCGACAAAGCTGATCGCCCCGGAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 5 6】

CCC AAG AAG TAC GGG GGC TTC GAC TCCCC CAC CGTGG CCTACTCC GTGC TGG TGG TGG CCA AGG TGG AGA AAG GCA AGTCCA AGA AGCTGA AGTCC GT GAA GGA GCTGCTGG GCATCAC CATCATG GAGCGGTCC TCC TTCGAGA AG AAC CCC CATCG ACTTCCTGG AGGCCAAGGG CTACAAG GAGGTGAAGA AGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCCGAGCTGCAGAACGG CCGGAAGCGGATGCTGGCTCCGCCGGGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAG CTGGCCCTGCCCTCCAAAGTACGTGA ACTTCCCTGTACCTGGCTCCCACT ACGAG AAGCTGAAGGCTCCCCCGAGGACAA CGAGCAGAAGCAGCTGTT CGTGGAGCAGCAC AAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCC GAGTTCTCCAAGCGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGC TGTCCGCCCTACAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGA GAA CATCATCCACCCTGTTCAACCCTGACCCAAACCTGGGCGCCCCCGCC TTC AAGTACTTCGACACCCACCATCGACCCGGAAGCGGTACACCTCCACCA AGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCCAGTCCATCACCGGCCCTGTA CGAGACCCCGGATCGACCTGTCCCAAGCTGGGCGGCCACTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 5 7】

2つのC末端N LS配列、なら びに開始および 終止コドンを含む 終止コドンを右 にする、表4の底 Aコドンを使用 したCas9ニ ッカージORF	ATGGACAAAGAAAGTACTCCATCGGCCCTGGCCATCGGCACCAAACTCCCGTGG GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGGTGCCCTCCAAAGAAAGTTCAA GGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAAGAACTGATCGGC GCCCTGCTGTTGACTCCGGCGAGACCGCGAGGCCACCGGCTGAAGC GGACCGCCCGCGGGGTACACCCGGCGGAAGAAACCGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAAGTGGACGACTCCTCTTC CACCGGCTGGAGGAGTCTTCTCGTGGAGGAGGACAAAGAAAGCACGAGC GGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACCAAGAGAA GTACCCCAACCATCTACCAACCTGGCGAAGAAAGTGGTGGACTCCACCGAC AAGGCCGACCTGGCGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGT TCCGGGGCCACTTCCCTGATCGAGGGGACCTGAACCCCGACAACTCCGA CGTGGACAAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTT GAGGAGAACCCCATCAACGCCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGT CCGCCCGGCTGTCCAAAGTCCCGCGGCTGGAGAACTGATCGCCCAAGCT GCCCGGCGAGAAAGAAACGGCCCTGTTCCGCCAACCTGATCGCCCTGTC CTGGCCCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCCGAGGACG CCAAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCCCAAGTCCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAG AACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGGGGGTGAACACCG AGATCAACCAAGGCCCCCTGTCCGCCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGA GCACCAACGACCTGACCTGTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGACGAGCTG CCGAGAAAGTACAAAGGAGATCTTCTTCCAGCAGTCCAAAGAACGGCTACG CCGGCTACATCGACGGCGGCGCTCCAGGAGGAGTTCTACAAAGTTCAAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 5 8】

CAAGCCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAG CTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCT CCATCCCCCACCAAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCG GCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAG AAGATCCTGACCTTCGGGATCCCCCTACTAGTGGGCCCCCTGGCCCCGG GCAACTCCCCGGTTCGGCTGGATGACCCGGAGTCCGAGGAGACCATCAC CCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGTGGACAAAGGCGCCCTCCGCCCAAGTCC TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAG TGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAAACGA GCTGACCAAGGTGAAGTAGGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCCCTTC CTGTCCGGCGAGCAGAAAGAACCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAAGACCA ACCGGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGAT CGAGTGCCTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAAC GCCTCCCTGGGCACCTACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAG ACTTCTGTGACACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGT GACCTGACCCCTGTTGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAG ACCTACGCCCCACCTGTTGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCAT CCGGACAAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAGTCCGAC GGCTTCGCCAACCAGGAACTTCATGCAAGCTGATCCACGACGACTCCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC CCTGCCAGGACACATCGCCCAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAAG GGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 5 9】

GCCGGCACAAAGCCCGAGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCA GACCACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAAAGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTG TCCGACTACGACGTGGACCAACATCGTGCCCGCAGTCCCTTCCCTGAAGGACG ACTCCATCGACAAACAAAGGTGCTGACCCCGTCCGACAAAGAACCGGGGCAA GTCCGACAACTGCTCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAATAC TGGCGGCAGCTGCTGAAGCCCAAGCTGATCAACCCAGCGGAAGTTCCGACA ACCTGACCAAGCCGAGCGGGCGGCTGTCCGAGCTGGACAAAGGCCGG CTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCCGGCAGATCACCAAGCACGTG GCCCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGTGATCAACCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCTC CGACTTCCGGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTGCGGGAGATCAACAAAC TACCACCAAGCCCAAGACGCTACCTGAACCGCGTGGTGGGCACCGCCC TGATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGTCCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCGCAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACCTTCT TCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCCAACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGACCGGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCCG GACTTCGCCACCGTCCGGAAGGTGCTGTCCA TGCCCGCAGGTGAACATCG TGAAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCT GCCCAAGCGGAAC TCCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 6 0】

	CCC AAG AAG TAC GGG GGC TTG GAC TCC CCA CCG TGG CCTACT CCG TGC TGG TGG TGG CCA AGG TGG AGA AGG CAA GTCC AAG AAG CTGA AGT CCG T GA AGG AGC TGT GGG CATC ACC ATCAT GGA GCG TCC TCTCG AGA AG AAC CCA TCG ACTT CCTGG AGGCC AAG GCTACA AGG AGGTGA AGA AGG ACC TGA TCATCA AGCTGCC AAG TACT CCTG TTG AGCTGG AGA ACGG CCG AAG CGG ATG CTGG CCTCC GCG GAG CTG CAGA AGG CAA CCG AG CTGG CCTG CCTCC AAG TAC GTGA ACTT CCTGT ACC TGG CCTCC CACT ACG AAG CTGA AGG CTCCCC GAG GACA ACG AGC AGA AGC AGCTG TT CGTGG AGC AGCACA AGCACTAC CTGG AGG AGATCAT CG AGC AGATCTCC GAG TTCTCCA AGCG GTG ATCTCTG CCG CAG CCA ACC TGG ACA AGGTGC TGTCC GCGCTACA ACAAG CAC GGG GACA AGCC CATCC GGG AGC AGGCCGA GAACATCATCC ACC TGTTC ACC CTG ACC AACCTGG GCG CCCCCCGCC TTC AAG TACTTGA CAC CAC CATCG ACC GGA AGCGGTAC ACC TCC ACCA AGG AGGTGCTGG ACGCC ACC CTGATCC ACC AGTCC ATCAC CGG CCTGTA CGAG ACCCGG ATCG ACC TGTCC CAG CTGG GCG GCG AGCG CTCCGG CTCC CCCAAG AAGA AGCGG AAGGTGG ACCGCTCCCC CAA GAAAGCGG AAGG TGG ACTCCGG CTGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 6 1】

開始コドンおよび終止コドンを示す、表 4 の低Δコドンを使用した Cas 9 ORF	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCCTGGCCATCGGCACCAACTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAAGAAGTTCAAAGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACCTCCATCAGAAGAACCCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACTCGGGCGAGACCGCCGACCCGGCTGAAAGCGAACCCGCCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAAGTGGACGACTCCTCTTCACCCGCTGGAGGAGTCTCTCTGTGTGAGGAGGACAAAGAAGCAGAGCGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACACGAGAAGTACCCCAACATCTACCACTTCGGGAAGAGTGGTGGACTCCACCGAACAGCCGACCTGGCGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGCCACTTCCTGATCGAGGGGACCTGAACCCCGACAACCTCGACGTGGACAAGCTGTTTCAATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACCAGCTGTTGAGGAGAACCCTCAACGCCCTCCGGCGTGGACGCCAAAGGCCATCTCTGTCCCGGCTGTCCAGTCCCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCCAGCTGCCCGCGAGAAAGAACCGCCCTGTTCCGCCAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGCCCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCTCTGTGTCCGACATCTCGGGGTGAACACCGAGATCAACCAAGCCCCCTGTCCGCCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGACCAAGGACCTGACCTGTGAAGGCCCTGGTGGGCGAGAGCTGCCGAGAAGTCTTCTTCGACCAAGTCCAAAGACCGGCTACG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 6 2】

CAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCCGAGGAGCTGCTGGTGAAAG CTGAACCGGAGGACCTGCTGCGGGAAGCAGCGGACCTTCGACACAACGGCT CCATCCCCACCAAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCG GCAAGAGGACTTCTACCCCTTCTGTGAAAGACAAACGGGAGAAAGATCGAG AAGATCCTGACCTTCGGGATCCCTTACTACGTGGGCCCTCTGGCCCCGGG GCAACTCCCCGTTCCCTTGGATGACCCGGAAAGTCCGAGGAGACCATCAC CCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGTTGGACAAAGGGCCCTCCGCCAGTCC TTCAATCGAGCGGATGACCACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAG TGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCGTGTACAAACGA GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATCGGGAAGCCCCCTTC CTGTCCGGCGGAGCAGAAGAAAGCCATCGTGGACCTGCTGTCAAGACCA ACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGAT CGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAAC GCCCTCCCTGGGCACCTACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAG ACTTCCTGGACAACGAGGAGAAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCT GACCTGACCCCTGTTCCGAGGACCGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAG ACCTACGCCCACTGTTCCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCAT CCGGGACAAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGAC GGCTTGGCCAAACGGGAACCTTCATGCAAGCTGATCCACGACGACTCCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCACAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC CCTGCACGAGCACATCGCCAAACCTGGCCGGCTCCCGCCCATCAAGAAAG GGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 6 3】

GCCGGCACAAGCCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAACCA GACCACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGGAGCTGGACATCAACCGGCTG TCCGACTACGACGTGGACGCCATCGTGCCCAAGTCCCTTCTGAAGGACG ACTCCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAAGAACCGGGCAA GTCCGACAAACGTGCCCTCCGAGAGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACA ACCTGACCAAGGCCGAGCCGGGGCGGCTGTCCGAGCTGGACAAGCCCG CTTCATCAAGCCGCAGCTGGTGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACCTG GCCCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGT CGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAAC TACCAACACGCCACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGCGCACCGCCC TGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCCAAGTCCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTACTCCAACATCATGAACCTCT TCAAGACCGAGATCACCTTGGCCAAAGCGGAGATCCGGAAAGCGGCCCT GATCGAGACCAACGGCGGAGACCGGCAGATCGTGTGGGACAAAGGCCGG GACTTCGCCACCGTCCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAGAACCGGAGGTGCAGACCGGGCGGCTTCTCAAGGAGTCCATCCT GCCCAAGCGGAACCTCCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 6 4】

	CCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCACCGTGGCCCTACTCCGTGC TGGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGTCCAAGAAAGCTGAAGTCCGT GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCCTTCGAGAAAG AACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAAGGAGGTGAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCCGAGCTGGAGAACGG CCGGAAGCCGATGCTGGCCCTCCCGCGCGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAG CTGGCCCTGCCCTCCAAAGTACGTGAACCTTCCGTACCTGGCCCTCCCACT ACGAGAAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAAAGAGCAAGCAAGCTGTT CGTGGAGCAGCAACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAAGTCTCC GAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGC TGTCCGCCCTACAACAAGCACCGGGACAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGA GAACATCATCCACCTGTTCACCTTGACCAACCTGGGCGCCCGCGCGCC TTCAAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCA AGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAAGTCCATCACCGGCGCTGT CGAGACCCCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGGCGACCGCGCGCTCC CCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 6 5】

開始および終止 コドン有り、 NLS有りなし い、表4の低A コドン使用し たdCas9 ORF	31 8	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGGCTGGCCATCGGCACCAAACTCCGTGG GCTGGGCCGTGATCACCAGAGTACAAAGTGCCCTCCAAAGATTCAA GGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGC GCCCCTGCTGTTCGACTCCGGCGAGACCGCGAGGCCACCGGCTGAAGC GGACCGCCCGGGGGGTACACCGCGGCGAAGAACGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCTCCAAAGAGATGGCCAAAGTGGACGACTCTCTTC CACCGGCTGGAGGAGTCTTCTCTGTGGAGGAGGACAAAGAACGACGAGC GGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGACGAGGTGGCTACCACGAGAA GTACCCCAACATCTACCACTGGCGAAGAAAGCTGGTGGACTCCACCGAC AAGCCGACCTGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGT TCCGGGGCACTTCTGATCGAGGGGACCTGAACCCCGACAACTCCGA CGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTC GAGGAGAACCCTATCAACGCCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGT CCGCCGGCTGTCCAAAGTCCCGGGCGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCT GCCCGGGAGAAAGAAACGGCCCTGTTGGCAACCTGATCGCCCTGTCC CTGGGCCCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG CCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCCAGATCGGGGACCAAGTACGCCGACCTGTCTCGCCGCCAAG AACCTGTCCGACGCCATCTGTGTTCGACATCTCTGGGGTGAAACACCG AGATCAACCAAGGCCCTGTCTCGCCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGA GCACCAACGAGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGCAGCAGCTG CCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGTCCAAGAACGGCTAG CCGGCTACATCGACGGCGGGCTCCAGGAGGAGTTCTACAAAGTTCAAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 6 6】

CAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCCGAGGAGCTGCTGGTGAAG CTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCT CCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCTCTGGGCG GCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCCTGAAGGACAAACGGGAGAAATCGAG AAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACGTGGGCCCTGGCCCCGG GCAACTCCCCGTTCCGCTGGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCAAC CCCCTGGAACCTCGAGGAGGTGGTGGAACAAGGCGCTCCGCCCAAGTCC TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAG TGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAAACGA GCTGAACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATCCGGAAGCCCCCTTC CTGTCGGGCGAGCAGAAAGAGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCA ACCGGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGAT CGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGAGAGACCGGTTCAAC GCCTCCCTGGGCACCTACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAG ACTTCCTGGACAAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCT GACCTTGACCTGTTCCAGGACCGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAG ACCTACGCCCAACCTGTTCCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCAT CCGGACAAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAGTCCGAC GGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC CCTGCACGAGCACATCGCCCAACCTGGCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAAG GGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 6 7】

GCCGGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCA GACCA CCCAGAAAGGCCCAGAAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATTCAAGGAGCTGGGCTCCCAAGATCCTGAAGGAGCA CCCC TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACTGCA GAACGGCCCGGACATGTACGTGGACCCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTG TCCGACTACGACGTGGACGCCATCGTGCCCCAGTCCTTCCTGAAGGAGG ACTCCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAAGAACCGGGCAA GTCCGACAAAGTGCCTCCGAGGAGGTGGTGAAAGAAAGATGAAGAACTAC TGGGGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACA ACCTGACCAAGCCGAGCGGGGGGGGGCTGTCCGAGCTGGACAAGCCCG CTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAAGACCCGGCAGATCACCAAGCACCTG GCCAAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAAGCTGGTGT CGACTCCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAAAC TACCACCAAGCCCAAGACGCTACCTGAACCGCGTGGTGGGCAACCGCCC TGATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCCGTGTACGGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGTCCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAAACATCATGAACCTCT TCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCAAAGCGGAGATCCGGAAAGCGGCCCT GATCGAGACCAAGCGCGAGACCGCGGAGATCGGTGTGGGACAAAGGCCGG GACTTCGCCACCCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGGGCGCTTCTCCAAAGGAGTCCATCCT GCCCAAGCGGAACTCCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 6 8】

	CCCAAGAAAGTACGGGGGCTTCGGACTCCCCCAACCGTGGCCCTACTCCGTGC TGGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGTCCAAAGAAAGCTGAAGTCCGT GAAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCCTTCGAGAAAG AACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCCGAGCTGGAGAACGG CCGGAAGCGGATGCTGGCCCTCCGCCGGGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAG CTGGCCCTGCCCTCCAAAGTACGTGAACCTTCCCTGTACCTGGCCCTCCCACT ACGAGAAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAAACGAGCAGAAAGCAGCTGTT CGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCC GAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAAGGTGC TGTCGGCCCTACAACAAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGA GAACATCATCCACCCTGTTCAACCCTGACCCAAACCTGGGCGCCCCCGCGCC TTCAAGTACTTCGACACACCACCATCGACCCGGAAGCGGTACACCTCCACCA AGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCCAGTCCATCACCGGCCCTGTA CGAGACCCGGATCGACCTGTCCCAAGCTGGGGCGGCGACTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 6 9】

2つのC末端N LS配列、なら びに開始および 終止コドンを含む 終止コドンを有 する、表4の低 A=ドンを使用 したdCas9 ORF	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCCTGGCCATCGGGCAACCACCTCCGTGG GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGGTGCCCTCCAAAGAAAGTTCAA GGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACCTCCATCAAGAAAGAACCTGATCGGC GCCCTGCTGTTCCGACTCCGGCGAGACCGCGAGGCCACCCGGCTGAAGC GGACCGCCCGGGCGGTACACCGCGGAGAACCGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCTCCAAAGAGATGGCCAAAGGTGGACGACTCCTTCTTC CACCGGCTGGAGGAGTCTTCTTGGTGGAGGAGGACAAAGAACGACGAGC GGACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACCAAGAGAA GTACCCCAACCATCTACCACTCGGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGAC AAGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAAGT TCCGGGGCCACTTCTGTGATCGAGGGGACCTGAACCCCGACAACTCCGA CGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTT GAGGAGAACCCCATCAACGCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGT CCGCCGGCTGTCCAAAGTCCCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCT GCCCGGGAGAAAGAAACGGGCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCC CTGGCCCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCCGAGGACG CCAAAGCTGCAGCTGTCCAAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCCAGATCGGGGACAGTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAG AACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGTGAACACCG AGATCACCAAGGCCCTGTCGCCCTCCATGATCAAGCCGTACGACGA GCACCAACGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCCGACGACCTG CCGAGAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGTCCAAAGAACGGCTACG CCGGCTACATCGACGGCGGCTCCCAAGAGGAGTTCTACAAAGTTCTAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 7 0】

CAAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCCGAGGAGCTGCTGGTGAAG CTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCT CCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCG GCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAG AAGATCCTGACCTTCGGGATCCCCTACTACGTGGGCCCTGGCCCGGG GCAACTCCCCGTTCCGCTGGATGACCCCGAAAGTCCGAGGAGACCATCAC CCCCTGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGCGCTCCGCCAGTCC TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAAG TGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTACCGTGTACAACGA GCTGACCAAGGTGAAGTAGGTGACCGAGGGCATCGGAAAGCCCGCTTC CTGTCCGGCGAGCAGAAAGAAAGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCA ACCGGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGAT CGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAAC GCCGCCCTGGGCACCTACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAG ACTTCCCTGGACAAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCT GACCTGACCCCTGTTCCGAGGACCCGGAGATGATCGAGGAGCCGCTGAAG ACCTACGCCCACTGTTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCAT CCGGGACAAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGAGCTTCCGTGAAGTCCGAC GGCTTCGCCCAACCGGAACCTCATGCAAGCTGATCCACGACGACTCCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGCCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC CCTGCACGAGCACATCGCCAAACCTGGCCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAA GGCATCCTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAAGGTGATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 7 1】

	GCCGGCACAAAGCCCGGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCA GACCACCCAGAAAGGGCCAGAAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCCAAGATCCTGAAGGAGCACCCCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGCCCCGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTG TCCGACTACGACGTGGACGCCCATCGTGCCCCCAGTCCTTCTGAAGGACG ACTCCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAAGAACCGGGGCAA GTCCGACAAAGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAAGAAAGATGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTGACA ACCTGACCAAGCCGAGCCGGGGCGGCTGTCCGAGCTGGACAAAGCCCG CTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTG GCCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAAGCTGGTGT CGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACCAAC TACCACCAAGCCCAAGACGCCCTACCTGAAGCCCGTGGTGGGCAACGGCCC TGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCCGTGTACGGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCGGAAAGATGATCGCCAAAGTCCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAAACATCATGAATCTCT TCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCT GATCGAGACCAACGGCGGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGCGCG GACTTCGCCACCCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGGGCGCTTCTCCAAAGGATCCATCCT GCCCAAGCGGAACTCCGACAAAGCTGATCGCCCCGGAAGAGGACTGGGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 7 2】

	CCC AAG AAG TAC GGG GGC TTG GAC TCC CCA CCG TGG CCTACT CCG TGC TGG TGG TGG CCA AGG TGG AGA AGG CAA GTCC AAG AAG CTGA AGT CCG T GA AGG AG CTG CTGG GCA TCACC ATCAT GGAG CGG TCC TCTCG AGAAG AAC CCA TCG ACTT CCTGG AGGCC AAG GCTACA AGG AGGTGA AGAAGG ACCTG ATCATCA AGCTGCC CAAAG TACTCC CTGTTG GAGCTGG AGAACGG CCG GAA GCGG ATGCTGG CCTCC GCGG GAGCTG CAGA AGGCAACGAG CTGG CCTG CCTCC AAGTACGTGA ACTTCC TGTACC TGG CCTCC CACT ACG AGAAG CTGA AGGCTCCCC GAGGAC AACGAG CAGACAGCTGTT CGTGG AGCAG CACAAG CACTACCTGG AGGAGATCATCG AGCAGTCTCC GAGTTCTCCA AGCGG GTATCTG GCGGAC AAGCCCATCC GGGAGCAGGCCGA TGTCGG CCTACAACAAGCACCGG GACAAGCCCATCC GGGAGCAGGCCGA GAACATCATCC ACCCTGTTCA CCTGAC CCAACCTGG GCGCCCCCGCCG TTCAAGTACTTCGAC ACCACCATCGAC CCGGAAGCGGTACACCTCCACCA AGGAGGTGCTGGACGCC ACCCTGATCCACCAGTCCATCACCGGCTGTAT CGAGACCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGCGAGCGCTCCGGCTCC CCCCAAG AAGCGG AAGTGGACGGCTCCCCCAAG AAGCGG AAGG TGGACTCCGGCTGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 7 3】

2つのC末端N LS配列、なら びに開始および 終止コドンを含む、表4の低 A/Uコドンを使用したCas 9 ORF	ATGGACAAAGAAGTACAGCATCGGCCCTGGACATCGGCCACCAACAGCGTGG GCTGGGCCGTGATCAACGACGAGTACAAAGTGCCCAAGAAAGTTCAA GGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGC GCCCTGCTGTTTCGACAGCGCGGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC GGACCGCCCGGGCGGTACACCGCGGAGAAACCGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTTGGACGACAGCTTCTTC CACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTGTTGGAGGAGACAAAGAACGACGAGC GGACCCCATCTTCGGCAACATCGTGACGAGGTGGCTACCAACGAGAA GTACCCCAACCATCTACCACTGCGGAAGAAGCTGGTGACAGCACCGAC AAGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAATGATCAAGT TCCGGGCCACTTCTTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAACAGCGA CGTGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGACAGACCTACAAACAGCTGTT GAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGCGGTGGACGCCAAGGCCATCCTGA GCGCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGT GCCCGCGAGAAAGAACGGCCCTGTTCCGCCAACCTGATCGCCCTGAGC CTGGCCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG CCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCCCAAGTCCGGGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAG AACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGGGGTGAAACACCG AGATCAACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGA GCACCAACAGGACCTGACCCCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGAGGACCTG CCCGAGAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGACAGAACGGCTACG CCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAAGTTCTAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 7 4】

CAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAG CTGAACCGGGAGGACCTGCTGCCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCA GCATCCCCCAACAGATCCACCTGGGGGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGC GCAGGAGGACCTTCTACCCCTTCCCTGAAAGGACAAACGGGAGAAATCGAG AAGATCCTGACCTTCCGGATCCCTACTACGTGGGCCCTGGCCCCGGG GCAACAGCCCGTTCCGCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGAGACCATCAC CCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGAACAAGGGCGCCAGGCCAGAGC TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAG TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTACCGTGTACAAACGA GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCCGCTTC CTGAGCGGGCAGCAGAAAGAACCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCA ACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGAT CGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAAAC GCCAGCCTGGGCACCTACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAG ACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCT GACCTGACCCCTGTTCCAGGACCCGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAG ACCTACGCCCACTGTTCCAGCAGCAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAAGCTGATCAACCGGCAT CCGGGACAAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAAGAGCGAC GGCTTCGCCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCCAAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG CCTGCACGAGCACATCCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAAG GGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 7 5】

	GCCGGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCA GACCACCAGAAAGGGCCAGAAAGAAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCCTGAAGGAGCAACCCCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAGAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGCCCGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTG AGCACTACGACGTTGGACCAACATCGTGCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACG ACAGCATCGAACAAAGGTGCTGACCCCGGAGCGAACAAACCGGGGCAA GAGCGACAAAGTGCCTCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACA ACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGGGGCGCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGG CTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGAGACCCCGCAGATCACCAAGCACGCTG GCCAGATCCTGGACACGCCGATGAACACCAAGTACGACGAGAAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAG CGACTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGTGCGGGAGATCAACAAAC TACCAACACGCCACGACGGCTACCTGAACCGCGTGGTGGGCACCGCCC TGATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGAGCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAAGACCGAGATCACCTGGCCACCGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGACCGCGGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGG GACTTCGCCACCGTGCAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGCGCGCTTCAGCAAGGAGACATCCT GCCCAAGCGGAACAGCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAAGAACTGGGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 7 6】

	CCC AAG AAG TAC GGC GGC CTT CGA CAG CCCC CAC CGG TGG CCT AC A GCG GTG C TGG TGG TGG CCA AGG TGG AGA AAG GCA AGG CAA GAG CAA GAA GCT GA A GAG CGG T GAA GGA GCT GCT GGG CAT CACC ATCAT TGG AGCGG AGC AGCTT CGA GAA G AAG CCCC ATCG ACTT CCT GGA GGC CAA GGG CTA CAA GGA GGT GA A GAA G ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCCGAGCTGGAGAACGG CCGGAAGCGGATGCTGCCCAGCGCCGGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAG CTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAAC TTCTGTACCTGGCCAGCCACT ACGAGAAGCTGAAGGCGAGCCCGAGGACAA CGAGCAGAA GCA GCTGTT CGTGGAGCAGCACAA GCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGCGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGC TGAGCCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGA GAACATCATCCACCCTGTTCA CCTGACCAACCTGGGCGCCCGCGGCC TTCAAGTACTTCGACACCA CCACTCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACCA AGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCAC CAGAGCATCACCGGCCCTGTA CGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCAGCGGCAGC CCCAAGAGAAGCGGAAGGTGGACGGCAGCCCCCAAGAAAGCCGAAGG TGGACAGCGGCTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 7 7】

開始および終止 コドン有り、 NLS有りなし い、表4の低A ／U=ドンを 使 用したCas9 ORF	ATGGACAAAGAAAGTACAGCATCAGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGG GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGGTGCCCAGCAAGAAAGTTCAA GGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGC GCCCTGCTGTTCCAGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC GGACCCCGCGCGGTACACCGCGGGAAGAACCGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTGGACGACAGCTCTTC CACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAAGAACGAGC GGACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACCAAGAGAA GTACCCCAACATCTACCACTGCGGGAAGAGCTGGTGGACAGCACCGAC AAGCCGACCTGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAATGATCAAGT TCCGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAACAGCGA CGTGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTT GAGGAGAACCCCATCAAGCCAGCGCGGTGGACGCCAAGGCCATCCTGA GGCCCGGCTGAGCAAGAGCGCGGCGGTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCT GCCCGGGAAGAAAGAACGGCCCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGAGC CTGGGCCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG CCAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAAACCT GCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCGACCTGTTCTGCGCCGCAAG AACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGA AGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGA GCACCAAGGACCTGACCCCTGCTGAAGGCCCTGGTCCGGCAGCAGCTG CCGAGAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGCTAGC CCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAAGTTCAAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 7 8】

CAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAG CTGAACCGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCA GCATCCCCCACCAAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCG GCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAG AAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCTGGCCCCGGG GCAACAGCCGGTTCGCCCTGGATGACCCGGAAAGAGGAGAGACCATCAC CCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGACAAAGGCGCCACGCCCCAGAGC TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG TGCTGCCAAGCACAGCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGA GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCCCTTC CTGAGCGGCGAGCAGAAAGAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCA ACCGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGAT CGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAAC GCCAGCCTGGGCACCTACACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCCTGGACAAACGAGGAGAACGAGACATCCTGGAGGACATCGTGCT GACCTGACCCCTGTTCCAGGACCCGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAG ACCTACGCCCCACCTGTTCCAGCGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCAT CCGGGACAAAGCAGAGCGGCAAAGACCATCCTGGACTTCTGAAAGCGGAC GGCTTCGCCAACCCGGAACCTCATGCAAGCTGATCCACGACGACAGCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG CCTGCACGAGCACATCGCCCAACCTGGCCCGGACGCCGCCCATCAAGAAAG GGCATCCTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 7 9】

GCCGGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGGAGAAACCA GACACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCAACCCCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGCCGGGACATGTACCTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTG AGGACTACGACCTGGACCAACATCGTGCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACG ACAGCATCGAACAAAGGTGCTGACCCCGGAGCGAACAAACCGGGGCAA GAGCGACAAACGTGCCCAAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGTGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACA ACCTGACCAAGCCGAGCGGGCGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGG CTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCCGGCAGATCACCAAGCACGTG GCCCAGATCCTGGACACGCCGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAG CGACTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGTGCGGGAGATCAACAAAC TACCAACACGCCCAAGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCC TGATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCCGAAGATGATCGCCAAAGAGCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCACCGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGG GACTTCGCCACCCGTCCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAGAACACCGAGGTCCAGACCCCGCGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCT GCCCAAGCGGAACAGCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 8 0】

	CCCAGAAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCCGTGGCCCTACAGCGTGC TGGTGGTGGCCAAAGTGGAGAAAGGCCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGT GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAAG AACCCCATCGACCTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAAGAGGTGAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAAACGG CCGGAAGCCGATGCTGGCCAGCCGCCGGGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAG CTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCAGCCACT ACGAGAAAGCTGAAGGCAGCCCCGAGGACAAAGAGCAGAAAGCAGCTGTT CGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGC TGAGCGCCCTACAACAAGCACCGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGA GAACATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGCGCCCGCGCGCC TTCAAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGGGTACACCAAGCAACA AGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAAGAGCATCACCGGCGCTGTA CGAGACCCCGGATCGAACCTGAGCCAGCTGGGCGCGGACTGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 8 1】

開始および終止 コドンを含む る、表 4 の低 A ／U コドンを使 用した C a s 9 ニックアーゼ OR F	ATGGACAAGAAAGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGCACCAACACAGCGTGG GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGGTGCCCCAGCAAGAAAGTTCAA GGTGC TGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGC GCCCTGCTGTTCCAGACAGCGGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAAGC GGACCGCCCGGCGGTACACCGCGGGAAGAACCGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGGTGGACGACAGCTTCTTC CACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCCTGGTGGAGGAGGACAAAGAACGAGGC GGACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACCAAGAGAA GTACCCCAACATCTACCACTTGGGGAAGAAAGCTGGTGGACAGCACCGAC AAGCCGAGCTGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGT TCCGGGGCCACTTCCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAACAGCGA CGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACAGCTGTTT GAGGAGAACCCTCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCCAAGGCCATCCTGA GGCCCGGCTGAGCAAGAGCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCT GCCCGCGAGAAAGAAACCGCCCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGAGC CTGGGCCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG CCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCCCAAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGCGCCGCAAG AACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAAACACCG AGATCACCAAGGCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGA GCACCAAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGAGGAGCTG CCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCCAGCCAGAGCAAGAACGGCTACG CCGGCTACATCGACCGCGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAAGTTTCAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 8 2】

CAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAG CTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGACAGCGGACCTTCGACAAACGGCA GCATCCCCCACCAAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCG GCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAG AAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACGTGGCCCCCTGGCCCCGG GCAACAGCCCCGTTCCGCTGGATGACCCGGAAAGCGAGGAGACCATCAAC CCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAAGGCGCCACGCCCCAGAGC TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAG TGCTGCCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGA GCTGACCAAGGTGAAGTAGGTGACCGAGGGCATCGGGAAGCCCCCTTC CTGAGCGGCGAGCAGAAAGAACCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCA ACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGAT CGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGAGGACCGGTTCAAC GCCAGCCTGGGCACCTACACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGG ACTTCTGGACAAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCT GACCCTGACCCCTGTTCCGAGGACCGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAG ACCTACGCCCCACCTGTTCCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCAT CCGGGACAAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAAGCGGAC GGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCACTGATCCACGACGACAGCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCCCAGGTGAGCGGCCAGGCGGACAG CCTGCACGAGCACATCGCCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAAG GGCATCCTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 8 3】

	GCCGGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCA GACCACCAGAAAGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCCTGAAGGAGCAACCCCG TGGAGAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGCCCGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTG ACCGACTACGACGTGGACCAATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACG ACAGCATCGACAAACAAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAAGAACCGGGCAA GAGCGACAAAGTGTCCACGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACA ACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAAGCCCG CTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCCGCAGATCACCAAGCACCTG GCCAGATCCTGGACAGCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAG CGACTTCGGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAAAC TACCACCAAGCCCAAGCGCTACCTGAACCGCGTGGTGGGCACCGCCC TGATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGAGCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCGCCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCACCGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGACCGCGGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGG GACTTCGCCACCGTGCAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGCGCGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCT GCCCAAGCGGAACAGCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAAGAACTGGGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 8 4】

CCCAAGAAAGTACGGCGGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGC TGGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAAGAGCGT GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGGAAG AACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCCAGCTGGAGAACGG CCGGAAGCCGATGCTGGCCAGCCCGCGGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAG CTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCAGCCACT ACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAACGAGCAGAAGCAGCTGTT CGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGCGGGTGA'TCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGC TGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGA GAACATCATCCACCTGTTCAACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCC TTCAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGGAAGCGGTACACCAAGCACA AGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAAGAGCATCACCGGCCCTGTA CGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCCGACGGCGGGCAGC CCCAAGAAAGCGGAAGGTGTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 8 5】

2つのC末端N LS配列、なら びに開始および 終止コドンを含む、表4の低 A/U=ドンを 使用したCas 9ニッケアゼ RF	3 2 3	ATGGACAAAGAAAGTACAGCATCGGCCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGG GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGGTGCCCCAGCAAGAAGTTCAA GGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGC GCCCTGCTGTTGACAGCGCGGAGACCGCGAGGCCACCGGCTGAAGC GGAACCGCCCGCGCGGTACACCGCGGAGAAACCGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGGTGGACGACAGCTTCTC CACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTGTTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGC GGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACCAAGAGAA GTACCCCAACCTACCAACCTGGCGAAGAAAGTGGTGGACAGCAACCGAC AAGCCCGACCTGGCGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGT TCCGGGGCCACTTCCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGGA CGTGGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTT GAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGA GCGCCCGCTGAGCAAGAGCCGGCGGTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCT GCCCGCGGAGAAAGAAACGGCCCTGTTGGCAACCTGATCGCCCTGAGC CTGGCCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG CCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAAACCT GCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAG AACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGCCAGCATCCTGGGGTGAACACCG AGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGA GCACCAACGAGACCTGACCTGCTGAAGCCCTGTCGGGACGACCTG CCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCAGCAAGCAAGAGGCTACG CCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCTAT

10

20

30

40

50

CAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAG CTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCA GCATCCCCCACCAGATCCACCTGGCGGAGCTGCACGCCATCCTCGCGCGG GCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGTAAAGGACACCGGGAGAAATCGAG AAGATCCTGACCTTCCGGATCCCTACTACGTGGGCCCTGGCCCCGGG GCAACAGCCGGTTCCGCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGAGACCATCAC CCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGGCCAGAGC TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCAACGAGAAAG TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAACGTGTACAAACGA GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGGGGAAGCCCGCCTTC CTGAGCGGGCAGCAGAAAGAGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCA ACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGAT CGAGTGTCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAAC GCCAGCCTGGGCACCTACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAG ACTTCCCTGGACAAACGAGGAGAACGAGACATCCTGGAGGACATCGTGCT GACCTTGACCCCTGTTCCAGGACCGGGAGATGATCGAGAGCGGCTGAAG ACCTACGCCCCACCTGTTCCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGCAGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCAT CCGGACAAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAGAGCGAC GGCTTCGCCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG CCTGCACGAGACATCGCCAACTGGCCGGCAGCCCGGCATCAAGAAAG GGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG

50

【表 4 3 - 2 8 7】

	GCCGGCACAAAGCCCGAGAGAACATCGGTGATCGAGATGGCCCGGGGAGAAACCA GACCACCCAGAAAGGCCACAGAAAGAACACAGCCCGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACTCTACTACCTGCA GAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTG AGCGACTACGACCTGGACCAACATCGTGCCCCAGAGCTTCTGAAGGACG ACAGCATCGACAAACAAAGGTGCTGACCCCGGAGCGACAAAGAACCGGGGCAA GAGCGACAAAGTGCCTCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACA ACCTGACCAAGCCGAGCGGGGGGGCTGAGCGAGCTGGACAAAGCCCG CTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTG GCCAGATCCTGGACAGCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAG CGACTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGGGGAGATCAACAAAC TACCAACAGGCCACGACGCCCTACCTGAACGCCCTGGTGGGCACCGCCC TGATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGAGCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCGCCAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAAAGACCGAGATCAACCTGGCCACCGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCT GATCGAGAACCAACGGCGAGACCGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCCG GACTTCGCCACCGTGCCGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGGGCGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCT GCCAAGCGGAACAGCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 8 8】

CCCAAGAAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCCTACAGCGTGC TGGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGT GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGGAAG AACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAAGGAGGTGAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCCAGCTGGAGAACGG CCGGAAGCGGATGCTGGCCAGGCCCGGCCAGCTGCAGAAAGGCCAACGAG CTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCAGCCACT ACGAGAAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAACGAGCAGAAAGCAGCTGTT CGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAAGGTGC TGAGCGCCTACAACAAGCACCGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGA GAACATCATCCACCCTGTTCAACCCTGACCAACCCTGGGCGCCCCCGCGCC TTCAAGTACTTCGACACCCACCATCGACCCGGAAGCGGTACACCCAGCACCA AGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCCTGTA CGAGACCCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGGACGGCAGCGGACGC CCCAAGAAAGAACCGGAAGGTGGACGGCAGCCCCAACAGAAAGCCGGAAGG TGGACAGCGGCTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 8 9】

開始および終止 コドン有り、 NLS有りなし い、表4の低A ／Uコドンを使 用したC a s 9 ニック---ゼOR F	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGcCATCGGCACCAACAGCGTGG GCTGGGCCGTGATCAACCGACGAGTACAAGGTGCCACGAAAGTTCAA GGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGC GCCCTGCTGTTCCGACAGCGCGGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC GGACCGCCCGCGCGGTACACCGCGGGAAGAACCGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTGGACGACAGCTTCTTC CACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCCTGGTGGAGGAGGACAAAGAACGAGGC GGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACCAAGAGAA GTACCCACCATCTACCACTGCGGGAAGAGCTGGTGGACAGCACCGAC AAGCCGACCTGGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAATGATCAAGT TCCGGGGCCACTTCCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAACAGCGA CGTGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTT GAGGAGAACCCTCAACGCCAGCGCGGTGGACGCCAAGGCCATCCTGA GGCCCGGCTGAGCAAGAGCGCGCGGTGGAGAACCTGATCGCCAGCT GCCCGCGAGAAAGAAACCGCCCTGTTCCGCCAACCTGATCGCCCTGAGC CTGGGCCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG CCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAG AACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGGGGTGAACACCG AGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGA GCACCAACAGGACCTGACCCCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGAGCAGCTG CCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGCAAGAACGGCTACG CCGGCTACATCGACCGCGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAAGTTCAT

10

20

30

40

50

【表 43 - 290】

CAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCCGAGGAGCTGCTGGTGAAG CTGAACCGGGAGGACCTGTGCTGCGGAAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCA GCAATCCCCACCAAGATCCACCTGGCGGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCG GCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAGAGGACAAACCGGAGAAAGATCGAG AAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGCCCCCTGCCCCGGG GCAACAGCCGGTTGCGCTGGA'TGACCCGGAAGAGGAGGAGACCATCAC CCCCTGGAAC'TTCGAGGAGGTGGTGGACAAAGGCGCCACGCGCCACAGAGC TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAG TGCTGCCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAAACGA GCTGACCAAGGTGAAGTAGGTGACCGAGGGCATGGGGAAGCCCCCTTC CTGAGCGGGAGCAGAAAGAAAGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCA ACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGAT CGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAAC GCCAGCCTGGGCACCTACACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAG ACTTCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACA'TCGTGCT GACCCGTACCCCTGTTCCGAGGACCCGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAG ACCTACGCCCCACCTGTTGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCAT CCGGGACAAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAAGAGCGAC GGCTTCGCCAACCGGAAC'TTCA'TGACGCTGATCCACGACGACAGCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG CCTGCACGAGCACATCCCCAACCTGGCCCCGACCCCCGCCATCAAGAAAG GGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGCTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 9 1】

GCCGGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCA GACCACCCAGAAAGGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAAAGGCGGGGACATGTACGTGGACACAGGAGCTGGACATCAACCGGCTG AGCGACTACGACGTGGACCAACATCGTGCCCCAGAGCTTCTGAAGGAG ACAGCATCGAACAAACAAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAAGACCGGGCAA GAGCGAACCGTGCCACGAGGAGGAGGTGTGAGAGATGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAAAGCCCAAGCTGATCAACCAGCGGAAAGTTCCGACA ACCTGACCAAGCCGAGCGGGGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGG CTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACCTG GCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAG CGACTTCCGGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGGTGCGGAGATCAACAAAC TACCAACACGCCCAAGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGCACCCGCC TGATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGACCGAGTTCGTGTACCGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAGAGCGGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCAAACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGCCGG GACTTCGCCACCGTGCCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAAGAACCGAGGTGCAGACCGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCT GCCAAAGCGGAACAGCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 9 2】

	CCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCCTACAGCGTGC TGGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGGCAAGAGCAAGAGCTGAAGAGCGT GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAAG AACCCCATCGACTTCCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCCAGCTGGAGAACGG CCGGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCGCGGAGCTGCAGAAAGGCAACGAG CTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACCTTCCGTACCTGGCCAGCCACT ACGAGAAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAACGAGCAGAAAGCCTGTT CGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGC TGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGA GAACATCATCCACCCTGTTCACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGGCC TTCAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAAGCACCA AGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAAGAGCATCACCGGCCCTGA CCAGACCCCGATCGACCTGAGCCAGCTGGGGGGGGCACTGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 9 3】

開始および終止 コドンを含む る、表 4 の底 A ／U コドンを使 用した d C a s 9 O R F	ATGGACAAGAAAGTACAGCATCGGGCTGGcCATCGGGCACCAACAGCGTGG GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGGTGCCACAGCAAGAAATTCAA GGTGTCTGGGCACACCCGACCGGCACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGC GCCCTGCTGTTCCGACAGCGGGGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC GGACCGCCCGCGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTGGACGACAGCTTCTTC CACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTGTTGGTGGAGGAGACAAAGAACGACGAGC GGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGACGAGGTGGCTACCAACGAGAA GTACCCCAACCATCTACCACTGCGGAAGAAAGCTGGTGGACAGCACCGAC AAGCCGAGCTGGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGT TCCGGGGCCACTTCTGTATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAAGCGA CGTGGACAAAGCTGTTTATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTTT GAGGAGAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGACGCCCAAGGCCATCCTGA GGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCACAGCT GCCGGCGGAGAAAGAACCGGCTGTTGGCCAACTGATCGCCCTGAGC CTGGGCCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG CCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCCACAGATCGGCGACCACTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAG AACCTGAGCGACGCCATCTGCTGAGCGACATCTCGGGGTGAACACCG AGATCACCAAGGCCCTGTAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGA GCACCAACAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGGGCGAGCAGCTG CCCGAGAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGACAGAACGGCTACG CCGGCTACATCGACGGCGGCGCACGCCAGGAGGAGTTCTACAAAGTTCAT	3 2 5

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 9 4】

C A A G C C C A T C C T G G A G A A G A T G G A C G G C A C C G A G G A G C T G C T G G T G A A G	
C T G A A C C G G A G G A C C T G C T G C G G A A G C A G C G G A C C T T C G A C A A C G G C A	
G C A T C C C C A C C A G A T C C A C C T G G C G A G C T G C A C G C C A T C C T G C G G C G	
G C A G G A G A C T T C T A C C C T T C C T G A A G G A C A A C C G G G A A G A T C G A G	
A A G A T C C T G A C C T T C C G G A T C C C T A C T A C G T G G C C C C C C C T G C C C G G	
G C A A C A G C C G T T C G C C T G G A T G A C C C G A A G G C G A G C G A G A C C A T C A C	
C C C C T G G A A C T T C G A G G A G T G G T G G A C A A G G C G C C A G C G C C A G A G C	
T T C A T C G A G C G G A T G A C C A A C T T C G A C A A G A A C C T G C C C A A C G A G A A G	
T G C T G C C C A A G C A G C C T G C T G T A C G A G T A C T T C A C C T G T A C A A C G A	
G C T G A C C A A G T G A A G T A C G T G A C C G A G G C A T G C G G A A G C C C C C T T C	
C T G A G C G G C G A G C A A G A A G C C A T C C T G G A C C T G C T G T T C A A G A C C A	
A C C G G A A G T G A C C C T G A A G C A G C T G A A G G A G G A C T A C T T C A A G A A G A T	
C G A G T G C T T C G A C A G C G T G G A G A T C A G C G G C G T G G A G G A C C G G T T C A A C	
G C C A G C C T G G G C A C C T A C C A C G A C C T G C T G A A G A T C A T C A A G G A C A A G	
A C T T C C T G G A C A A C G A G G A A C G A A C G A C A T C C T G A G G A C A T C G T G C T	
G A C C C T G A C C C T G T T C G A G G A C C G G A G A T G A T C G A G G A G C C G C T G A A G	
A C C T A C G C C C A C C T G T T C G A C G A C A A G T G A T G A A G C A G C T G A A G C G G C	
G G C G T A C A C C G G C T G G G C C G G C T G A G C C G G A A G C T G A T C A A C G G C A T	
C C G G A C A A G C A G C G G C A A G A C C A T C C T G G A C T T C C T G A A G A G C G A C	
G G C T T C G C C A A C C G G A A C T T C A T G C A G C T G A T C C A C G A C G A C A G C C T G A	
C C T T C A A G G A G G A C A T C C A G A A G C C C A G G T G A C C G G C C A G G C C G A C A G	
C C T G C A G G A C A T C G C C A A C C T G G C C G G C A G C C C C G C A T C A A G A A G	
G G C A T C C T G C A G A C C G T G A A G G T G G T G G A C G A C G A C G T G G T G A A G G T G A T G G	

10

20

30

40

50

【表 43 - 295】

	GCCGGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCA GACCACCAGAAAGGCCAGAAAGAAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGCCCGGACATGTACGTGGACCAAGGAGCTGGACATCAACCGGCTG AGCACTAGGACGTGGACACCATCGTGCCCCAGAGCTTCTGAAGGAGG ACAGCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAAGAACCGGGGCAA GAGCGACAAAGTGTCCAGCGAGGAGGTGGTGAAAGAAATGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACA ACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGGGGCTGAGCGAGCTGGACAAAGCCCG CTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCCGCAGATCACCAAGCACGTG GCCCAGATCCTGGACAGCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAG CGACTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGTGCGGGGAGATCAACAAAC TACCAACAGCCCAAGAGCCCTACCTGAACGCCCTGGTGGGCACCGCCC TGATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGAGCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAGACCGAGATCACCCCTGGCCAAAGCGGAGATCCGGAAAGCGGCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGG GACTTCGCCACCGTGGGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCT GCCCAAGCGGAACAGCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 9 6】

	CCCAAGAAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGC TGGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGT GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAAG AACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAAGGAGGTGAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCCGAGCTGGAGAACGG CCGGAAGCCGATGCTGGCCAGCCCGCGGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAG CTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCAGCCACT ACGAGAAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAAGAGCAGAAAGCAGCTGTT CGTGGAGCAGCAAAAGCACTACCTGGACGAGATCATTCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAAGGTGC TGAGCGCCCTACAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGA GAACATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGGCGCCCCCGGCC TTCAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACAGCACCA AGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAAGAGCATCACCGGCCCTGTA CGAGACCCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGGCGGCGACGGCGGGCGCAGC CCCAAGAAAGCGGAAGGTGTGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 9 7】

2つのC末端N LS配列、なら びに開始および 終止コドンを含む 終止コドンを含む する、表4の低 A/Uコドンを用 いたdCa s9 ORF	ATGGACAAAGTAACAGCATCGGCCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGG GCTGGCCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCACGCAAGAAGTTCAA GGTCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGC GCCCTGCTGTTCCACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCGGCTGAAGC GGACCGCCCGCGCGGTACACCGCGGGAAGAACGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTGGACGACAGCTTCTTC CACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAAGAACGACGAGC GGACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACACGAGAA GTACCCACCATCTACACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGAC AAGCCGACCTGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGT TCCGGGCCACTTCCTGATCGAGGCGCACTGAACCCGACAAACGCGA CGTGACAAAGCTGTTCTATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTT GAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCTCTGA GGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCCTGATCGCCCAAGCT GCCCGCGAGAAAGAACCGGCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGAGC CTGGGCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG CCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAAACCT GCTGGCCCAAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCAAG AACCTGAGCGACGCCATCTCTGCTGAGCGACATCTCGGGGTGAACACCG AGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGA GCACCAAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGTTGGGCGACGAGCTG CCGAGAAATACAAGGATCTTCTTCCACCAAGCAAGAACGGCTACG CCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCTAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 9 8】

C A A G C C C A T C C T G G A G A A G A T G G A C G G C A C C G A G G A G C T G C T G G T G A A G	
C T G A A C C G G A G G A C C T G C T G C G G A A G C A G C G G A C C T T C G A C A A C G G C A	
G C A T C C C C C A C C A G A T C C A C C T G G G C G A G C T G C A C G C C A T C C T G C G G C G	
G C A G G A G A C T T C T A C C C T T C C T G A A G G A C A C C G G G A A G A T C G A G	
A A G A T C C T G A C C T T C C G G A T C C C T A C T A C G T G G C C C C C T G C C C G G	
G C A A C A G C C G G T T C G C T G G A T G A C C C G A A G A G C G A G A C C A T C A C	
C C C C T G G A A C T T C G A G G T G G T G G A C A A G G C C C A G C C C C A G A G C	
T T C A T C G A G C G G A T G A C C A A C T T C G A C A A G A A C C T G C C A C G A A G G	
T G C T G C C C A A G C A C A G C C T G C T G T A C G A G T A C T T C A C C G T A C A A C G A	
G C T G A C C A A G G T G A A G T A C G T G A C C G A G G C A T G C G A A G C C C G C T T C	
C T G A G C G G C G A G C A A G A A G C C A T C C T G G A C C T G C T G T T C A A G A C C A	
A C C G G A A G G T G A C C G T G A A G C A G C T G A A G G A G G A C T A C T T C A A G A A G A T	
C G A G T G C T T C G A C A G C G T G G A G A T C A G C G G C G T G G A G A C C G G T T C A A C	
G C C A G C C T G G G C A C C T A C C A C G A C C T G C T G A A G A T C A T C A A G G A C A A G G	
A C T T C C T G G A C A A C G A G G A A C G A G A C A T C C T G G A G G A C A T C G T G C T	
G A C C C T G A C C C T G T C G A G G A C C G G A G A T G A T C G A G G A C C G G C T G A A G	
A C C T A C G C C C A C C T G T T C G A C G A C A A G G T G A T G A A G C A G C T G A A G C G G C	
G G C G T A C A C C G G C T G G G C C G G C T G A G C C G G A A G C T G A T C A A C G G C A T	
C C G G A C A A G C A G C G G C A A G A C C A T C C T G G A C T T C C T G A A G A G C G A C	
G G C T T C G C C A A C C G G A A C T T C A T G C A G C T G A T C C A C G A C G A C A G C C T G A	
C C T T C A A G G A G A C A T C C A G A A G C C C A G G T G A G C G G C C A G G C G G A C A G	
C C T G C A C G A G C A T C G C C A A C C T G G C C G G C A G C C C G G C A T C A A G A A G	
G G C A T C C T G C A G A C C G T G A A G G T G G T G G A C G A C G A G C T G G T G A A G G T G A T G G	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2 9 9】

GCCGGCACAAAGCCCGAGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCA GACCACCCAGAAAGGCCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGCCGGGACATGTACGTGGACGAGGAGCTGGACATCAACCGGCTG AGCGACTACGACGTGGACGCCATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACG ACAGCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAAGAACCCGGGCAA GAGCGACAAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAAGATGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCAACCAGCGGAAGTTCGACA ACCTGACCAAGCCGAGCGGGCGGCTGAGCGAGCTGGACAAGCCCG CTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCAACCAAGCACGTG GCCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAG CGACTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGTGCGGGAGATCAACAAC TACCACCAAGCCCAAGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGCGCACCCGCC TGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCCGTACCGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCCGGAAGATGATCGCCCAAGAGCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACGCCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCT TCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCACCGGCGAGATCCGGAAAGCGCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGAACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGG GACTTCGCCACCGTGCCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAGAAGACCGAGCTCCAGACCCGGCGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCT GCCCAAGCGGAACAGCGACCAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 0 0】

CCCAAGAAAGTACGGCGGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCCTACAGCGGTGC TGGTGGTGGCCAAAGTGGAGAAAGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGGT GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAGAG AACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAAGGAGGTGAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCCAGCTGGAGAACGG CCGGAAGCCGATGCTGGCCAGGCCCGGGCAGCTGCAGAAAGGCCAACGAG CTGGCCCTGCCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCAGCCACT ACGAGAAAGCTGAAGGCGAGCCCCGAGGACAAACGAGCAGAAAGCAGCTGTT CGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGC TGAGCGCCTACAACAAGCACCGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGA GAACATCATCCACCTGTTCAACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCC TTCAAGTACTTCGACACACCACCATCGACCCGGAAGCGGTACACCAGCACCA AGGAGGTGCTGGACGCCACCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCCTGTA CGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGAGCCGAGCGGCAGC CCCAAGAAAGAGCGGAAGGTGGACGGCAGCCCCAAGAAAGAAAGCGGAAGG TGGACAGCGGGCTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 0 1】

開始および終止 コドンを含し、 NLSを有しな い、表 4 の低A ／Uコドンを使 用した d C a s 9 ORF	ATGGACAAGAAAGTACAGCATCGGCCCTGGcCATCGGCACCAACAGCGTGG GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGTGTCCCAAGCAAGAAAGTTCAA GGTGTGGGCAACACCGACCGGACAGCATCAAGAAAGAACTGATCGGC GCCCCTGCTGTTCGACAGCGCGGAGACCGCGGAGGCCACCCGGCTGAAGC GGACCGCCCGCGCGGTACACCGCGGAGAAACCGGATCTGCTACCT GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGCCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTC CACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTCTGGTGGAGGAGCAAGAAAGCACGAGC GGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCAAGAGAA GTACCCCAACCATCTACCACTGGGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGAC AAGCCGACCTCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGT TCCGGGGCCACTTCTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGA CGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTTT GAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGA GGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGT GCCGGCGGAGAAAGAAACGGCCCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGAGC CTGGGCCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACG CCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCCAGATCGGGGACCAAGTACGCCGACCTGTCTCTGGCCGCCAAG AACCTGAGCGACGCCATCTCTGCTGAGCGACATCTCTGGGTGAAACCCG AGATCACCAAGGCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGA GCACCAACAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGACGACCTG CCCGAGAAAGTACAAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGCAAGAACGGCTAGC CCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAAGTTGAT

3 2
7

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 0 2】

CAAGCCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCCGAGGAGCTGCTGGTGAAG CTGAACCCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCA GCATCCCCCAACAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCCGGCG GCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGTAAGGACAAACGGGAGAAATCGAG AAGATCCTGACCTTCGGGATCCCTACTACGTGGGCCCTTGGCCCCGGG GCAACAGCCGGTTCCCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCAC CCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAAGGGGCCAGCGCCAGAGC TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAG TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAACGTGTACAAAGA GCTGACCAAGGTGAAGTAGGTGACCGAGGGCATCGGAAAGCCGCCCTTC CTGAGCCGGGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTCAAGACCA ACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGAT CGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAAC GCCAGCCTGGGCACCTACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCT GACCTGACCCCTGTTCCAGGACCGGGAGATGATCGAGGACCGGCTGAAG ACCTACGCCCACTGTTCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCAT CCGGGACAAAGCAGAGCGGCAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGAC GGCTTCGCCAACCAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCCTGA CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCAGGTGAGCGGCCAGGGGACAG CCTGCACGAGCACATCGCCAAACCTGGCCCGCAGCCCGGCATCAAGAAAG GGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 0 3】

GCCGGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCA GACCACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATC GAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG TGGAGAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTG AGCGACTACGACGTGGACgCATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACG ACAGCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCCGAGCGACAAGAACCGGGGCAA GAGCGACAAACGTGCCACGCGAGGAGGTGGTGAAAGATGAAGAACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAATTGACCA ACCTGACCAAGCCGAGCGGGCGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGG CTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGAGACCCCGGCAGATCACCAAGCACGTG GCCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACA AGCTGATCCGGGAGGTGAAGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAG CGACTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAAAC TACCACCAAGCCCAAGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCC TGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACCGCGACTA CAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCCAAGAGCGAGCAGGAGATC GGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTACAGCAACATCATGAACTTCT TCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCT GATCGAGACCAACGGCGAGACCGGGGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGG GACTTCGCCACCGTGCCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCG TGAAAGAACCGAGGTGCAGACCGGGGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCT GCCCAAGCGGAACAAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 0 4】

CCCCAAGAAGTACGGCGGGCTTCGACAGCCCCCACCCTGGCCCTACAGCGGTGC TGGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGGCCAAAGAGCAAGAAAGCTGAAAGAGCGT GAAAGGAGCTGCTGGGCATCACCCATCATGGAGCCGGAGCAGCTTCGAGAAAG AACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCCGAGCTGGAGAACGG CCGGAAGCGGATGCTGGCCAGGCCCGCGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAG CTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCAGCCACT ACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAACGAGCAGAAAGCAGCTGTT CGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCCTGGCCGACGCCCAACCTGGACAAAGGTGC TGAGCGGCTACAAACAAGCAACCGGGAACAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGA GAACATCATCCACCTGTTCAACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCC TTCAAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCCGGAAGCGGTACACCAAGCACCA AGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAAGAGCATCACCGGCCCTGTA CGAGACCCGGATCGAACCTGAGCCAGCTGGGCGCGGACTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 0 5】

開始コドンおよび終止コドンを有する、表 4 の低Δコドンを使用した Nme C a s 9 OR F	3 2
	8
ATGGCCGGCCCTTCAAGCCCCAACTCCATCAACTACATCCTGGGCCCTGGACA TCGGCATCGCCCTCCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGATCGACGAGGAGGA GAACCCCATCCGGCTGATCGACCTGGGCGTGGGGTGTTCGAGCGGGCC GAGGTGCCCAAGACCGGCGACTCCCTGGCCAATGGCCCCGGGCTGGCCC GGTCCGTGGGGCGGCTGACCGGGGGGGGGGCCACCGGCTGCTGGGAC CCGGCCGCTGCTGAAGCGGGAGGGCGTGTCCAGGCCGCCAACTTCGAC GAGAACGGCCGTGATCAAGTCCCTGCCCAACAACCCCTGGCAGCTGGGG CCGGCCCTGGACCGGAAGCTGACCCCTGGAGTGGTCCGCCGTGCT GCTGCACCTGATCAAGCACCGGGGCTACCTGTCCACGGGAAGAACGAG GGGAGACCGCCGACAAGGAGCTGGGGCCCTGCTGAAGGGCTGGCCG GCAACCCCAAGCCCTGCAGACCGGGCACTTCGGACCCCGCCGAGCT GGCCCTGAACAAGTTCGAGAAGGAGTCCGGCCACATCCGGAAACAGCGG TCCGACTACTCCCAACACTTCTCCGGAAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGA TCCGTGCTGTTGGAGAGCAGAAAGAGTTCCGGCAACCCCACTGTCCGG CCGCCTGAAAGAGGGCATCCAGACCCCTGCTGATGACCCAGCCGCCGCC CTGTCCGGCGACCGGTGCAGAAAGATGCTGGGCCACTGCACCTTCGAGC CCGCCAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCCCGGAGCGGTTCAT CTGGCTGACCAAGCTGAACAACCTGCCGATCCTGGAGCAGGGCTCCGAG CGGCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCTGATGGACGAGCCCTACC GGAAGTCCAAAGCTGACCTACGCCAGGCCCGGAAGCTGCTGGGCCCTGGA GGACAACGCCCTTCTCAAGGCCCTGGGCTACGGCAAGGACAACGCCGAG GCCGCCACCCCTGATGGAGATGAAGGCCCTACCAAGCCATCTCCCGGGCCC TGGAGAAAGGAGGGCCCTGAAGGACAAAGAAAGTCCCCCCTGAACCTGTCCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 0 6】

CGAGCTGCAGGACGAGATCGGCAACCGCCTTCTCCCTGTTCAAGACCGAC GAGGACATCACCGGCCGGCTGAAGGACCGGATCCAGCCCGAGATCCTGG AGGCCCTGCTGAAGCAATCTCCTTCGACAAAGTTGTCAGATCTCCCT GAAGGCCCTGCGGGGATCGTGCCCTGATGGAGCAGGCCAAGCGGTAC GACGAGGCCCTGCCCGGAGATCTACGGCGACCACTACGGCAAGAAGACA CCGAGGAGAAAGATCTACCTGCCCGCCCATCCCCGGCAGAGATCCGGAA CCCCGTGGTGTGCGGGCCCTGTCCCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGC GTGGTGCGGGGTACGGCTCCCCCGCCCGGATCCACATCGAGACCGCCC GGGAGGTGGCAAGTCTTCAAGACCGGAAGGAGATCGAGAAAGCGCA GGAGGAAACCGGAAGACCGGGAGAAAGCCCGCCCAAGTTCCGGGAG TACTTCCCCAACTTCGTGGCGGAGCCCAAGTCCAAGGACATCCTGAAGC TGGGCTGTACGAGCAGCAGCAGCAGGCAAGTGCTGTACTCCGGCAGGA GATCAACCTGGGCCGGCTGAACGAGAAAGGCTACGTGGAGATCGACCCAC GCCCTGCCCTTCTCCCGGACCTGGGACGACTCCTTCAACAACAAGGTGC TGGTGTGGGCTCCGAGAACAGAACAGGGCAACAGACCCCTACGA GTACTTCAACGGCAAGGACAACTCCCGGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCC CGGGTGGAGACCTCCCGGTTCCCGCGGTCCAAAGACAGCGGATCCTGC TGCAGAAAGTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGCGGAACCTGAACGACAC CCGGTACGTGAACCGGTTCTGTGCCAGTTCTGTGCCGACCGGATGCGG CTGACCGGCAGGGCAAGAAAGCGGGTGTTCGCCCTCCAACGGCCAGATCA CCAACCTGCTGCGGGGCTTCTGCGGCCCTGCGGAAGGTGCGGGCCGAGAA CGACCCGCACCAACGCCCTGGACGCCGTGGTGGTGGCTGCTCCACCGTG GCCATGCAGCAGAAAGATCACCCCGGTTCTGTGCGGTACAAGGAGATGAACG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 0 7】

	CCTTCGACGGCAAGACCATCGACAAAGGAGACCGGCGAGGTGCTGCACCA GAAGACCCACTTCCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCAGGAGGTGATG ATCCGGGTGTTCCGCCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGTTCGAGGAGGCCG ACACCCCTGGAGAGCTGCGGACCCCTGCTGGCCGAGAGCTGTCCTCCCG GCCGAGGCCGTGACGAGTACGTGACCCCTGTTCTGTTCCCGGGCC CCCAACCGGAAGATGTCCGGCCAGGCCACATGGAGACCGTGAACTCCG CCAAGCGGCTGGACGAGGGCGTGTCCGTGCTGCGGGTGCCCTGACCCA GCTGAAGCTGAAGGACCTGGAGAGATGGTGAAACCGGGAGCGGAGCCC AAGCTGTACGAGGCCCTGAAAGGCCCGGCTGGAGGCCCCACAAAGGAGACC CCGCCAAGGCCCTTCGCCGAGCCCTTCTACAAGTACGACAAAGGCCGGCAA CCGGACCCAGCAGGTGAAGGCCGTGCCGGTGGAGCAGGTGCAGAGACC GGCGTGTGGGTGCGGAACCAACGGCATCGCCGACAAAGCCACCATGG TGCGGGTGGACGTGTTGAGAGAGGGCGACAAAGTACTACTGTGTCCTAT CTACTCCTGGCAGGTGGCCAAAGGGCATCCTGCCCGACCGGGCCGTGGTG CAGGGCAAGGACGAGGAGGACTGGCAGCTGATCGACGACTCCTTCAACT TCAAGTTCTCCCTGCACCCCAACGACCTGGTGGAGGTGATCACCAAGAA GGCCCGGATGTTCCGGCTACTTCGCCCTCCTGCAACCGGGGCAACGGCAAC ATCAACATCCGGATCCACGACCTGGACCAACAAAGATCGGCAAGAAAGGCA TCCCTGGAGGGCATCGGGCGTGAAAGACCGCCCTGTCTTCCAGAAAGTACCA GATCGACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCGGGCTGAAGAAAGCGG CCCCCGTGGGTCCGGCAAGCGGACCGCCGACCGCTCCGAGTTCCGAGT CCCCCAAGAAAGCGGAAGGTGGAGTGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 0 8】

開始および終止 コドンを含む る、表 4 の低 A ／U コドンを使 用した Nme C a s 9 O R F	ATGGCCGCCCTTCAAGCCCCAACAGCATCAACTACATCCTGGGCCCTGGACA TCGGCATCGCCAGCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGATCGACGAGGAGGA GAACCCCATCCGGCTGATCGACCTGGGCGTGGGGTGTTCGAGCGGGCC GAGGTGCCCAAAGACCGGCGACAGCCTGGCCATGGCCCCGGCGCTGGCCC GGAGCGTGGCGCGGCTGACCCGGCGGGGGCCACCGGCTGCTGGGAC CCGGCGGCTGCTGAAGCGGAGGGCGTGTGACGGCCGCCAACTTCGAC GAGAACGGCCCTGATCAAGAGCTGCCCAACACCCCTGGCAGCTGGGG CCGGCGCCCTGGACCGAAGCTGACCCCTGGAGTGGAGCGCCGTGCT GCTGCACCTGATCAAGCACCGGGGCTACCTGAGCCAGCGGAAGAACGAG GGGAGACCGCCGACAGGAGCTGGGCGCCCTGCTGAAGGCGCTGGCCG GCAACGCCACGCCCTGCAGACCGGGGACTTCGGGACCCCGCGGAGCT GGCCCTGAACAAAGTTTCGAGAAAGGAGCGGCCACATCCGGAAACAGCGG AGCGACTACAGCCACACCTTCAGCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGA TCCTGCTGTTGGAGAAAGCAGAGGAGTTGCGCAACCCCACTGAGCGG CGCCCTGAAGGAGGGCATCGAGACCTGCTGTATGACCCAGCGGCCGCC CTGAGCGGGACGCCGTGAGAAAGATGCTGGGCCACTGCACCTTCGAGC CCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCGCCGAGCGGTTTCAT CTGGCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGGCAGCGAG CGGCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCTGTATGGACGAGCCCTACC GGAAGAGCAAGCTGACCTACGCCCAGGCCCGGAAGCTGCTGGGCCCTGGA GGACACCGCCCTTCTTCAAGGCCCTGGCGTACGGCAAGGACACGCCGAG GCCAGCACCCCTGATGGAGATGAAGGCCCTACCAAGCCATCAGCCGGGCC TGGAGAAAGGAGGGCCCTGAAGGACAAAGAGAGCCCCCTGAACCTGAGCCC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 0 9】

CGAGCTGCAGGACGAGATCGGCACCGCCTTCAGCCTGTTCAAGACCGAC GAGGACATCACCGGCCGGCTGAAGGACCGGATCCAGCCCGAGATCCTGG AGGCCCTGCTGAAAGCACATCAGCTTCGACAAAGTTCTGTGCAGATCAGCCT GAAGGCCCTGCGGCCGATCGTGCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTAC GACGAGGCTCGGCCGAGATCTACGGGACCACTACGGCAAGAAACA CCGAGGAGAAGATCTACCTGCCCCCATCCCCCGGACGAGATCCGGAA CCCCGTGCTGCGGCCCTGAGCCAGGCCCGGAAGTGATCAACGGC GTGGTGCGGGGTACGGCAGCCCCGCCGGATCCACATCGAGACCGCCC GGGAGGTGGGCAAGAGCTCAAGGACCGGAAGGAGATCGAGAAGCGGCA GGAGGAGAACCGGAAGGACCGGAGAGGCCCGCCCAAGTTCCGGGAG TACTTCCCCAATTCGTGGCGAGCCCAAGAGCAAGGACATCCTGAAGC TGCGGCTGTACGAGCAGCAGCACGGCAAGTGCTGTACAGCGGCAAGGA GATCAACCTGGGCCGGCTGAACGAGAAAGGCTACGTGGAGATCGACCA GCCGTGCCCTTCAGCCGGACCTGGGACGACAGCTTCAACAAACAGGTGC TGGTGCTGGGCAGCGAGAACAGAACAAAGGCAACAGACCCCTACGA GTACTTCAACGGCAAGGACAAACAGCCGGAGTGGCAGGATTCAAAGGCC CGGGTGGAGACCAGCCGGTTCCCCCGGAGCAAGAACGCGGATCCTGC TGCAGAAAGTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGCGGAACCTGAACGACAC CCGGTACGTGAACCGGTTCTGTGCCAGTTCTGTGGCCGACCGGATGCGG CTGACCGGCAAAGGCAAAGAGCGGGTGTTCGCCAGCAACGGCCAGATCA CCAACTGCTGCGGGGCTTCTGGGGCTTGGGAAGGTGCGGGCCGAGAA CGACCGGCACCAAGCCCTGGACGCCCTGCTGGTGGCTTCAGCACCCGTG GCCATGCAGCAGAAAGATCACCCGGTTCTGTGGGTACAAGGAGATGAACG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 1 0】

CCTTCGACGGCAAGACCATCGACAAAGGAGACCGGGCAGGTTGCTGCACCA GAAGACCCACTTCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCAGGAGGTGATG ATCCGGGTGTTCCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGTTTCGAGGAGGCCG ACACCCCTGGAGAAAGCTGCGGACCCCTGCTGGCCGAGAAAGCTGAGCAGCCG GCCCCAGGCCCTGCACGAGTACGTGACCCCCCTGTTCTGTGAGCCGGCCC CCCAACCGGAAGATGAGCGGCCAGGCCACATGGAGACCGTGAAGAGCG CCAAAGCGCTGGACGAGGGCGTGAGCGTGCTGCGGGTGCCTGACCCCA GCTGAAGCTGAAGGACCTGGAGAAAGATGGTGAACCGGAGCGGGAGCCC AAGCTGTACGAGGCCCTGAAGGCCCGGCTGGAGGCCACAAAGGACGACC CGGCCAAGGCCCTTCGCCGAGCCCTTCTACAAATACGACAAGGCCGCCAA CGGACCCAGCAGGTGAAGGCCGTGCGGGTGGAGCAGGTGCAGAAAGACC GGCGTGTGGTGGGAAACCAACGGCATCGCCGACAAACGCCACCATGG TGCGGGTGGACGTGTTCCGAGAAAGGCGACAAAGTACTACCTGGTGCCCAT CTACAGCTGGCAGGTGGCCAAAGGCATCCTGCCCGACCGGGCCGTGGTG CAGGGCAAGACGAGGAGGACTGGCAGCTGATCGACGACAGCTTCAACT TCAAGTTCAGCCTGCACCCCAACGACCTGGTGGAGGTGATCAACCAAGAA GGCCCGGATGTTCCGGCTACTTCGCCAGCTGCCACCGGGGCACCGGCCAAC ATCAACATCCGGATCCACGACCTGGACCAACAAGATCGGCAAAGAACGGCA TCCTGGAGGGCATCGGGCGTGAAGACCGCCCTGAGCTTCCAGAAGTACCA GATCGACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCCGGCTGAAGAAAGCGG CCCCCGTCCGAGCGGCAAGCGGACCGCCGACCGGACCGGAGTTCCGAGA GCCCCAAGAAAGCGGAAGGTGGAGTGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 1 1】

開始コドンおよび終止コドンを示す、NLS 1 を示す Ca s のオーブンリーディングフレーム	ΔTGGACAAAGAAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAAACAAACAGCGTCG GATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAAGTCCCGAGCAAGAAAGTTCAA GGTCCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGA GCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAGACTGAAGA GAACAGCAAGAAAGATACACAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCT GCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAGGTGACGACAGCTTCTTC CACAGACTGGAAGAAAGCTTCCCTGGTCGAAGAAAGACAAAGACGAAA GACACCCGATCTTCGGAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAA GTACCCGACAATCTACCACTTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGAC AAGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCTGTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGGA CGTCGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAAGCTGTC GAAGAAACCCGATCAAGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGA GGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCT GCCGGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGC CTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACG CAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACACACCT GCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGACAGACCTGTTCTGGCAGCAAG AACCTGAGCGACCGAATCTCTGCTGAGCGACATCTCTGAGAGTCAAACACAG AAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGA ACACCACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTG CCGGAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGCAAGAACGGATACG CAGGATACATCGACCGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATCTACAAAGTTCAAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 1 2】

CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAG CTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAA GCATCCCGCACAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCCAATCCTGAGAGAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCCTGAAAGACACAGAGAAAGATCGAA AAGATCCTGACATTAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTCCGATGGATGACAAGAAAAGAGCCGAAGAAACAAATCAC ACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGGCCACAGAGC TTCATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACCTGCCGACCGAAAGG TCCGTCCGAAAGCACAGCCTGCTGTACGAATATCTTACAGTCTACAAAGA ACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGAGAAAAGCCGGCAATC CTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGCAAATCGTCGACCTGCTTCAAGACAA ACAGAAAAGGTCAAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGAT CGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAC GCAAGCCTGGGAAACATACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAG ACTTCCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCCT GACACTGACACTGTTCCAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAGACTGAAG ACATACGCACACCTGTTGACCGACAAAGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA GAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACCGGAAT CAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGAC GGATTCCGCAAAACAGAAACTTCAATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCCTGA CATTCAAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAG CCTGCACGAAACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACCTGGTCAAGGTCAATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 1 3】

GAAAGACAAAGCCGGAAAAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAAAGGACACAGAAAGAAACAGCAAGAGAAAGAAATGAAAGAGAAATC GAAAGAAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGG TCGAAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGAGAGAGACA'TGTACGTCGACCCAGGAACTGGACATCAACAGACTG AGCGACTACGACGTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACG ACAGCATCGACAAACAAAGGTCCCTGACAAAGAAAGCGACAAAGACAGAGGAAA GAGCGACAAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCTCAAGAAAGTGAAGAACTAC TGGAGACAGCTGCTGAACGCAAGCTGATCAACACAGAGAAAGTTCCGACA ACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGG ATTCAATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCAACAAAGCACGTC GCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAAACGACA AGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAG CGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTCAGAGAAATCAACAAAC TACCACCAAGCACAGACGCAATACCTGAACCGCAGTCGTCGGAAACAGCAC TGATCAAGAAAGTACCCGAAAGCTGGAAAGCGAAATTCGTCTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAAGACAGAAATCACACTGGCAACCGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCT GATCGAAACCAACCGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACCAAGGGAAAG GACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGTAGCATGCCGACGTCACACATCG TCAAGAAACAGAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCT GCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 1 4】

	CCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCCGACAGTCCGATACAGCGTCC TGGTCGTGCAAAAGGTGGAANAAGGGAAGAGCAAGAAAGCTGAAAGCGGT CAAGGAACCTGCTGGGAATCAAAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAAAG AACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAAGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAACCTGGAAAAACGG AAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAA CTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAAACTTCCCTGTACCTGGCAAGCCACT ACGAAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAAGAACAGAAAGCAGCTGTT CGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAAACAGATCAGC GAATTCAAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGGCAAACCTGGACAAAGGTCC TGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGA AAACATCATCCACCCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCA TTCAAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAA AGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTA CGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC CTGGCAGCAAGAGAAAGCAGAAACAACATAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 1 5】

開始コドンおよび終止コドンを示す、NLS 2 を右ずらす Cas 9 のオーバーブリーディングフレーム	ATGGACAAAGAAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAAACAAACAGCGTCG GATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAAGTTCAA GGTCCTGGGAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGA GCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAACAGCAGAGAGAACAGACTGAAGA GAACAGCAAGAAAGAAATACACAAAGAAAGAAAGAAATCTGCTACCT GCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAGGTGACGACAGCTTCTTC CACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGTCGAAGAAGACAAAGAACGAGAAA GACACCCGATCTTCGGAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCAAGAAAA GTACCCGACAAATCTACCACTTGAGAAAGAGCTGGTCGACAGCAAGAGC AAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGA CGTCGACAAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAAGCTGTC GAAGAAACCCGATCAACGCAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGA GCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGCTGGAAACCTGATCGCAAGCT GCCGGGAGAAAGAAAGAACCGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGC CTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGCG CAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCAAGCTGTTCTGGCAGCAAG AACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAG AAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGA ACACCAACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGTCAGACAGCACTG CCGGAAGTACAAAGAAATCTTCTCGACCAAGCAAGAAAGGATACG CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATCTACAAAGTTCAT

10

20

30

40

50

CAAGCCGATCCTGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAG	CTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACATTTCGACAAACGGAA	GCATCCCGCACAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCCAATCCTGAGAAAG	ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCCTGAAAGGACACAGAGAAAAGATCGAA	AAGATCCTGACATTTCAGAAATCCCGTTACTACGTCCGACCCCTGGCAAAGAG	GAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAACAAATCAC	ACCGTGGAACTTCGAAAGAAAGTCGTGCACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGC	TTTCATCGAAAAGAAATGACAAAACCTTCGACAAAGAACCTGCCGAAACGAAAAGG	TCCCTGCCGAAGCACAGCCCTGCTGTACGGAATACCTTCACAGTCTACAAACGA	ACTGACAAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAAGGAAATGAGAAAAGCCGGCAATTC	CTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAA	ACAGAAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGAT	CGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAC	GCAAGCCCTGGGAACATACCAAGACCTGCTGAAAGATCATCAAGGACAAAGG	ACTTCCTGGACAAACGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCT	GACACTGACACTGTTCCGAAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAGACACTGAAG	ACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGGTCAATGAAAGCAGCTGAAAGAGAA	GAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACCGGAAT	CAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAAGAGCGAC	GGATTTCGCAAAACAGAAAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCCTGA	CATTCAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAG	CCTGCACGAAACACATCCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAG	GGAAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGCTCATGG

50

【表 4 3 - 3 1 7】

	G A A G A C A C A A G C C G G A A A A C A T C G T C A T C G A A A T G G C A A G A G A A A C C C A G A C A A C A C A G A A G G G A C A G A A G A A C A G C A G A G A A A G A A T G A A G A G A A T C G A A G A A G G A A T C A A G G A A C T G G G A A G C C A G A T C C T G A A G G A A C A C C C G G T C G A A A A C A C A C A G C T G C A G A A C G A A A A G C T G T A C C T G T A C T A C C T G C A G A C G G A A G A G A C A T G T A C G T C G A C C A G G A A C T G G A C A T C A C A G A C T G A C C G A C T A G G A C G T C G A C C A C A T C G T C C C G C A G A G C T T C C T G A A G G A C G A C A G C A T C G A C A A C A A G G T C C T G A C A A G A A G C G A C A A G A A C A G A G G A A A G A G C G A C A A C G T C C C G A G C G A A G A A G T C G T C A A G A A G A T G A A G A A C T A C T G G A G A C A G C T G C T G A A C G C A A A G C T G A T C A C A C A G A G A A A G T T C G A C A A C C T G A C A A A G G C A G A G A G A G G A C T G A G C G A A C T G G A C A A G G C A G G A T T C A T C A A G A G A C A G C T G G T C G A A A C A A G A C A G A T C A C A A A G C A C G T C G C A C A G A T C C T G G A C A G C A G A A T G A A C A C A A A G T A C G A C G A A A A C G A C A A G C T G A T C A G A G A A G T C A A G G T C A T C A C A C T G A A G A G C A A G C T G G T C A G C G A C T T C A G A A A G G A C T T C C A G T T C T A C A A G G T C A G A G A A A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C A C A C G A C G C A T A C C T G A A C G C A G T C G T C G G A A C A G C A C T G A T C A A G A A G T A C C C G A A G C T G G A A A G C G A A T T C G T C T A C G G A G A C T A C A A G G T C T A C G A C G T C A G A A A G A T G A T C G C A A A G A G C C G A A C A G G A A A T C G G A A A G G C A A C A G C A A A G T A C T T C T T C A C A G C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C A G A A A T C A C A C T G G C A A C C G G A G A A A T C A G A A A G A G A C C G C T G A T C G A A A C A A A C G G A G A A A C A G G A G A A A T C G T C T G G A C A A G G G A A G A G A C T T C G C A A C A G T C A G A A A G G T C C T G A G C A T G C C G C A G G T C A A C A T C G T C A A G A A G A C A G A A G T C C A G A C A G G A G G A T T C A G C A A G G A A A G C A T C C T G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A A G C T G A T C G C A A G A A A A G A A G G A C T G G G A C

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 1 8】

	CCGAAAGAAAGTACGGAGGAGATTTCGACACGCCCGACAGTCCGATACAGCGGTCC TGGTCGTCCGCAAAAGGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAGCTGAAAGAGCGT CAAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAAAG AACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAAAGGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAACCTGGAAAAACGG AAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAACCGAA CTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACT ACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAAACGAAACAGAAAGCAGCTGTT CGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGC GAATTCAGCAAGAGAGTCAATCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAGGTCC TGAGCGCATACAAACAAGCACAGACAGACAGCCGATCAGAGAACAGGCCAGA AAACATCATCCACCCTGTTCCACACTGACAAAACCTGGGAGCACCGGCAGCA TTCAAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAA AGGAAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGACTGTA CGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC CAGGCAGCAAGAGAACGAGAACACATAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 1 9】

開始コドンおよび終止コドンを示す、NLS 3 を有する Cas 9 のオープンリーディングフレーム	3 3 2	ATGGACAAGAAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCG GATGGGCAGTCAATCACAGACGAATACAAAGGTCCCGAGCAAGAAATTCAA GGTCTGTGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAACCTGATCGGA GCACCTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAGACTGAAGA GAACAGCAAGAAGAATACACAAGAAGAAGAACAGAAATCTGCTACCT GCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCCGACGACAGCTTCTTC CACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTCTGGTCGAAAGAAAGACAAAGAACGAA GACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAAGTCGCATACCAAGAAAA GTACCCGACAAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGAC AAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCAACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCCCTGATCCAGAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGGA CGTCGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTT GAAGAAAACCCGATCAACGCAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGA GGCAAGACTGAGCAAGCAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCT GCCGGAGAAAAGAAACGGAATGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGC CTGGGACTGACACCCGAATTCAGAGACAACTTCGACCTGGCAGAAAGACG CAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAG AACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCACACAG AAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGA ACACCAACCAAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTG CCGGAAAAAGTACAAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGCAAGAACGGATACG CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATCTACAAGTTCAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 2 0】

CAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGGAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAG CTGAACAGAGAAAGACCTGTGTGAGAAAGCAGAGAAACATTTCGACAAACGGAA GCATCCCGCACACAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATTCTTGAGAAAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAAACAGAGAAAGATCGAA AAGATCCTGACATTAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTCCCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAATCAC ACCGTGGAACTTCGAAAGAAAGTCGTGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGC TTCATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACTGCCGAAACGAAAGG TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCACAGTCTACAAAGCA ACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAAATGAGAAAGCCGGCAATC CTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAA ACAGAAAGGTACACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGAT CGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAC GCAAGCCTGGGAACATACACGACCTGCTGGAAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCCTGGACAAACGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTT GACACTGACACTGTTCCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAG ACATACGACACACCTGTTCCGACGACAAAGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA GAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGGAAT CAGAGACAAAGCAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCTGAAAGCGGAC GGATTCCGCAAAACAGAAACTTTCATGCAAGCTGATCCACGACGACAGCCTGA CATTCAAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAG CCTGCACGAAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAGGTCAATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 2 1】

	G A A G A C A C A A A G C C G G A A A A A C A T C G T C A T C G A A A T G G C A A G A G A A A A C C C A G A C A A C A C A G A A G G G A C A G A A G A A C A G C A G A G A A A A G A A T G A A G A G A A T C G A A G A A G G A A T C A A G G A A C T G G G A A G C C A G A T C C T G A A G G A A C A C C C G G T C G A A A A C A C A C A G C T G C A G A A C G A A A A G C T G T A C C T G T A C C T G C A G A A C G G A A G A G A C A T G T A C C T C G A C C A G G A A C T G A C A T C A A C A G A C T G A G C G A C T A C G A C G T C G A C C A C A T C G T C C C G C A G A C T T C C T G A A G G A C G A C A G C A T C G A C A A C A A G G T C C T G A C A A A G C G A C A A G A A C A G A G A A A G A G C G A C A A C G T C C C G A G C G A A G A A G T C G T C A A G A A G A T G A A G A A C T A C T G G A G A C A G C T G C T G A A C G C A A A G C T G A T C A C A C A G A A A G T T C G A C A A C C T G A C A A A G G C A G A G A G A G A G A C T G A C G A A C T G G A C A A G G C A G G A T T C A T C A A G A G A C A G C T G G T C G A A A C A A G A C A G A T C A C A A A G C A C G T C G C A C A G A T C C T G G A C A G C A G A A T G A A C A C A A A G T A C G A C G A A A A C G A C A A G C T G A T C A G A G A A G T C A A G G T C A T C A C A C T G A A G A G C A A G C T G G T C A G C G A C T T C A G A A A G G A C T T C C A G T T C T A C A A G G T C A G A A A A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C A C A C G A C G C A T A C C T G A A C C G A G T C G T C G G A A C A G C A C T G A T C A A G A A G T A C C C G A A G C T G G A A A G C G A A T T C G T C T A C G G A G A C T A C A A G G T C T A C G A C G T C A G A A A G A T G A T C G C A A A G A G C G A A C A G G A A A T C G G A A G G C A A C A G C A A A G T A C T T C T T A C A G C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C A G A A A T C A C A C T G G C A A A C G G A G A A A T C A G A A A G A G A C C G C T G A T C G A A A C A A A C G G A G A A A C A G G A G A A A T C G T C T G G G A C A A G G G A A G A G A C T T C G C A A C A G T C A G A A A G G T C C T G A G C A T C C C G C A G G T C A A C A T C G T C A A G A G A C A G A A G T C C A G A C A G G A G G A T T C A G C A A G G A A A G C A T C C T G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C T G A T C G C A A A G A A A G A A G G A C T G G G A C

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 2 2】

	CCGAAAGAGTACGGAGGATTCGACACGCCCGACAGTCCGATACAGCGTCC TGGTCGTCGCAAGGTCGAAAAGGAAAAGAGCAAGAGCTGAAGAGCGT CAAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAGAAAGCAGCTTCGAAAAAG AACCCGATCGACTTCCTGGAGCAAGGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAAC TGGAAAAACGG AAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCCAGAAAGGGAACCGAA CTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACT ACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAAGAAACAGAAAGCAGCTGTT CGTCGAACAGCACAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGC GAA TTCAGCAAGAGAGTCAATCCTGGCAGACGCCAAACCTGGACAAAGTCC TGAGCGGCATACAAACAAGCACAGAGACAAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGA AAACATCATCCACCCTGTTCAACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCA TTCAAAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAA AGGAAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGACTGTA CGAAACCAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAGC CCGGCACCCGGCAAGAGAGAAAGAACACATAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 2 3】

開始コドンおよび終止コドンを含む、NLS 4 を右ずらす Cas 9 のオープンリーディングフレーム	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAACAACAGCGTCG GATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAAGGTCCCAGCAAGAAGTTCAA GGTCCTGGGAACAACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACTGATCGGA GCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAACAAAGACTGAAGA GAAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAGAAACAGAAATCTGCTACCT GCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATCGCAAGGTCGACGACAGCTTCTTC CACAGACTGGAAGAAGCTTCTGTGTCGAAGAAGACAAGAACGACGAAA GACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGGAAGTCGCATACCAAGAAA GTACCCGACAAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCAAGAC AAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCTGTATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACACCGA CGTCGACAAAGCTGTCTATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTT GAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGA GCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCAACAGCT GCCGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGC CTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGCG CAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGACAGACCTGTTCTGGCAGCAAG AACCTGAGCGACGCATCTCTGCTGAGCGACATCTCTGAGATCAACACAG AAATCACAAAGGCAACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGA ACACCAACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTG CCGGAAAAGTACAAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGCAAGAACGGATACG CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATCTACAAAGTTCAT
	3 3 3

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 2 4】

CAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAG CTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAA GCATCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCCAATCCTGAGAAAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAA AAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACCTGGACCCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGAGCGGAAGAAACAAATCAC ACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAAGGGAGCAAGCGCACAGAGC TTCATCGAAAAGAATGACAAAATTCGACAAAGAACCTGCCGAAACGAAAAGG TCCGTGCCGAAGCAGCCCTGCTGTACGAAATACCTTACAGTCTACAAACGA ACTGACAAAAGGTCAAGTAGGTACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTC CTGAGCCGAGAACAGAAAGAAAGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAA ACAGAAAGGTCAACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGAT CGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAAAC GCAAAGCCTGGGAAATATACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCCTGGACAAACGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAGACATCGTCT GACACTGACACTGTTCCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAG ACATACGCACACCTGTTGACCGACAAAGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA GAAGATACACAGGATGGGGAAGACATGAGCAGAAAAGCTGATCAACGGAAAT CAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGAACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGAC GGATTCCGAAACAGAAAATTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGA CATTCAGGAAGACATCCAGAAAGCACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAG CCTGCACGAAACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAGGTCAATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 2 5】

GAA GACA CAA GCG GAAA AAC ATCG TCA TCG AAA TGG CAA AGA GAAA ACC CA GACA AAC ACA GAA GGG ACA GAA GAA CAG CAG AAG AAA GAA TGA AGA GAA TC GAA GAA GGA ATCA AGGA ACTGG GAAG CCA GATCCT GAA GGA AAC ACC CGG TCG AAA AAC CACA GCTG CAGA CCG AAA AGCTGT ACCT GTACT ACC TGC A GAA CGG AAG AGA GACA TGTAC GTCG ACCAG GAACTGG ACA TCAAC AGACTG AGCG ACTAC GACGT CGAC CACATCG TCCCG CAG ACTTCCT GAAG GACG ACAG CATCG ACAA CAA GGTCC TGA CAA GAA GCG ACA AAG AAC AGAG AAA GAG CGA CAA CGTCC CGAG CGAAGA GTCG TCAGA GAGTGA AGAAC TAC TGG AGA CAG CTGCTG AAA CGCAA AGCTGAT CACA CAG AAGTTCG ACA ACCTG ACAA AGG CAG AGA GAG GAG GACTG AGCG AAC TGG ACA AGG CAGG ATT CATCA AGAG ACAG CTGG TCG AAA CAA GACA GATCA CAA AGCA CGTC GCAC AGATCC TGG ACAG CAG AATGA CACA AAGTAC GACG AAAACG GACA AGCTGATC AGA GAA GTCAA AGTCA TCA CACTG AAA GAGCAA GCTGG TCA G CGACTTC AGAAA GGA CTCCAG TTCTACA AGTCA GAG AAA TCAAC AAC TACC ACCACG CACA GACG CATACCTGA ACCG CAGTCGTC GGAACAGCAC TGATCAA GAA GTACCCG AAGCTGG AAAAGCGA ATTGCTC TACGGAGACTA CAA GGTCTAC GACGTCAG AAAAGATGATCG CAAAAGAGCG AAAACG GAAATC GGA AAGGCAA CAGCAA AGTACTTCTTCTACAGCAA CATCATGA ACTTCT TCAA GACAG AAA TCACACTGG CAAACGGAG AAA TCAGAAA GAGACCGCT GATCG AAA CAAACGGAG AAA CAGGAG AAA TCGTCTGGG ACAGGGAAGA GACTTCG CAA CAGTCAG AAAAGTCC TGA GCA TCGCG CAGGTCAACATCG TCAA GAA GACAG AAA GTCCAG ACAGGAGG ATT CAGCAA GGAAGCA TCCT GCCG AAGAG AAA CAGCG ACAAGCTGATCG CAAAGAAA GAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 2 6】

CCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCC TGGTCGTCGCATAAGTCCGAAAAGGGAAGAGCAAGAGCTGAAGAGCGT CAAGGAACCTGCTGGGAATCACCAATCATGGAAAAGAACGCTTCGAAAAG AACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAAGGATACAAAGAAAGTCAAGAAAG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAAC TGGAAAACGG AAGAAAGAGAA'TGCTGGCAAGCGCAGGAGAAC TGCAGAAAGGAAACGAA CTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAAGCCACT ACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGAAACAGAAAGCAGCTGTT CGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGC GAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAGGTCC TGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGA AAACATCATCCACCCTGTTCAACACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCAGCA TTCAAGTACTTCGACACACAACAAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAA AGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGACTGTA CGAAACAAGAA'TCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACCGAGGAGGAAGC CAGGCAGCAAAAGAGACCGAGAAACAACATAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 2 7】

開始コドンおよび終止コドンを含む、NLSを有する、NLSを有するCas 9のオープンリーディングフレーム	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAAACAAAACAGCGTCG GATGGGCAGTCAATCAGACGGAATACAAAGTCCCGAGCAAGAAATTCAA GGTCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAGAGAAACCTGATCGGA GCACCTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAACAAAGACTGAAGA GAACAGCAAGAAAGATACACAAAGAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCT GCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGTCCAGCAGAGCTTCTTC CACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTCTGTCGAAAGAAAGCAAGAAAGCAAGAAA GACACCCGATCTTCGGAAACATCTGTCGACGAAAGTCCGATACACGAAAA GTACCCGACAAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCAAGAGC AAGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAAGCGA CGTCGACAAAGCTGTTCTATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTTTC GAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGA GCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAAACCTGATCGCACAGCT GCCGGAGAAAGAAAGAAACGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGC CTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGCG CAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTCT GCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAAAG AACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAG AAATCACAAAGGACCCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGA ACACCAACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTG CCGGAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGCAAGAAACGGATACG CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTTCTACAAATTCTAT
	3 3 4

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 2 8】

CAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAG CTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAA GCATCCCGCACAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCCAATCCTGAGAGAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAAGACAAACAGAAAGATTCGAA AAGATCCTGACATTAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTCCGCATGGATGACAAGAAAGAGCCGAAGAAACAAATCAC ACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGC TTCATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACCTGCCGAAACGAAAGG TCTGCCGAAGCACAGCCCTGCTGTACGAATACTTACAGTCTACAAAGCA ACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAAGAAATGAGAAAGCCGGCAATC CTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGCAAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAA ACAGAAAGGTCAACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGAT CGAATGCTTCGACACAGCTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAAC GCAAGCCTGGGAACATACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCCTGGACAAACGAACAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCT GACACTGACACTGTTCCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAG ACATACGCACACCTGTTCCGACGACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA GAAGATACACAGGATGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGGAAT CAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGAC GGATTGCCAAACAGAAACTTCATGCAAGCTGATCCACGACGACAGCCCTGA CATTCAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAAGCGGACAGGAGACAG CCTGCACGAAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAGGTCAATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 2 9】

GAAGACACAAAGCCGGAAAAACATCGTTCATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAAGAGAAATC GAAAGAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGG TCGAAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGAAGAGACA TGTACGTCGACCCAGGAACTGGACATCAACAGACTG AGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACG ACAGCATCGAACAAACAAAGTCCCTGACAAAGAAAGCGACAAAGAACAGGAAA GAGCGAACACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCGTCAAGAAAGTGAAGAACTAC TGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACA ACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAAGGCAGG ATTCAATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCACAAAGCACGTC GCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAAACGACA AGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAG CGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTCAGAGAAATCAACAAAC TACCACCAAGCACAGACGCATACCTGAACCGCAGTCGTCGGAAACAGCAC TGATCAAGAAAGTACCCGAAAGCTGGAAAGCGAAATTCGTCTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAAGACAGAAATCACTGGCAACCGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCT GATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAG GACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGTAGCATGCCGCAGGTCAACATCG TCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGCAAGGAAAGCATCCT GCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 3 0】

	CCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCC TGGTCGTCGC AAAAGGTCCG AAAAAGG AAAAGAGC AAAGAGCTGAAAGAGCGT CAAAGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAGAAAGCAGCTTCGAAAAG AACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAAAGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAAC TGG AAAACGG AAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCCAGAAAGGCAAAACGAA CTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACT ACGAAAAGCTGAAGGAAGCCCGGAAGACAAACGAAACAGAAAGCAGCTGTT CGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGC GAATTGAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCCAAACCTGGACAAAGTCC TGAGCGCATACAACAAGCACAGACAGAAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGA AAACATCATCCACCCTGTTCAACACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCAGCA TTC AAGTACTCGACACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAA AGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGACTGTA CGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACCGAGGAGGAAGC AGAGCAGCAAAAGAGACCGAGAACAAACATAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 3 1】

開始コドンおよび終止コドンを示す、NLS 6を有するCas 9のオーバーンリーディングフレーム	33	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAACAAGCGTCG
	5	GATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAA
		GGTCCTGGGAACAACAGACACAGACACAGCATCAAGAAGAACCCTGATCGGA
		GCACCTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGA
		GAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAGAAACAGAACTCTGCTACCT
		GCAGGAATCTTCAGCAACGAATGGCAAGGTCGACGACAGCTCTTTC
		CACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTCTGTCGAAAGAAAGCAAGAAAGCAAGAAA
		GACACCCGATCTTCGGAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAA
		GTACCCGACAACTACCACCTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGAC
		AAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACCTGGCACACATGATCAAGT
		TCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGA
		CGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTC
		GAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGA
		GCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACTGATCGCACAGCT
		GCCGGAGAAAAGAAAGAACGGACTGTTGGAAACCTGATCGCACTGAGC
		CTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACG
		CAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACT
		GCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAG
		AACCTGAGCGACGCAATCTCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAG
		AAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGA
		ACACCAACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTG
		CCGGAAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGCAAGAACGGATACG
		CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATCTACAAGTTCAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 3 2】

CAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAG CTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAA GCATCCCGCACAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCCAATCCTGAGAAAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGGAAGGACAAACAGAGAAAGATCGAA AAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCAC ACCGTGGAACCTCGAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGC TTCATCGAAAGAAATGACAAAATTCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAAGG TCCGTGCCGAAGCAGCCCTGCTGTACGAAATACCTTACAGTCTACAAACGA ACTGACAAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTC CTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAA ACAGAAAGGTCAACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGAT CGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAAC GCAAAGCCTGGGAAATACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCCTGGACAAAGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCT GACACTGACACTGTTCCGAACACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAG ACATACGCACACCTGTTCCGACGACAAAGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA GAAAGTACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACCGGAAT CAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGAC GGATTTCGCAAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCCTGA CATTCAAAGGAAGACATCCAGAAAGCAGCAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAG CCTGCACGAAACACATCCGAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGACGAACTGGTCAAGGTCATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 3 3】

GAAGACACAAGCCGGAAAAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAGGGACAGAAAGAAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATC GAAGAAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCCG TCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACTCTGCA GAACGGAAGAGACATGTACCTCGACCAGGAACCTGGACATCAACAGACTG AGCGACTACGACGTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGGAAGGAGG ACAGCATCGACAAACAAAGTCTCTGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGGAAA GAGCGACAAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCTCAAGAAAGATGAAGAACTAC TGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACACAGAGAAAAGTTGACACA ACCTGACAAAAGGCAGAGAGAGAGGAGACTGAGCGAACCTGGACAAAGCAGG ATTCAATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCACAAAGCACGTC GCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACA AGCTGATCAGAGAAAGTCAAGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAG CGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTCAAGAGAAATCAACAAAC TACCAACACGACACGACGCTACCTGAACCGCAGTCCTCGGAACAGCAC TGATCAAGAAAGTACCCGAAAGCTGAAAAGCGAAATTCGTCTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAAGACAGAAATCACACTGGCAACCGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCT GATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTTGGACAAAGGAAAGA GACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTCTGAGCATGCCGACAGGTCAACATCG TCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCT GCCGAAGAGAAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 3 4】

	CCGAAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCCGATACAGCGTCC TGGTCGTCCGAAAAGGTCGAAAAGGAAAAGAGCAAGAGCTGAAAGAGCGT CAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAGCAGCTTCGAAAAAG AACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAACCTGGAAAACGG AAGAAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAACGAA CTGGCAC TGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACT ACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGAAACAGAAAGCAGCTGTT CGTCGAACAGCAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGC GAATTCAGCAAGAGAGTCACTCCTGGCAGACCGCAACCTGGACAAAGTCC TGAGCGCATACAAACAAGCAAGACAGACAAAGCCGATCAGAGAAACAGGCAGA AAACATCATCCACCCTGTTCACTACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCA TTCAAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACA AGGAAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGACTGTA CGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACCGAGGAGGAAGC GCAGCAGCAAGAAGAGAGCTGGAGCATGGCAGCATAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 3 5】

開始コドンおよび終止コドンを有する、NLS 7を有するCas 9のオーブンリーディングフレーム	ATGGACAAAGAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAAACAAAACAGCGTCG GATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCTCCGAGCAAGAGTTCAA GGTCTGGGAACACAGACAGACACAGCATCAGAGAACCTGATCGGA GCACTGCTGTTCGACACGGGAGAAACAGCAGAGAACAGACTGAAAG GAACAGCAAGAAAGATACACAAGAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCT GCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAGGTCGACGACAGCTTCTTC CACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGTGTCGAAGAGACAAAGAACGACGAAA GACACCGGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAGTGGCATACACGAA GTACCCGACAAATCTACCACTTGAGAAAGAGCTGGTCGACAGCAACAGAC AAGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCTGTATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACGGA CGTCGACAAAGCTGTTTATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTT GAAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCTGA GCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCT GCCGGCAGAAAGCAAGAACCGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGC CTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGCG CAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGTTCTGTCAGCAAAAG AACCTGAGCGACGCAATCTGCTGAGCGACATCTCTGAGAGTCAACACAG AAATCACAAAGGACCCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGA ACACACACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTG CCGGAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGATACG CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATCTACAAAGTTCAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 3 6】

CAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAG CTGAAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAA GCATCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCCAATCCTGAGAAAG ACAGGAAGAGCTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAA AAGATCCTGACATTACAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAG GAACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAAATCAC ACCGTGGAACTTCGAAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGC TTCATCGAAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACCTGCCGAAACGAAAAGG TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAAACGA ACTGACAAAGGTCAAGTACGTACACAGAGGAATGAGAAAGCCGGCATTTC CTGAGCGGAGAAACAGAAAGAGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAA ACAGAAAGGTCAACAGTCAAGCAGCTGAAAGAAAGACTACTTCAAGAAAGAT CGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAAC GCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCTGTGACAAACGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCCT GACACTGACACTGTTCCGAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAG ACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA GAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACCGGAAT CAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGAC GGATTGCAAAACAGAAACTTCATGCAAGCTGATCCACGACGACAGCCTGA CATTCAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAG CCTGCACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 3 7】

GAAGACACAAGCCGGAAAAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAAACAGCAGAGAAAGAAATGAAAGAGAAATC GAAAGAAAGAAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAAGAAACACCCGG TCGAAAAACACACAGCTGCAGAACCGAAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCCAGGAACTGGACATCAACAGACTG AGCGACTACGACCTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACG ACAGCATCGACAAACAAAGGTCTCTGACAAAGAAAGCGACAAAGAACAGAGGAAA GAGCGACAAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCTCAAGAAAGTGAAGAACTAC TGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACA ACCTGACAAAGGCAGAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAAGGCAGG ATTCAATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCACAAAGCACGTC GCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACACGACA AGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAG CGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAAAC TACCAACACGCACACGACGCAATACCTGAACGAGTCGTCGGAACAGCAC TGATCAAGAAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAAATTCGTCTACCGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAGGCCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCT GATCGAAACCAACCGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGGAAGA GACTTCGGCAACAGTCAGAAAGGTCTCTGAGCATGCCGACGTCACACATCG TCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGCAAGGAAAGCATCCT GCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 3 8】

	CGAAGAAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCCGACAGTTCGATACAGCGTCC TGGTCGTCGC AAAAGGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAGCTGAAAGAGCGT CAAGGAACCTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAAAG AACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAAAGGATACAAAGGAAAGTCAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTGGAAC'TGGAAAAACGG AAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCCAGGAGAACTGCAGAAAGCGAAACGAA CTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACT ACGAAAAGCTGAAGGAAAGCCCGGAAGACAAACGAAACAGAAAGCAGCTGTT CGTCGAAACAGCAACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAAACAGATCAGC GAATTCAGCAAGAGAGTCACTCCTGGCAGACCGCAAACTGGACAAGGTCC TGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGA AAACATCATCCACCCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCAACGGCAGCA TTCAAAGTACTTCGACACAAACAAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAA AGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTA CGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGGAAGC GCAGCAGCAAGAGAGTCTGGAGCATGGCA'TTCTAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 3 9】

開始コドンおよび終止コドンを含む、NLSを有する、NLS 8を有するCas 9のオープンリーディングフレーム	3 3
	7
ATGGACAAGAAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACACGCGTCG GATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAAGTTCAA GGTCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAGAGAAACCTGATCGGA GCACTGCTGTTCCACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAGACTGAAAG GAACAGCAAGAAAGATACACAAAGAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCT GCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTC CACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGCTCGAAGAAAGACAAAGAACGAAA GACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAAGTCGCATACCAAGAAA GTACCCGACAAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGAC AAGCAGACCTGAGACTGATCTACTCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCTGTGATCGAAGGAGACCTGAACCGGACAAACAGGA CGTCGACAAAGCTGTTCTATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTT GAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGA GCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCT GCCGGAGAAAGAAAGAACCGGACTGTCGGAAACCTGATCGCACAGC CTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGC CAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGTTCTGCGACGAAAG AACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAG AAATCACAAAGGACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGA ACACCAACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTG CCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGCAAGAACGGATACG CAGGATACATCGACCGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCACAAAGTTTCA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 4 0】

CAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAG CTGAAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAA GCAATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAA AAGATCCTGACATTACAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTCCGATGGAATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAAATCAC ACCGTGGAACTTCGAAAGAAAGTCGTGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGC TTCATCGAAAAGAAATGACAAAATCTCGACAAAGAACCTGCCGAAACGAAAAGG TCCTGCCGAAGCACAGCCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAAACGA ACTGACAAAGGTCAAGTAGGTCACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTTC CTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAA ACAGAAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAGGAAGAT CGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAC GCAAGCCCTGGAAACATACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAG ACTTCCTGGACAAAGAAAGAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTCT GACACTGACACTGTTCCGAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAG ACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA GAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACCGGAAT CAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGAC GGATTCCGAAACAGAACTTCTATGCAAGCTGATCCACGACGACAGCCTGA CATTCAAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAG CCTGCACGAAACACATCCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAGGTCAATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 4 1】

GAAAGACAAAGCCGGAAAAACATCGTTCATCGAAAAATGGCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAAACAGCAGAGAAAGAAATGAAAGAGAAATC GAAAGAAAGAAATCAAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAAACACCCGG TCGAAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGAAGAGACATGTACGTCCGACAGGAACTGGACATCAACAGACTG AGCGACTACGACCTCGACACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACG ACAGCATCGAACAAACAAAGGTCCCTGACAAAGAACGACAAACAGAGGAAA GAGCGAACACGTCCCGAGCGAAAGAAAGTCCGTCAAGAAAGATGAAGAACTAC TGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCGACA ACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGG ATTCAATCAAGAGACAGCTGGTCCGAAACAAAGACAGATCACAAAGCACCTC GCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACCGACA AGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAG CGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAAAC TACCACCAAGCACAGAGGCAATACCTGAACGCAAGTGGTCCGAAACAGCAC TGATCAAGAAAGTACCCGAAAGCTGGAAAGCGAAATTCGTCTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATC GGAAAGGCACAGCAAAAGTACTTCTCTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAAGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCCGT GATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGGAAGA GACTTCGGCAACAGTCAGAAAGGTCCCTGAGCATGCCCGCAGGTCAACATCG TCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCT GCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 4 2】

	CCGAAAGAAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCCGATACAGCGTCC TGGTCGTGCAAAAGGTCGAAAGGGAAAGAGCAAGAAAGCTGAAAGAGCGT CAAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAAAG AACCCGATCGACTTCC TGGAAAGCAAAAGGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTTCGAACCTGGAAACCGG AAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACCGAA CTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACT ACGAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAAACGAACAGAAAGCAGCTGTT CGTCGAACAGCAACAGCACTACCTGGACGAATCATCGAAACAGATCAGC GAATTCAGCAAGAGAGTCACTCCTGGCAGACGCCAAACCTGGACAAAGGTCC TGAGCGCATACAAACAAGCACAGACAGACAAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGA AAACATCATCCACCCTGTTCACTACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCA TTCAAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAA AGGAAGTCCCTGGACGCACCACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGACTGTA CGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC GCAGCAGCAAGAGAAAGCTGGAGGCATGGCATTCCTAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 4 3】

開始コードおよび終止コードを有する、NLS 9を有するCas 9のオープンリーディングフレーム	3 3
	8
ATGGACAAAGAAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACCAAAACAGCGTCG GATGGGCAGTCAATCACAGACGAATACAAAGGTCCCGAGCAAGAAAGTTCAA GGTCCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGA GCACCTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAGACTGAAGA GAACAGCAAGAAAGATACACAGAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCT GCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAGGTCCAGCAGACGCTTCTTC CACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGCTCGAAGAAAGACAAAGACGCAAAA GACACCCGATCTTCGGAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCAAGAAAA GTACCCGACAATCTACCACTGTAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCAAGAC AAGGACAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGA CGTCGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTT GAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGCAATCCTGA GGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCT GCCGGAGAAAGAAAGAAACGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGC CTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGC CAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAG AACCTGAGCGACGCAATCTCTGCTGAGCGACATCTCTGAGAGTCAACACAG AAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGA ACACCAACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTG CCGGAAGATACAAAGAAATCTTCTTCGACCAAGCAAGAACGGATACG CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTTCTACAAAGTTCTAT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 4 4】

CAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGGAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAG CTGAAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAA GCATCCCGCACAGATCCACCTGGGAGACTGCACGCCAATCCTGAGAAAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAAGGACACACAGAGAAAGATCGAA AAGATCCTGACATTGAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCCCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTCCGATGGATGACAAGAAAGAGCCGAAGAAACAAATCAC ACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCCACAGAGC TTCATCGAAAGAAATGACAACTTCGACAAAGAACCTGCCGAAAGAAAGG TCCGTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAAATACTTACAGTCTACAAACGA ACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTC CTGAGCCGAGAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTTCAAGACAA ACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGAT CGAATGCTTCGACACGCTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAC GCAAGCCTGGGAACATACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCTGGACAACGAAGAAACCAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCCT GACACTGACACTGTTCCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAG ACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA GAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACCGGAAT CAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCTGAAGAGCGAC GGATTCCGCAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCCTGA CATTCAAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTGAGCGGACAGGGAGACAG CCTGCACGAAACACATCCCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGACGAACTGGTCAAGGTCATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 4 5】

GAAGACACAAAGCCGGAAAAACATCGTTCATCGAAAAATGGCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAGAAAGAAATGAAAGAGAAATC GAAGAAAGGAATCAGAAAGAACTGGGAAGCCAGATCCCTGAAGGAACACCCCGG TCGAAAAACACACAGCTGCAGAAACGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACCGAAGAGAGACATGTACGTCCGACCCAGGAACCTGGACATCAACAGACTG AGCGACTACGACCTCGACCAACATCGTCCCCCAGAGCTTCCGTGAAGGACG ACAGCATCGACAAACAAAGTCCCTGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGGAAA GAGCGACAAACGTCCCCGAGCGAAAGTCTGTCAGAAAGATGAAAGAACTAC TGGAGACAGCTGCTGAACCGCAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTGGACA ACCTGACAAAGCCAGACAGAGAGGAGGACTGAGCCGAACCTGGACAAGGCAGG ATTCAATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCACAAAGCACCTC GCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAAACGACA AGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCTATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAG CGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTCAGAGAAATCAACAAAC TACCACCAAGCACACGACCCATACCTGAACGCACTCGTCCGAAACAGCAC TGATCAAGAAAGTACCCGAAAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAAACAGGAAATC GGAAGGCCAACAGCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCT TCAGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCT GATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAG GACTTCGCAACAGTCAGAAAGTCCCTGAGCATCCCGCAGGTCAACATCG TCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCT GCCGAAGAGAAACACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 4 6】

	CCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCC TGGTCGTCGCCAAAGGTGGAAGGGAAGAGCAAGAGCTGAAAGAGCGT CAAGGAACCTGCTGGGAATCACCAATCATGGAAAGAAAGCCTTCGAAAGG AACCCGATCGAATTCTCTGGAAGCAAGGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAAC'TGGAAAAACGG AAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAA CTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACT ACGAAAGCTGAAAGGAAAGCCCGAAGACAAAGAAACAGAAAGCAAGCTGTT CGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAAACAGATCAGC GAATTCAGCAAGAGAGTCA'TCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAGGTCC TGAGCGGATACAAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGA AAACATCATCCACCTGTTTCACTGACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCA TTCAAGTACTTCGACACAAACAAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAA AGGAAGTCCCTGGACGCACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTA CGAAACAAGAA'TCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC GCAGCAGCAAGAGAAAGTACTTCGCAGCATAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 4 7】

開始コドンおよび終止コドン有する、NLS 10を有するCus9のゾーンリーディングフレーム	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTCGGACATCGGAACAAACACGCGTCG GATGGGCAGTCA TCACAGACGAATACAAAGTCCCGAGCAAAGATTCAA GGTCCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAGAAAGAACCTGATCGGA GCACCTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAAGACTGAAGA GAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAATCTGCTACCT GCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTC CACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGCTCGAAGAAAGACAAAGAGCAACGAAA GACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAAGTCGCATACCAACGAAAA GTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGAC AAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGA CGTCGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTT GAAGAAACCCGATCAACGCAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGA GGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCT GCCGGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGC CTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACG CAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCCTGGCAGCAAG AACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAG AAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGA ACACCAACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTG CCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGACAGCAAGACGGATACG CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCACAAAGTTTCAT
	3 3 9

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 4 8】

CAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAG CTGAACAGAGAAAGACCTGTGTGAGAAAGCAGAGAAACATTCCGACAAACGGAA GCATCCCCGACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATTCTGTGAGAAAG ACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAAACAGAGAAAGATCGAA AAGATCCTGACATTGAGATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGAGCCGAGAAACAAATCAC ACCGTGGAACTTCGAAAGAGTCGTGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGC TTCATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACTGCCGAAACGAAAGG TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAAACGA ACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAAGGAAATGAGAAAGCCGGCAATC CTGAGCCGAGAACACAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAA ACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGAT CGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAC GCAAGCCTGGGAACATACACGACCTGCTGGAAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCTCTGGACAAACGAAAGAAACGAGAGCATCCTGGAAGACATCGTCTT GACACTGACACTGTTCCGAAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAG ACATACGCCACACCTGTTCCGACGACAAAGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA GAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGGAAT CAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCTGAAAGAGCGAC GGATTCCGCAAAACAGAAACTTCAATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGA CATTCAAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTACGCGGACAGGGAGACAG CCTGCACCGAAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAG GGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTGCTCGACGAACTGGTCAAGGTCAATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 4 9】

	G A A G A C A C A A G C C G G A A A A C A T C G T C A T C G A A A T G G C A A G A G A A A A C C A G A C A A C A C A G A A G G G A C A G A A A C A G A A C A G C A G A G A A A G A A T G A A G A G A A T C G A A G A A G G A A T C A A G G A A C T G G G A A G C C A G A T C C T G A A G G A A C A C C C G G T C G A A A C A C A C A G C T G C A G A A C G A A A G C T G T A C C T G T A C T A C C T G C A G A A C G G A A G A G A C A T G T A C G T C G A C C A G G A A C T G G A C A T C A A C A G A C T G A G C G A C T A C G A C C T C G A C C A C A T C G T C C C G C A G A C T T C C T G A A G G A C G A C A G C A T C G A C A A C A A G G T C C T G A C A A G A A G C G A C A A G A A C A G A G G A A A G A G G A C A A C G T C C C G A G C G A A G A A G T C G T C A A G A A G A T G A A G A A C T A C T G G A G A C A G C T G C T G A A C G C A A A G C T G A T C A C A C A G A A A G T T C G A C A A C C T G A C A A A G G C A G A G A G A G G A C T G A C G A A C T G G A C A A G G C A G G A T T C A T C A A G A G A C A G C T G G T C G A A A C A A G A C A G A T C A C A A G C A C G T C G C A C A G A T C C T G G A C A G C A G A A T G A A C A C A A A G T A C G A C G A A A A C G A C A A G C T G A T C A G A G A A G T C A A G G T C A T C A C A C T G A A G A G C A A G C T G G T C A G C G A C T T C A G A A A G G A C T T C C A G T T C T A C A A G G T C A G A A A A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C A C A C G A C G C A T A C C T G A A C G C A G T C G T C G G A A C A G C A C T C A T C A A G A A G T A C C C G A A G C T G A A A G C C A A T T C G T C T A C G G A G A C T A C A A G G T C T A C G A C G T C A G A A A G A T G A T C G C A A A G A G C G A A C A G G A A A T C G G A A G G C A A C A G C A A A G T A C T T C T T C A C A G C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C A G A A A T C A C A C T G G C A A A C G G A G A A A T C A G A A A G A G A C C G C T G A T C G A A A C A A A C G G A G A A A C A G G A G A A A T C G T C T G G G A C A A G G G A A G A G A C T T C G C A A C A G T C A G A A A G G T C C T G A G C A T G C C G C A G G T C A A C A T C G T C A A G A A G A C A G A A G T C C A G A C A G G A G G A T T C A G C A A G G A A A G C A T C C T G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C T G A T C G C A A G A A A G A A G G A C T G G G A C

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 5 0】

	CCGAAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCCGATACAGCGTCC TGGTCGTGGCAAAAGTCCGAAAAGGAAAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGT CAAGGAACCTGCTGGGAATCACAATCATGGAAGAAGAGCAGCTTCGAAAAG AACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAGGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCCGAAC TGGAAAAACGG AAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAA CTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACT ACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAAGCAAGAGAGCAGCTGTT CGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGC GAATTCAGCAAGAGAGTTCATCCTGGCAGACGCCAAACCTGGACAAGGTCC TGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGA AAACATCATCCACCCTGTTCACTACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCA TTCAACTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAA AGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTA CGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACCGAGGAGGAAGC AGACAGCAAAAGAGAAAGGCA'TTCGCAGCATAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 5 1】

開始コードおよび終止コードを示す、NLS 11を有するCas 9のオープンリーディングフレーム	ATGGACAAAGTAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAAACAACAAGCGTCG GATGGCAGTCATCACAGACGAATACAAAGGTCCCGAGCAAGAAAGTTCAA GGTCCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACTGATCGGA GCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGA GAACAGCAAGAAAGATACACAAGAAAGAAAGAAACAGAACTGTCTACCT GCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCCAGCAGACTTCTTC CACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGTGTCGAAAGAAAGCAAGAAAGCACGAAA GACACCCGATCTTCGGAACATCGTCGACGAAAGTCGCATACCAAGAAAA GTACCCGACAACTACCACTGAGAAAGAAAGTGGTCGACAGCACAGAC AAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT TCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGA CGTCGACAAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTT GAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGA GCGAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCT GCCGGAGAAAGAAAGAAACGGACTGTTGGAAACCTGATCGCACTGAGC CTGGGACTGACACCCGAACCTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACG CAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACT GCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGACAGACCTGTCTCTGGCAGCAAG AACCTGAGCGACGCAATCTCTGCTGAGCGACATCTCTGAGAGTCAACACAG AAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGA ACACCAACGAGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTG CCGGAAAAGTACAAAGGAAATCTCTCTCGACCAAGCAAGAACGGATACG CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATCTACAAAGTTCAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 5 2】

CAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAG CTGAAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAA GCATCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCCAATCCTGAGAAAG ACAGGAAGACCTTCTACCCGTTCCCTGAAAGAACAAAGAAAGATCGAA AAGATCCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTCCGATGATGACAAAGAAAGAGCCGAAACAAATCAC ACCGTGGAACCTTCGAAAGAGTGTGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGC TTCATCGAAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACCTGCCGAAACGAAAAGG TCCTGCCGAAGCACAGCCCTGCTGTACGAAATACCTTACAGTCTACAAACGA ACTGACAAAGGTCAAGTACCTCACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTC CTGAGCGGAGAACAGAAAGAACCAATCGTCGACCTGGCTGTTCAAGACAA ACAGAAAGGTCAACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGAT CGAATGCTTCGACAGCGTCGAAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAAC GCAAAGCCTGGGAACATACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGG ACTTCCTGGACAAACGAAAGAAACGAAACACATCCTGGAAGACATCGTCT GACACTGACACTGTTCCGAACACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAG ACATAAGCACACCTGTTCCGACGACAAAGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA GAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACCGGAAT CAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGAACATCCTGGACTTCCCTGAAGAGCGAC GGATTGCAAAACAGAAAACCTCATGCAAGCTGATCCACGACGACAGCCTGA CATTCAGGAAGACATCCAGAAAGGACACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAG CCTGCACGAAACACATCCGAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAG GGAAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGACGAACTGGTCAAGGTCATGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 5 3】

	GAAGACACAAGCCGGAAAAACATCGTCAATCGAAAATGGCAAGAGAAAAACCA GACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATC GAAGAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCCGG TCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGAAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACCTGGACATCAACAGACTG ACCGACTACGACCGTCGACCCACATCGTCCCCCAGAGCTTCCCTGAAGGACG ACAGCATCGACAAACAAGGTCCCTGACAAAGAAGCGACAAACAGAGGAAA GAGCGACAAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCGTCAAGAAAGATGAAGAACTAC TGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCGACA ACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAAGGCAGG ATTCA'TCAAGAGACAGCTGCTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTC GCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACA AGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCA'TCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAAG CGACTTCAGAAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGGTCAGAGAAATCAACAAAC TACCACCAAGCACACGACCGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAAACAGCAC TGATCAAGAAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTA CAAGGTCTACGACGTCAGAAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAAAACAGGAAATC GAAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAAC'TTCT TCAAGACAGAAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAAATCAGAAAAGAGACCGCT GATCGAAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGA GACTTCGCCAACAGT'CAGAAAGGTCCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCG TCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCT GCCGAAGAGAAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAAGAGACTGGGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 5 4】

	CCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCC TGGTCGTCGC AAAAGGTGGA AAAAGGGAAGAGCAAGAACTGAAAGCGGT CAAGGAAC TGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAAGAAAGCAGCTTCGAAAAAG AACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAAAGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCGA ACTGGAAAACGG AAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAA CTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAA ACTTCTGTACCTGGCAAGCCACT ACGAAAAGCTGAAGGAAAGCCCGAAGACAAACGAAACAGAAAGCAGCTGTT CGTCGAACAGCAAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAAACAGATCAGC GAATTCAGCAAGAGAGTCA TCC TGGCAGACGCA AACCTGGACAAGGTCC TGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAAGCCGATCAGAGAAACAGGCAGA AAACATCATCCACCTGTTCA CACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCA TTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAA AGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCAC CAGAGCATCACAGGACTGTA CGAAACAAGAA TCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC AGAGCAGCAAAAGAGAAAGTACTTCGCAGTCTAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 5 5】

ヒトにおいて、 一般的に高い発現 を有するコドン を使用した、C as 9 ORF (開始コドンま たは終止コドン なし、融合タン パク質コード配 列に含めるのに 好適である)	3 4 1	CCTAAGAAAAAGCGGAAAGGTCGACGGGGGATAAGAAAGTACTCAATCGGGC TGGATATCGGAACTAATTCCGTGGGTGGGCAGTGATCAGGATGAATA CAAAGTGCCGTCCAAAGAAAGTTCAAAGTCTGGGAAACACCGATAGACAC AGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAA CCGCAGAGCGACCCGGCTCAAACGTACCCGAGGCGACGCTACACCCG GGGAAAGAAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGAACGAAATG GCAAGGTGCGACGACAGCTTCTTCCACCGCTGGAAAGATCTTTCTCTGG TGGAGGAGGACAAAGAAAGCATGAACGGCATCTTCTTTGGAAACATCTGT CGACGAAAGTGGGCTACCAAGAAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTCGGG AAGAAATTGGTTGACTCAACTGACAAAGCCGACCTCAGATTGATCTACT TGGCCCTCGCCCATATGATCAAAATTCGGCGGACACTTCTGATCGAAGG CGATCTGAACCCCTGATAAATCCGACGTGGATAAGCTTTTCAATTCAACTG GTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGAAAAACCAATCAATGCTAGCG GCGTCGATGCCAAGGCCATCTCTGTCCGCCCGCTGTCGAAGTCGGCGCG CCTCGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTT TTGGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCAAATTTCAAGT CCAAATTTGACCTGGCCGAGGACGCAAGCTGCAACTCTCAAAGGACAC CTACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTTGGCGATCAGTAC GGGATCTGTTCTTGCCGCTAAGAACCTTTTCGGACGCAATCTTGCTGT CCGATATCCTGGCGGTAAACACCGAAATACCAAAGCGCGCTTAGCGC CTCGATGATTAAAGCGGTACGACGAGCATCACCAAGGATCTCACGCTGCTC AAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCT TCGACCAAGTCCAAGAAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCTAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 5 6】

CCAGGAAGAGTTCTATTAAGTTTCATCATCAAGCCCAATCCTGGAAAAAGATGGAC GGAACCGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGA AACAGAGAACCTTTGACAAAGGATCCATTCCCCACCAAGATCCATCTGGG TGAGCTGCACGCCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCCTC AAGGACAAACCGGAAAAAGATCGAGAAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGT ATTACGTTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAATTCCGCGCTTCGCGTGGATGAC TAGAAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCCTTGGAATTTTCGAGGAAGTTGTG GATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAAACGAATGACCAACTTCG ACAAGAATCTCCCAACAGAGAAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTA CGAATACTTCACTGCTACACGAACCTGACTAAAGTGAATACGTTACT GAAGGAATGAGGAAGCCGGCCCTTCTGTCCGGAGAACAGAAAGCAA TTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCT TAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTCGACTCAGTGGAAATC AGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATC TCCGTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTTGACAAACGAGGAGAACGA GGACATCCTGGAAAGATATCGTCCCTGACCTTGACCTTTTCGAGGATCGC GAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATA AGGTCATGAACCAACTCAAGCGCCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCT CTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGGATAAACAGAGCGGTAAACT ATCCTGGATTTCCTCAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGC AATTGATCCACGACGACAGGCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAAGC ACAAAGTGTCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTG GCCGGTTCCGCCGGCGATTAAAGAAGGGAATTCGCAAACTGTGAAGGTGG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 5 7】

TCGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCCGGAGAAATATCGT GATTGAAAATGGCCCCGAGAAAACCCAGACTACCCAGAAAGGGCCAGAAAAAC TCCCCGAAAGGATGAAAGCGGATCGAAGAAAGGAATCAAGGAGCTGGGCA GCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAACACGCCAGCTGCCAGAACGA GAAGCTCTACCTGTACTATTTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGAC CAAGAGCTGGACATCAATCGGTGTCTGATTACGACGTGGACCCACATCG TTCCACAGTCCCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGTGTGAC TCGCAGCGACAAAGAACAGAGGGAAGTCAAGTAAATGTGCCATCGGAGGAG GTCGTGAAGAAAGATGAAGAAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGC TGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAAATCTCACTAAAGCCGAGCCGGCCGG ACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCAATCAACCGGCAGCTGCTCGAG ACTCGGCAGATTACCAAGCACGCTGGCGCAGATCTTTGGACTCCCGCATGA ACACTAAATACGACGAGAACGATAAAGCTCATCCGGGAAGTGAAAGGTGAT TACCCCTGAAAAGCAAACTTGTGTGGGACTTTCGGGAAGGACTTTCAGTTT TACAAAGTGACAGAAATCAACAACCTACCATCAGCGGCATGACCCATACC TCAAACGCTGTGCTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCC'ATAACTTGA ATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATG ATAGCCAAAGTCCGAACAGGAAAATCGGGAAGCAACTGCGAAAATACTTCT TTTACTCAAAACATCATGAACCTTTTCAAGACTGAAAATTACGCTGGCCAA TGGAGAAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAAATCAACGGAGAAACGGGC GAAATCGTGTGGACAAAGGCAGGGACTTCGCCA'ACTGTTGGCAAAAGTGC TCTCTATGCCCGCAAGTCAATATTTGTGAAGAAAAACCGAAGTGCAAACCGG CGGATTTTCAAAAGGAATCGATCCTCCCAAGAGAAAATAGCGACAAAGCTC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 5 8】

ATTGCACGCCAAGAAAGACTGGGACCCGGAAGAAAGTACGGAGGATTTCGATT CGCCGACTGTGCGATACTCCGTCCCTCGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGG AAAGAGCAAAAAGCTCAAAATCCGTCAAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATC ATGGAAACGATCCTCGTTGAGAGAAAGAACCCGATTGATTTCTCGAGGCGA AGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAAGATCTGATCATCAAACTCCCAAGTA CTCACTGTTGGAAC TGGA AAAATGGTGGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCC GGAGAACTCCAAAAAGGAATGAGCTGGCTTGCCTAGCAAGTACGTCA ACTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAAAAAACTCAAAGGTCACCCGA AGATAACGAACAGAAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAAGCATTTATCTG GATGAAATCATCGAAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAAGCGCGTGATCCTCG CCGACGCCAAACCTCGACAAAGTCCCTGTCGGCCCTACAATAAGCATAGAGA TAAGCCGATCAGAGAACACAGGCCCGAGAACATTATCCACTTGTTACCCCTG ACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCCTCAAGTACTTCGATACTACTATCG ATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCTGAT CCACCAAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTCCGAG CTGGGTGGCGAT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 5 9】

表 4 の長い半減期コドンを使用した Cas 9 ORF (開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である)	3 4 2	GACAAAGAAAGTACTCTATTCGGTTTGGACATCGGTACCAACTCTGTCTGGTT GGGCCGTCAATCACCAGCAATACAAAGGTCCCATCTAAGAAGTTCAAAGGT CTTGGGTAAACCGGACAGACACTCTATCAAGAAGAACTTGATCGGTGCC TTGTTGTTCCGACTCTGGTGAAAACCGCCGAGCCACCAAGATTGAAGAGAA CCGCCAGAAAGAAAGATACACCAGAAAGAAAGAAAGAAATCTGCTACTTCCA AGAAATCTTCTCTAAACGAAATGGCCAAAGTCCGACGACTCTTCTTCCAC AGATTGGAAGAAATCTTCTTGGTCCGAAGAGACAAAGACACGAAAGAC ACCCAAATCTTCGGTAACATCGTCGACGAAAGTCGCCATCCACGAAAAAGTA CCCAACCATCTACCACTTGAGAAAGAAAGTTGGTCGACTCTACCGACAAAG GCCGACTTGAGATTGATCTACTTGGCCCTTGGCCCAATGATCAAGTTCA GAGGTCACTTCTTGATCGAAGGTGACTTGAAACCCAGACAACTCTGACGT CGACAAAGTTGTTCAATCCAAATGGTCCAAACCTACAAACCAATTGTTCCGAA GAAAACCCCAATCAACGCCCTCTGGTGTGACGCCCAAGGCCATCTTGTCGTG CCAGATTGTTCTAAGAGCAGAAAGATTGGAAACCTTGATCGCCCAATTGCC AGGTGAAAAGAAAGAACGGTTTGTTCGGTAACCTTGATCGCCCTTGCTTTG GGTTTGACCCCAAACTTCAAGTCTAACTTCGACTTGGCCGAAAGACGCCA AGTTGCAATTGTCTAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAACTTGT GGCCCAATCGGTGACCAATACGCCGACTTGTCTTGGCCGCCAAGAAC TTGTCCTGACGCCATCTTGTGTTGTTGACATCTTGAGAGTCAACACCGAAA TCACCAAAGGCCCAATTGTCTGCCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAACA CCACCAAGACTTGACCTTGTGAAGGCCCTTGGTCAGACAAACAATTGCCA GAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAATCTAAGAACGGTTACGCCG GTTACATCGACGGTGGTGCCCTCTCAAGAAAGAAATCTCAAGTTCAATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 6 0】

GCCAAATCTTGGAAAAAGATGGACGGTACCGAAGAAATTTGTTGGTCAAGTTG AACAGAGAAAGACTTGTGAGAAAAGCAAAAGAAACCTTCGACAAACGGTTCTA TCCACACCCAAAATCCACTTGGGTGAATTGCAAGCCATCTTGAGAAAGACA AGAAAGACTTCTACCCATTCTTGAAAGGACAAACAGAAAAAGATCGAAAAAG ATCTTGACCTTCAGAAATCCCATACCTACGTCGGTCCATTGGCCAGAGGTA ACAGCAGATTCCGCTGGATGACCAGAAAGTCTGAAGAAACCATCACCCC ATGGAACCTTCGAAGAAGTCGTCGACAAAGGTGCCCTCTGCCCAAATCTTTC ATCGAAAGAAATGACCAACTTCGACAAAGAACTTGCCAAACGAAAAAGGTCT TGCCAAAGCACTCTTTTGTGTACGAAATACCTTACCCTCTACAAACGAAAT GACCAAGGTCAAGTACGTACCGAAGGTATGAGAAAGCCAGCCTCTCTG TCTGGTGAACAAAAGAAGGCCATCGTCGACTTGTGTTCAAAGACCAACA GAAAGGTCACCGTCAAGCAATTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGA ATGCTTCGACTCTGTTCGAAAATCTCTGGTGTGAAAGACAGATTCAAACGCC TCTTTGGGTACCTACCAACGACTTGTGAAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCTTGGACAAACGAAAGAAACGAAGACATCTTGAAGACATCGTCTTGAC CTTGACCTTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGATTGAAGACC TACGCCCACTTGTTCGACGACAAAGGTCAATGAAGCAATTGAAGAGAAAGAA GATACACCGGTTGGGTAGATTGAGCAGAAAAGTTGATCAACGGTATCAG AGCAAGCAATCTGGTAAGACCATCTTGGACTTCTTGAAAGTCTGACGGT TTCGCCAACAGAAACTTCATGCAATTGATCCACGACGACTCTTTGACCT TCAAGGAAGACATCCAAAAGGCCCAAGTCTCTGGTCAAGGTGACTCTTT GCACGAACACATCGCCCAACTTGGCCGGTTCTCCAGCCATCAAGAAAGGT ATCTTGCAAAACCGTCAAGGTCTGTCGACGAATTTGGTCAAGGTCAATGGGTA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 6 1】

	GACACAAAGCCAGAAAAACATCGTCAATCGAAATGGCCAGAGAAAAACCAAAAC CACCCAAAAGGGTCAAAAAGAACAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAAATCGAA GAAAGTATCAAGGAAATTGGGTTCTCAAAATCTTGAAGGAAACCCAGTCTG AAAAACCCCAATTGCAAAACGAAAAGTTGTACTTGTACTACTTGCAAAA CGGTAGAGACATGTACGTCGACCAAGAAATGGACATCAACAGATTGTCT GACTACGAGCTCGACACATCGTCCACAAATCTTTCTTGAAGGACGACT CTATCGACAAACAAAGTCTTGACACAGATCTGACAAAGAACAGAGGTAAGTC TGACAAACGTCCCATCTGAAGAAAGTCGTCAAGAAAGTGAAGAACTACTGG AGACAAATTGTTGAACGCCAAGTTGATCACCCCAAGAAAGTTGACAACT TGACCAAGGCCGAAAGAGGTGGTTTGTCTGAAATTGGACAAGCCGGTTT CATCAAGAGACAAATTGGTCGAAACAGACAAAATCACCAAGCAGCTGGCC CAAAATCTTGGACAGCAGAAATGAACACCAAGTACGACGAAAACGACAAAGT TGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACCTTGAAGTCTAAGTTGGTCTCTGA CTTCAGAAAGGACTTCCAAATCTACAAAGTCAGAGAAATCAACAACTAC CACCAAGCCACGACGCGCTACTTGAAACGCGGTCGTCCGTACCGCTTGA TCAAGAAAGTACCCAAAGTTGGAATCTGAAATTCGTCTACGGTGACTACAA GGTCTACGACGTCAGAAAAGATGATCGCCAAAGTCTGAACAAAGAAATCGGT AAGGCCACCGCCCAAGTACTTCTTCTACTCTAACATCATGAACCTTCTCA AGACCGAAATCACCTTGGCCCAAGGTGAAATCAGAAAGAGACCATTGAT CGAAACCAACGGTGAAACCGGTGAAATCGTCTGGGACAAAGGTTAGAGAC TTCCGCCACCGTCAGAAAGGTCTTGTCTATGCCACAAAGTCAACATCGTCA AGAAAGACCGAAGTCCAAACCGGTGGTTTCTCTTAAGGAAATCTATCTTCCC AAAGAGAAACTCTGACAAAGTTGATCGCCAGAAAAGAGACTGGGACCCCA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 6 2】

	AAGAAGTACGGTGGTTTCGACTCTCCAAACCGTCGCCCTACTCTGTCTTGG TCGTGCCCCAAGGTCGAAAAAGGGTAAGTCTAAGAAGTTGAAGTCTGTCAA GGAATGTGTGGGTATCACCATCATGGAAGAATCTTCTTTCGAAAAAGAAC CCAATCGACTTCTTGAAGCCCAAGGGTTACAAGGAAGTCAAGAAGGACT TGATCATCAAGTTGCCAAAGTACTCTTTGTTCCGAATTGGA AAAACGGTAG AAAGAGAAATGTTGGCCCTCTGCCGGTGAAATTGCAAAAAGGTAACGAAATG GCCTTGCCATCTAAGTACGTCAACTTCTTTGTACTTGGCCCTCTCACTACG AAAAAGTTGAAGGGTTCTCCAGAAGACAAACGAAACAAAAGCAATTGTTCCGT CGAACAAACACAAAGCACTACTTGGACGAAAATCATCGAACAAATCTCTGAA TTCTCTTAAGAGAGTCATCTTGGCCGACGCCCAACTTGGACAAAGTCTTGT CTGCCCTACAACAAGCACAGACAGAACCAATCAGAGAACAAAGCCGAAAA CATCATCCCACTTGTTCCACCTTGACCAACTTGGGTGCCCCAGCCGCCCTC AAGTACTTCGACACCCACCATCGACAGAAAAGAGATACACCTCTACCAAGG AAGTCTTGGACGCCACCTTGATCCACCAATCTATCACCGGTTTGTACGA AACCAGAAATCGACTTGTCCTCAAATTGGGTGGTGACCGGTGGTGGTTCTCCA AAGAAGAAGAGAAAGGTC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 6 3】

表 4 の U リッチ コドンを使用し た C a s 9 O R F (開始コド ンまたは終止コ ドンなし、融合 タンパク質コー ド配列に含める のに好適であ る)	3 4 3	GATAAAAAATATTCATATTGGTTTAGATATTGGTACTAATTCGTGGTT GGGCTGTTATTACTGATGAATATAAAGTTCCTCTCTAAAAAATTTAAAGT TTTAGGTAATACCTGATCGTCATTCTATTTAAAAAATTTAATTTGGTGGT TTATTTATTTGATTCCTGGTGAACTGCTGAAAGCTACTCGTTTAAAAACGTA CTGCTCGTGGTGGTTATACCTCGTAAAGTAAAAATCGTATTTGTATTTACA AGAAAATTTTTCCTAAATGAAATGGCTAAAGTTGATGATCTCTTTTTCAT CGTTTAGAAGAACTCTTTTAGTTGAAGAAAGATAAAAAACATGAACGTC ATCCTATTTTGGTAATATTTGGTTGATGAAGTTGCTTATCATGAAAAAATA TCCTACTATTTATCATTTTACGTAAAAAATTAGTTGATTTCTACTGATAAA GCTGATTTTACGTTTAAATTTTATTTAGCTTTAGCTCATATGATTAATTTTC GTGGTCATTTTCTAAATGAAGGTGATTTAAATCCTGATAATTCCTGATGT TGATAAATTAATTAATCAATTAGTTCAAACTTATAATCAATTAATTTGAA GAAAACTCTATTAATGCTTCTGGTGTGATGCTAAAACTATTTTATCTG CTCGTTTATCTAAATCTCGTCGTTTAGAAAAATTTAATTGCTCAATTACC TGGTGAAAAAATAAATGGTTTATTTGGTAAATTTAATTGCTTTATCTTTA GGTTTAACTCCTAATTTTAAATCTAAATTTTGTGATTTAGCTGAAGATGCTA AATTACAAATTAATCTAAAGATACCTTATGATGATGATTTTAGATAATTTATT AGCTCAAAATGGTGATCAATATGCTGATTTATTTTAGCTGCTAAAAAT TTATCTGATGCTATTTTATTAATCTGATATTTTACGTGTTAATACTGAAA TTACTAAAGCTCCTTTATCTGCTTCTATGATTAACGTTTATGATGAACA TCATCAAGATTTAACTTTATTAAGCTTTTAGTTGCTCAACAAATTAACCT GAAAAATATAAAGAAAAATTTTTTTGTGATCAATCTAAAAATGGTTATGCTG GTTATATTGATGGTGGTGGCTTCTCAAGAAAGAAATTTTATAAATTTATTAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 6 4】

	ACCCTATTTTAGAAAAAATGGATGGTACTGTAAGAAATTAATTAGTTAAATTA AATCGTGAAGATTTATTACGTAAACAACGTACTTTTGTGATAATGGTTCTA TTCCCTCATCAAAATTCATTTAGGTGAATTACATGCTATTTTACGTCGTCA AGAAAGATTTTATCCCTTTTATAAAGATAAATCGTGAAAAAATTTGAAAAA ATTTAAACTTTTTCGTATTCCTTATATGTTGGTCCCTTAGCTCGTGGTA ATTCTCGTTTTCGCTGGATGACTCGTAAATCTGAAGAAACTATTACTCC TTGGAATTTTGAAGAAGTTGTTGATAAAGGTGCTTCTGCTCAATCTTT ATTGAACGTATGACTAATTTTGATAAAAAATTTACCTAATGAAAAAGTTT TACCTAAACATTCCTTTATTAATGAAATATTTTACTGTTTAAATGAAAT AACTAAAGTTAAATATGTTACTGAAGGTATGCGTAAACCTGCTTTTAA TCTGGTGAACAAAAAAGCTATTGTTGATTATTATTAAACATAATC GTAAAGTTACTGTTAAACAAATTAAGAAGATTATTTAAAAAATTTGA ATGTTTGTGATTCGTGTTGAAAATTTCTGGTGTGAAAGATCGTTTAAATGCT TCTTTAGGTACTTATCATGATTTTATTAAAAAATTTAAGAATAAAGATT TTTATAGATAATGAAGAAAAATGAAGATAATTTAGAAGATAATTGTTTAAAC TTTAACTTTTATTTGAAGATCGTGAAATGATTGAAGAACGTTTAAAAACT TATGCTCATTTATTTGATGATAAAGTTATGAAACAATTAACGTCGTC GTATACTGGTTGGGTCGTTTATCTCGTAAATTAATTAATGGTATTCCG TGATAAACCAATCTGGTAAAACTATTTTAGATTTTAAAAATCTGATGGT TTTGCTAATCGTAATTTTATGCAATTAATTCATGATGATTCCTTAACTT TTAAAGAAGATATTCAAAAAAGCTCAAGTTTCTGGTCAAGGTGATTCCTT ACATGAACATATTGCTAATTTAGCTGGTTCTCTGCTATTAAAAAAGGT ATTTACAAACTGTTAAAGTTGTTGATGAATTAGTTAAAGTTATGGGTC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 6 5】

	GTCATAAACCTGAAAAATATTGTTATTGAAATGGCTCGTGAATAATCAAACTAC TACTCAAAAAAGGTCAAAAAAATTCCTCGTGAAACGTATGAAACGTATTGAA GAAAGGTATTAAAGAAATTAGGTTCTCATAAATTTTAAAAAGAACATCCTGTTG AAAAATACCTCAATTACAAAAATGAAAAAATTAATAATTAATTTTACAAAA TGGTCGTGATATGTATGTTGATCAAGAAATTAGATATTAAATCGTTTATCT GATTATGATGTTGATCATATTGTTCCCTCAATCTTTTAAAAAGATGATT CTATTGATAATAAAGTTTAACTCGTTCTGTATAAAAATCGTGGTAAATC TGATAAATGTTCCCTTCTGAAAGAAAGTTGTTAAAAAATGAAAAAATTAATGG CGTCAATTAATAAATGCTAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT TAACTAAAGCTGAACGTGGTGGTTTATCTGAATTAGATAAAGCTGGTTT TATTAAACGTCAATTAGTTGAAACCTCGTCAAAATTAATAACATGTTGCT CAAAATTTTAGAATTCCTGATGAAATACATAAATATGATGAAAAATGATAAAT TAAATTCGTGAAGTTAAAGTTATTACTTTAAAAATCTAAATTAGTTTCTGA TTTTCGTAAAGATTTTCAATTTTATAAAGTTCTGTGAATAAATAATTAAT CATCATGCTCATGATGCTTATTAAATGCTGTTGTTGCTACTGCTTTAA TTAAAAAATATCCTAAATAGAAATCTGAATTTGTTTATGGTGATTAATA AGTTTATGATGTTTCGTAAAAATGATGCTAAAACTGAAACAAAGAAATTTGGT AAAGCTACTGCTAAATATTTTATTCTAATAATATGAAATTTTATT AAACTGAAATTACTTTAGCTAATGGTGAATAATCGTAAACGTCCTTTAAT TGAAACTAATGGTGAAACCTGGTGAATAATGTTTGGGATAAAGGTCGTGAT TTTGCTACTGTTCCGTAAGTTTATCTATGCCCTCAAGTTAAATATTGTTA AAAAAACTGAAGTTCAAACTGGTGGTTTCTCTAAAAGAATCTATTTTACC TAAACGTAATTCCTGATAAATTAATGCTCGTAAAAAAGATTGGGATCCT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 6 6】

AAAAAATATGGTGGTTTTTGGATTCTCTACTGTTGCTTATTTCTGTTTTAG TTGTTGCTAAAAGTTGAAAAAGGTAAATCTAAAAAATTAAAAATCTGTAA AGAAATTATTAGGTATTACTATTATGGAACGTTCTTCTTTTGAAAAAAAT CCTATTGATTTTTAGAAAGCTAAAGGTTATAAGAAAGTTAAAAAAGATT TAAATTATTAAATTACCTAAATATTCTTTATTGAAATTAGAAAAATGGTCG TAAACGTATGTTAGCTTCTGCTGGTGAATTACAAAAAAGGTAAATGAATTA GCTTTACCTTCTAAATATGTTAATTTTTTATATTAGCTTCTCATTTATG AAAAATTAAAAAGGTTCTCTGGAAGTAAATGAACAAAAAACAAATTATTGT TGAACAAACATAACATTATTTAGATGAAATTTATTGAACAAATTTCTGAA TTTTCTAAACGTGTTATTTTAGCTGATGCTAAATTTAGATAAAGTTTAT CTGCTTATAATAAACATCGTGATAAACCTATTCTGTAACAAAGCTGAAAA TATTATTTCATTTATTACTTTTAACTAATTTAGGTGCTCCTGCTGCTTT AAATATTTTGATAC TACTATTGATCGTAAACGTTATACTTCTACTAAAG AAGTTTTAGATGCTACTTTAAATTCATCAATCTATTACTGGTTTATATGA AACTCGTATTGATTTATCTCAATTAGGTGCTGATGTTGGTTCCTCCT AAAAAAAACGTAAAGTT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 6 7】

表4の低コード ンを使用したC as 9 ORF (開始コードま たは終止コード なし、融合タン パク質コード配 列に含めるのに 好適である)	GACAAAAAATACTCCATCGGCCCTCGACATCGGGCACCACCTCCGTCCGGCT GGGCCGTCAATCACCAGCAATACAAAAGTCCCTCCAAAAAATTCAAAAGT CCTCGGCACACCGACAGACACTCCATCAAAAAAACCCTCATCGGCCGC CTCCTCTTCGACTCCGGCGAAAACCGCGAAGCCACACAGACTCAAAAAGAA CGGCAGAGAGAGATACACCAGAGAGAAAAAACAGAAATCTGCTACCTCCA AGAAATCTTCTCCAAACGAAATGGCCAAAAGTCGACGACTCTCTTCCAC AGACTCGAAGAAATCTCTCTCGTCGAAAGACAAAAAACAACGAAAGAC ACCCCATCTTCGGCAACATCGTCGACGAAAGTCGCTACCCACGAAAAATA CCCCACCATCTACCACCTCAGAAAAAATACTCGTCGACTCCACCGACAAA GGCGACCTCAGACTCATCTACCTCGCCCTCGGCCACATCATCAAAATCA GAGGCCACTTCTCATCGAAGGGGACCTCAACCCCGACAACTCCGACGT CGACAAAATCTTCTCATCCAACTCGTCCAAAACCTACAAACCACTCTTCGAA GAAAACCCCATCAACGCCCTCCGGCGTCGACGCCAAAAGCCATCCTCTCCG CCAGACTCTCCAAATCCAGAAAGACTCGAAAAACCTCATCGCCCACTCCC CGCGGAAAAAACAACGGCCCTCTTCGGCAACCTCATCGCCCTCTCTCCCTC GGCCTCACCCCAACTTCAAAATCCAACTTCGACCTCGCCGAAGACGCCA AACTCCAACTCTCCAAAGACACCTACGACGACGACCTCGACAACTCCT CGCCCAATCGGGGACCAATACGCCGACCTCTCTCGCCGCCAAAAAC CTCTCCGACGCCATCTCTCTCTCCGACATCTCTCAGAGTCAACACCGAAA TCACCAAAAGCCCCCTCTCCGCCCTCCATGATCAAAAAGATACGACGAAAC CCACCAAGACCTCACCTCTCTCAAAAGCCCTCGTCAGACACAACTCCCC GAAAAATACAAAGAAATCTCTTCGACCAATCCAAAAACGGCTACGGCG GCTACATCGACGGCGGCCCTCCCAAGAGAAATCTACAAATTCATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 6 8】

	ACCATCCTCGAAAAAATGGACGGCACCGGAAAGAACTCCTCGTCAAACTC AACAGAGAAGACCTCCTCAGAAAAACAAAGAAACCTTCGACAAACGGCTCCA TCCCCACCAAAATCCACCTCGGGAACTCCACGGCCATCCTCAGAAAGACA AGAAGACTTCTACCCCTTCCCTCAAAAGACAAACAGAGAAAAAATCGAAAAA ATCCTCACCTTCAGAAATCCCTACTACGTGGGCCCTCGCCAGAGGCA ACTCCAGATTGGCTGGATGACCAAGAAATCCGAAGAAACCAATCAACCC CTGAACTTCGAAGAAAGTCGTCGACAAAAGGGCCCTCCGCCCAATCCTTC ATCGAAAGAAATGACCAACTTCGACAAAAACCTCCCCAACGAAAAAGTCC TCCCCAAACACTCCCTCCTCTACGAAATACCTTACCCGTCTACAAACGAACT CACCAAAAGTCAAAATACGTACCGGAAGGCATGAGAAACCCGCCCTCCTC TCCGGCGAACAAAAAAGCCATCGTCGACCTCCTCTTCAAAACCAACA GAAAAGTCACCGTCAAAACAACTCAAGAAGACTACTTCAAAAAAATCGA ATGCTTCGACTCCGTGCAAAATCTCCGGGTGGAAGACAGATTCAACGCC TCCCTCGGCACCTACCAAGACCTCCTCAAAAATCATCAAAAGCAAAAGACT TCCTCGACAAACGAAGAAACGAAGACATCCTCGAAGACATCGTCTCAC CCTCACCTCTTCGAACACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTCAAAACC TACGCCACCTCTTCGACGACAAAGTCATGAAACAACTCAAAAGAAAGAA GATACACCGGCTGGGGCAGACTCTCCAGAAAACTCATCAACGGCATCAG AGACAAACAAATCCGGCAAAACCATCCTCGACTTCCCTCAAAATCCGACGGC TTCGCCAACACAGAAACTTCATGCAACTCATCCACGACGACTCCCTCACCT TCAAGAAGACATCCAAAAAGCCCAAGTCTCCGGCCAAAGGGACTCCCT CCACGAACACATCGCCAACTCGCCGGCTCCCCCGCCATCAAAAAAGGC ATCCTCCAAACCGTCAAAAGTCGTGACGAACCTCGTCAAAAGTCATGGGCA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 6 9】

	GACACAAACCCGAAAAACATCGTTCATCGAAAAATGGCCAGAGAAAAACCAAAAC CACCCAAAAAGGCCAAAAAATCTCCAGAGAAAGAAATGAAAAAGAAATCGAA GAAGGCATCAAAAGAACTCGGCTCCCAAAATCCTCAAAAGAAACCCCGTCG AAAAACCCCACTCCAAAAAGAAAAAATCTACCTCTACTACCTCCAAAA CGGCAGAGACATGTACGTCGACCAAGAACTCGACATCAACAGACTCTCC GACTACGACGTGGACCAATCGTCCGCCAAATCCCTCCAAAGAGACT CCATCGACAAACAAGTCCCTCACCCAGATCCGACAAAAACAGAGGCAAAATC CGACAACTCCCTCCGAAAGAAAGTCTCAAAAAAATGAAAAAATCTACTGG AGACAACTCCTCAACGCCAAATCTCATCACCCAAAAAGAAAAATTCGACAAAC TCACCAAAAGCCGAAAGAGCGGCCCTCTCCGAATCGACAAAGCCGGCTT CATCAAAAGACAACCTCGTGGAAACAGAGACAAATCACCAAAACAGTCCGC CAAAATCCTCGACTCCAGAAATGAACACCAAAATACGACGAAAAACGACAAAC TCATCAGAGAAAGTCAAAAGTCAATCACCCCTCAAAATCCAAATCTGTCTCCGA CTTCAGAAAAAGACTTCCAAATTCACAAAGTCAGAGAAATCAACAACTAC CACCAAGCCCAAGACGCTACCTCAACGCCGTCGTCGGCACCGCCCTCA TCAAAAAATACCCCAAACTCGAATCCGAAATTCGTCCTACGGCGACTACAA AGTCTACGACGTCAGAAAAAATGATCGCCAAATCCGAAACAAAGAAATCGGC AAAGCCACCCGCAAAATACTTCTCTACTCCAAACATCATGAATCTCTCA AAACCGAAATCACCCCTGGCCAAAGCGGAAATCAGAAAAAGACCCCTCAT CGAAACCAACGGCGAAACCGGCGAAATCGTCTGGGACAAAGGCAGAGAC TTCCGCCACCGTCAGAAAAAGTCCCTCTCCATGCCCCAAAGTCAACATCGTCA AAAAAACCGGAAGTCCAAACCGGGGCTTCTCCAAAGAAATCCATCCCTCC CAAAAGAAACTCCGACAAACTCATCGCCAGAAAAAAGACTGGGACCCC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 7 0】

AAAAAATACGGCGGGCTTCGACTCCCCACCGTCGCCCTACTCCGTCCCTCG TCGTGCGCCAAAAGTCGAAAAAAGGCAAAATCCAAAAAACTCAAAATCCGTCAA AGAACTCCTCGGCATCACCATCATGGAAGATCCTCCTCGAAAAAANAC CCCATCGACTTCCTCGAAGCCAAAGGCTACAAAGAAGTCAAAAAAAGACC TCATCATCAAACTCCCCAAAATACTCCCTCTTCGAACTCGAAAACGGCAG AAAAAGAAATGCTCGCCTCGCGCGGGAACTCAAAAAAGGCAACGAACCTC GCCCTCCCCCTCCAAATACGTCAACTTCCTCTACCTCGCCTCCCACCTACG AAAAACTCAAAGGCTCCCCCGAAGACAAACGAACAAAAACAACTCTTCGT CGAACAAACAAACACTACCTCGACGAAATCATCGAACAAATCTCCGAA TTCTCCAAAAAGAGTCATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAAGTCCCT CCGCCACAAACAAACAGAGACAAACCCCATCAGAGAACAAAGCCGAAAA CATCATCCACCTCTTCACCCCTCACCAACCTCGGCGCCCCCGCCCTTC AAATACTTCGACACACCATCGACAGAAAAAAGATACACCTCCACCAAAAG AAGTCTCGACGCCACCTCATCCACCAATCCATCACCGGCCCTCTACGA AACGAGAAATCGACCTCTCCCAACTCGGGGCGAGCGGGGGGCTCCCGC AAAAAAAAGAAAGTC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 7 1】

表 4 の低コード ンを使用したC a s 9 ORF (開始コードま たは終止コード なし、融合タン パク質コード配 列に含めるのに 好適である)	3 4 5	GAT AAG AAG TAT AGT AT TGG AT TGG AT AT TGG A A C A A A T A G T G T G G G A T G G G C T G T G A T T A C A G A T G A G T A T A A G G T G C C T A G T A A G A A G T T T A A G G T G T T G G G A A A T A C A G A T A G A C A T A G T A T T A A G A A G A A T T T G A T T G G A G C T T T G T T G T T T G A T A G T G G A G A G A C A G C T G A G G C T A C A A G A T T G A A G A G A A C A G C T A G A A G A A G A T A T A C A A G A A A A A G A A T A G A A T T T G T T A T T T G C A G G A G A T T T T T A G T A A T G A G A T G G C T A A G G T G G A T G A T A G T T T T T T C A T A G A T T G G A G A G A G T T T T T G G T G G A G A G G A T A A G A A G C A T G A G A G A C A T C C T A T T T T T G G A A A T A T T G T G G A T G A G G T G G C T T A T C A T G A G A A G T A T C C T A C A A T T T A T C A T T T G A G A A A G A A G T T G G T G G A T A G T A C A G A T A A G G C T G A T T T G A G A T T G A T T T A T T T G G C T T T G G C T C A T A T G A T T A A G T T T A G A G G A C A T T T T T G A T T G A G G A G A T T T G A A T C C T G A T A A T A G T G A T G T G G A T A A G T T G T T A T T C A G T T G G T G C A G A C A T A T A A T C A G T T G T T T G A G G A G A A T C C T A T T A A T G C T A G T G G A G T G G A T G C T A A G G C T A T T T T G A G T G C T A G A T T G A G T A A G A G T A G A A G A T T G G A G A A T T T G A T T G C T C A G T T G C C T G G A G A A A G A A G A A T G G A T T G T T T G G A A A T T T G A T T G C T T T G A G T T T G G A T T G A C A C C T A A T T T T A A G A G T A A T T T T G A T T T G G C T G A G G A T G C T A A G T T G C A G T T G A G T A A G G A T A C A T A T G A T G A T G A T T T G G A T A A T T T G T T G G C T C A G A T T G G A G A T C A G T A T G C T G A T T T G T T T T T G G C T G C T A A G A A T T T G A G T G A T G C T A T T T T G T T G A G T G A T A T T T T G A G A G T G A A T A C A G A G A T T A C A A A G G C T C C T T T G A G T G C T A G T A T G A T T A A G A G A T A T G A T G A G C A T C A T C A G G A T T T G A C A T T G T T G A A G G C T T T G G T G A G A C A G C A G T T G C C T G A G A A G T A T A G G A G A T T T T T T T T G A T C A G A G T A A G A A T G G A T A T G C T G G A T A T A T T G A T G G A G G A G C T A G T C A G G A G G A G T T T T A T A A G T T T A T T A A

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 7 2】

GCC TAT TTT TGG AGA AGA TGG ATG GAA CAG AGG AGT TGT TGG TGA AGT TG AAT AGA GAG GAT TTT GTT GAG AAA G CAG AAA CAT TTT GAT AAT GGA AGT A TTC CTC ATC AGA TTC ATTT GGG AGA GTT GCA TGC TAT TTT GAG AAA GACA GGAG GAT TTT TAT CCT TTT TGA AGG ATA ATAG AGA AGA GTT GAG AAG ATTTTG ACA TTTAG AATTCCTTAT TATGTGG ACCTTTGGCTAGAGGAA ATAGTAGATTTGCTTGATGACAAAGAAAGAGTGAGGAGACAAATTACACC TTGGAATTTTGAGGAGGTGGTGGATAAGGGAGCTAGTGTCTCAGAGTTT ATTGAGAGAA TGACAAA TTTTGAT AAGAA TTTGCC TAATGAG AAGGTGT TGCTAAGCATAGTTTGTGTATGAGTATTTTACAGTGTATAATGAGTT GACAAAAGGTCAAGTATGTGACAGAGGGAATGAGAAAGCCTGCTTTTTTG AGTGGAGAGCAGAAAGGCTATTGTGGATTTGTGTTTAAAGACAAATA GAAAGGTGACAGTGAAAGCAGTTGAAGGAGGATTATTTTAAAGAA GATTGA GTGTTT TGATAGTGTGGAGATTAGTGGAGTGAGGATAGATTTAAATGCT AGTTTGGGAACATATCATGATTTGTTG AAGATTATTAAGGAT AAGGATT TTTTGGATAAATGAGGAGAA TGAGGATATTTTGGAGGATATTGTGTGAC ATTGACATTTGTTGAGGATAGAGAGATGATTGAGGAGAGATTGAAGACA TATGCTCATTTGTTTGATGATAAGGTGATGAAGCAGTTGAAGAGAA GAA GATATACAGGATGGGGAAGATTGAGTAGAAA GTTGATTAA TGGAATTAG AGATAAGCAGAGTGGAAAAGCAATTTTGGATTTTGTGAAGAGTGA TGG TTTGCTAATAGAAA TTTATGCAGTTGATTCATGATGATAGTTTGACAT TTAAGGAGGATATTCAGAAAGCTCAGGTGAGTGGACAGGAGATAGTTT GCATGAGCATATTGCTAATTTGGCTGGAAGTCTGCTATTAAAGAA GGA ATTTTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGATGAGTTGGTGAAGGTGATGGGAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 7 3】

GACATAAGCCTGAGAAATATTGTGATTGAGATGGCTAGAGAGAAATCAGAC AACACAGAAGGGACAGAAGAATAGTAGAGAGAGAAATGAAGAGAAATTGAG GAGGGAATTAAAGGAGTTGGGAAGTCAGATTTTGAAGGAGCATCCTGTGG AGAAACACAGTTGCAGAAATGAGAAAGTTGTATTTGTATTATTTGCAGAA TGGAAAGAGATATGTATGTGGATCAGGAGTTGGATATTAAATAGATTGAGT GATTATGATGTGGATCATATTGTGCCCTCAGAGTTTTTGAAGGATGATA GTATTGATAATAAGGTGTTGACAAAGAAGTGATAAGAAATAGAGGAAAGAG TGATAATGTGCCTAGTGAGGAGGTGGTGAAAGATGAAGAAATTAATTGG AGACAGTTGTTGAATGCTAAGTTGATTACACAGAGAAAGTTTGATAAATT TGACAAAGGCTGAGAGAGGAGGATTGAGTGAGTTGGATAAAGGCTGGATT TATTAAAGAGACAGTTGGTGGAGACAAAGACAGATTACAAAGCATGTGGCT CAGATTTTGGATAGTAGAAATGAATACAAAGTATGATGAGAAATGATAAGT TGATTAGAGAGGTGAAGGTGATTACATTGAAGAGTAAAGTTGGTGAGTGA TTTLAGAAAGGATTTTCAGTTTATTAAGGTGAGAGAGATTAAATAATTAT CATCATGCTCATGATGCTTATTTTGAAATGCTGTGGTGGAAACAGCTTGA TTAAGAAAGTATCCTAAGTTGGAGAGTCAGTTTGTGTATGGAGATTATAA GGTGATGATGTGAGAAAGATGATTGCTAAGAGTGAGCAGGAGATTGGA AAGGCTACAGCTAAGTATTTTATTATAGTAATATTATGAAATTTTATT AGACAGAGATTACATTGGCTAATGGAGAGATTAGAAAGAGACCTTTGAT TGAGACAAATGGAGAGACAGGAGAGATTGTGTGGGATTAAGGGAAGAGAT TTTGGCTACAGTGAGAAAGGTGTTGAGTATGCCCTCAGGTGAATATTGTGA AGAGACAGAGGTGCAGACAGGAGGATTAGTAAGGAGAGTATTTTGCC TAAAGAGAAATAGTGATAAGTTGATTGCTAGAAAGAAAGGATTGGGATCCT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 7 4】

	AAGAAAGTATGGAGGATTTGATAGTCCCTACAGTGGCTTATAGTGTGTTGG TGGTGGCTAAGGTGGAGAAAGGAAAGAGTAAGAAAGTTGAAGAGTGTGAA GGAGTTGTTGGAAATTACAAATTATGGAGAGAAAGTAGTTTGGAGAAAGAA CCTATTGATTTTGGAGGCTAAGGGATATAAGGAGGTGAAGAAAGGATT TGATTATTAAAGTTGCCCTAAGTATAGTTTGTGTTGAGTTGGAGAAATGGAAG AAGAGAAATGTTGGCTAGTGGCTGGAGAGTTGCCAGAAAGGAAATGAGTTG GCTTTGCCTAGTAAGTATGTGAATTTTGTGATTTGGCTAGTCATTTATG AGAAAGTTGAAGGGAAGTCCTGAGGATAAATGAGCAGAAAGCAGTTGTTGT GGAGCAGCATAAGCATTTATTTGGATGAGATTTATGAGCAGATTAGTGAG TTTAGTAAAGAGAGTGATTTTGGCTGATGCTAAATTTGGATAAGGTGTTGA GTGCTTATAATAAGCATAGAGATAAGCCTATTAGAGAGCAGGCTGAGAA TATTATTTCATTTGTTTACATTGACAAATTTGGGAGCTCCTGCTGCTTT AAGTATTTTGATACAAACAATTGATAGAAAGAGATATACAAGTACAAAGG AGGTGTTGGATGCTACATTGATTCATCAGAGTATTACAGGATTGTATGA GACAAAGAAATTGATTTGAGTCAGTTGGGAGGAGATGGAGGAGGAAAGTCCT AAGAAAGAAAGAGAAAGGTG	
		10
		20
		30
		40
		50

【表 4 3 - 3 7 5】

表 4 の低 Δ コ ド ンを使用した C a s 9 O R F (開始コドンま たは終止コドン なし、融合タン パク質コード配 列に含めるのに 好適である)	3 4 6	GACAAAGAAAGTACTCCATCGGGCCCTGGACATCGGCCACCAACTCCGTGGGCT GGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAGAAAGTTCAAGGT GCTGGGCAACACCGACCGGCACCTCCATCAAGAAAGAACTGATCGGCCGC CTGCTGTTCCGACTCCGGCGAGACCGCGGAGGCCACCGGCTGAAGCGGA CCGCCCGGGGGGTACAACCGCGGAGAAACCGGATCTGCTACCTGCA GGAGATCTCTCCAACGAGATGGCCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCAC CGGCTGGAGGAGTCTCTTCTGGTGGAGGAGGACAAAGACGAGCGGC ACCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACCAAGAGAAATA CCCAACCATCTACCACTCGGGAGAGAGCTGGTGGACTCCACCGACAAAG GGGACCTGGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCC GGGCCACTTCCCTGATCGAGGGGACCTGAACCCCGACAACTCCGACGT GGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTTCCGAG GAGAACCCCATCAACGCCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCCG CCGGCTGTCCAAAGTCCCGCGGCTGGAGAACTGATCGCCCAAGCTGCC CGGCGAGAAAGAAACGGCCCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCCTG GGCTGACCCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCA AGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT GGCCAGATCGGCGACAGTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAGAAC CTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGTGAACACCGAGA TCACCAAGGCCCCCTGTCCGCCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCA CCACGAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGACGACCTGCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGTCCAAAGAACGGCTACGGCG GCTACATCGACGGCGGCCCTCCCAAGGAGAGTTCTACAAGTTCAATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 7 6】

GCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCTCCA TCCCCACCCAGATCCACCTGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGCGGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAAACCGGGAGAAATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCGGGATCCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGCA ACTCCCGGTTCCCTGGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCC CTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGACAAAGGCGCTCCGCCCAGTCCCTC ATCGAGCCGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGTGC TGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCAACGTGTACAAAGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAAGCCCGCTTCCCTG TCCGGCGAGCAGAAAGGCCCATCGTGACCTGCTGTTCAAGACCAACC GGAAGGTGACCCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCC TCCCTGGGCACTTACCAAGACCTGCTGTAAGTATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGAACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGAGGACATCGTGCTGAC CCTGACCCCTGTTCCAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCCCACCTGTTCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGGC GGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCGGAAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAATCCGACGGC TTCGCCAACCCGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCT GCAGGAGCACATCGCCAACTGGCCCCGCTCCCCCGCCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 7 7】

GGCACAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCAAGAC CACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCGGAGCGGATGAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCCTGAAGGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGCCGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCC GACTACGACGTGGACCAACATCGTGCCCCAGTCCCTCTGAAAGGAGACT CCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGCAAGTC CGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGTGAAGAACTACTGG CGGCAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAAC TGACCAAGGCCGAGCGGGGGCCCTGTCCGAGCTGGACAAGCCCGCTT CATCAAAGCGGCAGCTGGTGGAGAACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAAGCTGGTGTCCGA CTTCCGGAAAGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTAC CACCAAGCCCAACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACGCCCTGA TCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAA GGTGACGACGTGCGGAAGATGATCGCCCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACCTCTTCA AGACCGAGATCAACCTGGCCAAACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGCGGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGGGAC TTCGCCACCGTGCCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAAGACCGAGGTGCAGACCGGGCGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCC CAAGCGAACTCCGACAAGCTGATCGCCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 7 8】

	AAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCCACCCTGGCCCTACTCCGTGCTGG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGTCCAAAGAAAGCTGAAGTCCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCCTTCGAGAGAGAAC CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAAGGAGGTGAAAGAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCCGAGCTGGAGAACGGCCG GAAGCGGATGCTGGCCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAGCTG GCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTCCCTGTACCTGGCCCTCCACTACG AGAACTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAAAGAGCAGAAAGCAGCTGTTCTG GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAG TTC'TCCAAAGCGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTGCCTG CGGCTACAAACAAGCACCGGGACAAAGCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAA CATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGGCCCCCGCCCTTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAAGCGGTACACCTCCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAAGTCCATCACCGGCTGTACGA GACCCGGATCCACCTGTCCCAAGCTGGGGCGGCGACGGCGGGCTCCCCC AAGAAAGCGGAAGGTG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 7 9】

表4の底A/U コードを使用し たCas9 O RF（開始コード または終止コ ードなし、融合 タンパク質コー ド配列に含める のに好適であ る）	GACAAAGAAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCT GGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAAGTTCAAGGT GCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGCGGCC CTGCTGTTCCACAGCGGCGAGACCGCGAGGCCACCGCGCTGAAGCGGA CCGCCCGCGCGGTACACCGCGGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCA GGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTTGACGACAGCTTCTTCCAC CGGCTGGAGGAGAGCTTCTGTTGGAGGAGGACAAAGAACGACGAGCGGC ACCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACCAAGAGAAAGTA CCCCACCATCTACCACTGCGGAAAGAGCTGGTGGACAGCACCGACAAAG GGCGACCTGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAATGATCAAGTTCC GGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAACAGCGAGCT GGACAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACAGCTGTTCCGAG GAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCG CCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCTGCC CGCGGAGAAAGAAACGGCCCTGTTCCGCAACCTGATCGCCCTGAGCCCTG GGCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCA AGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACTGCT GGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAAC CTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGCTGAACACCGAGA TCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCA CCACGAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGCTGGGCGAGCAGCTGCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTGGACCAAGCAAGAACGGCTAGCGCG GCTACATCGACGGCGGCCCAAGCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCAATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 8 0】

	GCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGGAGGACCTGCTGCCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCAGCA TCCCCACCAAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCTGTAAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGCA ACAGCCGGTTCGCCCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCC CTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAAGGCGCCAGCGCCAGAGCTTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGGTGC TGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAAACGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCCGAAGCCCCCTTCCTG ACCGCGGAGCAGAAAGAGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAAGACCAACC GGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCC AGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGACAAAGAGGAAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGTGAC CCTGACCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCCACTGTTCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGCGC GGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGGAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGC TTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACGCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCCGACAGCCT GCACGAGCACATCGCCCAACCTGGCCCGCAGCCCCCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 8 1】

	GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGTATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCAGAC CACCCAGAAAGGGCCAGAAAGAACAGCCCGGAGCGGATGAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAAAGAGAGAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGC GACTACGACGTGGACCAACATCGTGTCCCCACAGCTTCTCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAG CGACAAAGTGTCCCAAGCAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAAGAACTACTGG CGGCAGCTGTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTGGAACAAAC TGACCAAGGCCGAGCGGGGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAAGCCCGCTT CATCAAGCCGCAGCTGCTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGA CTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGGTGCGGGAGATCAACAACTAC CACCAAGCCACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGCTGGGCACCGCCCTGA TCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTACAA GGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGAGCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCACCGCCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCTTCA AGACCGAGATCACCCCTGGCCAAACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGGGCAGATCGTGTGGGACAAAGGCCGGGAC TTCCGCCACCGTGGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAAACCGAGGTGCAGACCGGGGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCC CAAGCGGAACAGCGACAAAGCTGATCGCCCCGGAAGAGGACTGGGACCCC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 8 2】

	AAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCCTACAGCGTGCTGG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAAGAAC CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAAGGAGGTGAAAGAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCCGAGCTGGAGAACGGCCG GAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAGCTG GCCCTGCCAGCAAGTACGTGAAC TTCCCTGTACCTGGCCAGCCACTACG AGAACTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAAGAGCAGAAAGCAGCTGTTCTGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAG TTCAGCAAGCGGCTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGA GGCCCTACAAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAA CATCATCCACCCTGTTCAACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCCTTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAAGCAACAGG AGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAAGAGCATCACCGGCCCTGTACGA GACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGGCGGGCAGCGCGCGCGAGCCCC AAGAAAGCGGAAGGTG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 8 3】

2つのC末端N LS配列を有す る、表4の低A コドンを使用し たCas9 O RF（開始コド ンまたは終止コ ドンなし、融合 タンパク質コー ド配列に含める のに好適であ る）	GACAAAGAGTACTCCATCGGGCTGGACATCGGCACCAACTCCGTGGGCT GGCCGTGATCAACGACGAGTACAAAGTGCCCTCCAAAGAGTTCAAAGGT GCTGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAAGAACCTGATCGGCGCC CTGCTGTTGACCTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA CCGCCCGGGGGGTACACCCGGCGGAGAACCGGATCTGCTACCTGCA GGAGATCTTCTCCAAAGAGATGGCCAAAGTGGACGACTCCTTCTTCCAC CGGCTGGAGGAGTCTTCTGTTGGTGGAGGAGACAAAGACACGAGCGGC ACCCCATCTTCGGCAACATCGTGACGAGGTGGCTACCAACGAGAAAGTA CCCCACCATCTACCACTCGCGGAAGAAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAAG GCCGACCTGGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAATGATCAAAGTTCC GGGCCACTTCTTGATCGAGGGGACCTGAACCCCGACAACTCCGACCGT GGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGACAGACCTACAACCAAGCTGTTCCGAG GAGAACCCCATCAACGCCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCCG CCGGCTGTCCAAGTCCCGGGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCTGCC CGCGAGAAAGAAAGGCGCTGTTCGGCAACCTGATGGCCCTGTCCCTG GGCTGACCCCAACTTCAAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCA AGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACTGCT GGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAAC CTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAAACCGGAGA TCACCAAAGGCCCCCTGTCCGCCCTCCATGATCAAAGCGGTACGACGAGCA CCACCAAGGACCTGACCCCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGGACGAGCTGCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGTCCAAGACCGCTACGCCG GCTACATCGACGGCGGGCTCCCAAGGAGGTCTACAAGTTCAATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 8 4】

GCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCTCCA TCCCCAACAGATCCACCTGGCGGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAAGGACAAACGGGAGAAATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCCGGATCCCTTACTACCTGGGCCCTGCGCCGGGCA ACTCCCGGTTCCGCTGGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCC CTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCCCTCCGCCAGTCCCTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGTGC TGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACTGTAACCGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCTTCCCTG TCCCGCGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACC GGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGA GTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCC TCCCTGGGCACTTACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGAACAAGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGTGAC CCTGACCCCTGTTCCAGGACCCGGAGATGATCGAGGAGCCGCTGAAGACC TACGCCCACTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGGCG GGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAGCAGTCCGGCAAGAACCATCCTGGACTTCCCTGAAGTCCGACGGC TTCGCCAACCCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCAGGTGTCGGGCCAGGGCGACTCCCT GCACGAGCACATCCGCCAACCTGGCCGGCTCCCGCCCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 8 5】

GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACAGAC CACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAAGGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGCCGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCC GACTACGACGTGGACCAACATCGTGCCCCAGTCCCTTCCTGAAAGGAGACT CCATCGACAAACAAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAAGAACCGGGGCAAGTC CGACAAAGTGTCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAAGAACTACTGG CGGCAGCTGCTGAACGCCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCCGACAAAC TGACCAAGCCCGAGCGGGGGGGCCCTGTCCGAGCTGGACAAGCCCGGCTT CATCAAGCCGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACCGTGGCC CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACCAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAAGCTGGTGTCCGA CTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTAC CACACGCCCAAGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGCAACGCCCTGA TCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCCGTGTACGGCGACTACAA GGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGTCCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTCTACTCCAACATCATGAACCTCTTCA AGACCGAGATCACCTGGCCAAAGCGGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGGCAGATCGTGTGGGACAAAGGCGCGGAC TTCCGCCACCGTGGGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAAAGACCGAGGTGCAGACCGGGGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCC CAAGCGGAACCTCCGACAAAGCTGATCGCCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 8 6】

	AAGAAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCACCGTGGCCCTACTCCGTGCTGG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGTCCAAAGAAAGCTGAAGTCCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGAGCGGTCCCTTCGAGAAAGAAC CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAAGAGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCCAGCTGGAGAACGGCCG GAAGCGGATGCTGGCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGCCAAAGAGCTG GCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTCCTGTACCTGGCTCCCACTACG AGAAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGACAAAGAGCAGAAAGCAGCTGTTCGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAG TTCTCCAAAGCGGTGATCTGGCCGACGCCCAACCTGGACAAAGTGTGT CCGCCCTACAAACAAGCACCGGGGACAAAGCCCATCCGGGAGCGCCGAGAA CATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCCTTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCCAACCTGATCCACCAAGTCCATCACCGGCTGTACGA GACCCGGATCGACCTGTCCCAAGCTGGGCGGCGACGGCTCCGGCTCCCGC AAGAAAGACCGGAAGGTGGACCGCTCCCCCAAGAAAGCGGAAGGTGG ACTCCGGC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 8 7】

表 4 の低 A コド ンを使用した C as 9 ニッカー ゼ ORF (開始 コドンまたは終 止コドンなし、 融合タンパク質 コード配列に含 めるのに好適で ある)	3 4 9	GACAAAGAAAGTACTCCATCGGCCCTGGCCCATCGGCACCAACTCCGTGGGCT GGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAAGAAAGTTCAAGGT GCTGGGCAACACCGACCGGCACCTCCATCAAGAAAGAACCTGATCGGCGGCC CTGCTGTTCTGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA CCGCCGGCGGGGTACACCGCGGGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCA GGAGATCTTCTCCAAAGAGATGGCCAAAGTGGACGACTCCTTCTTCCAC CGGCTGGAGGAGTCTTCTCTGGTGGAGGAGGACAAAGACGAGCGGC ACCCCATCTTCGGCAACATCTGTGGACGAGGTGGCTACCAAGAGAAAGTA CCCCACCATCTACCACTGCGGAAGAAAGCTGCTGGACTCCACCGACAAAG GCCGACCTGGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAATGATCAAGTTCC GGGCCACTTCTGTGATCGAGGGGACCTGAACCCCGACAACTCCGACGT GGACAAAGCTGTTTCAATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTTCTGAG GAGAACCCCATCAACGCCCTCCGGCGTGGACGCCCAAGGCCATCCTGTCCG CCGGCTGTCCAAAGTCCCGGGGCTGGAGAACCTGATCGGCCAAGCTGCC CGCGAGAAAGAAACCGCCCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCTG GGCCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGAGGCCA AGCTGCAGCTGTCCAAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACTGCT GGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGCGCCCAAGAAC CTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGA TCACCAAGGCCCCCTGTCCGCCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCA CCACAGGACCTGACCTGCTGTAAGGCCCTGGTGGGCGAGCAGCTGCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCCGACCAAGTCCAAAGAACGGCTACGCCG GCTACATCGACGGCGGCCCTCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCAATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 8 8】

GCCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGGCAACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCCTTCGACAAACGGCTCCA TCCCCACACAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCCATCCTGCGGGGGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAAACCGGGAGAAAGATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCGGATCCCTACTACGTGGGCCCTGCCCCGGGGCA ACTCCCCGTTCCCTGGATGACCCGGAAAGTCCGAGGAGACCATCACCCC CTGGAACCTCGAGGAGGTGGTGACAAAGGGGCCCTCCGCCAGTCCCTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAGGTGC TGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCGTGTACAACGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATCGGAAAGCCCCCTTCCCTG TCCGGGAGCAGAAAGAACCCATCGTGGACCTGCTGTCAAGACCAACC GGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCC TCCCTGGGCACTACCAAGACCTGCTGAAAGTATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGACAAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGAGGACATCGTGCTGAC CCTGACCCCTGTTCCAGGACCCGGAGATGATCGAGGAGCGCTGAAGACC TAGGCCCACTGTTCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGGC GGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCGGAAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAACTCCGACGGC TTGCCCCAACCGGAACCTTCATGCAAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCCAAGGTCTCCGGCCAGGGCGACTCCCT GCACGAGCACATCGCCAAACCTGGCCCCGGCTCCCCCGGCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 8 9】

GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCCAGAC CACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCC GACTACGACGTGGACCAACATCGTGCCCCAGTCCCTTCCCTGAAGGACGACT CCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAAGAACCCGGGGCAAGTC CGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAGATGAAGAACTACTTGG CGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGTATCACCACAGCGGAAAGTTCCGACAAAC TGACCAAGGCCGAGCGGGGGGCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTT CATCAAGCCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACCTGGCC CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACAACCAAGTACGACGAGAAACGACAAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAAGCTGGTGTCCGA CTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTAC CACCAAGCCCAACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGCACCGCCCTGA TCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAA GGTGACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGTCCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCAACCGCCAAAGTACTTCTTCTACTCCAAACATCATGAACCTTCTTCA AGACCGAGATCACCCCTGGCCAAAGCGGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGGGAC TTCCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGGTGA AGAAACCGGAGGTGCAGACCGGGGGCTTCTCCAAAGGAGTCCATCCTGCC CAAGCGGAAC TCCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 9 0】

	AAGAAGTACGGCGGGCTTCGACTCCCCCACCGTGGCCCTACTCCGTGCTGG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGTCCAAAGAAAGCTGAAGTCCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCCTTCGAGAAAGAAC CCCATCGACTTCCGTGGAGGCCAAGGGCTACAAAGGAGGTGAAGAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCG GAAGCGGATGCTGGCTCCCGCGGGAGCTGCAGAAAGGCAACGAGCTG GCCCTGCCCTCCAAAGTACGTGAATTCCTGTACCTGGCTCCCACTACG AGAAAGCTGAAGGGCTCCCGGAGGACAAACGAGCAAGCAAGCTGTTCGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAG TTCCTCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAAGTGCTGT CCGCCTACAAACAAGCACCGGGACAAAGCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAA CATCATCCACCTGTTTCAACCTGACCAACCTGGGCGCCCGCGCCCTTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACAGTCCATCACCGGCCCTGTACGA GACCCGGATCGAACCTGTCCCAGCTGGGCGGGCGGACGGCGCGGCTCCCCC AAGAAAGAAGCGGAAGGTG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 9 1】

表4の底Aコード ンを使用したC as9ニッカー ゼOF (NL Sなし、および 開始コードまた は終止コードな し、融合タンパ ク質コード配列 に含めるのに好 適である)	GACAAGAAAGTACTCCATCGGCCCTGGCCATCGGCACCAACTCCGTGGGCT GGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGTGCCCTCCAAAGAAAGTTCAAGGT GCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAAGAACCTGATCGGCGCC CTGCTGTTGGAATCGGGGAGACCGCGGAGGCCACCGGGCTGAAGCGGA CCGCCCGCGCGGTACACCGCGGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCA GGAGATCTTCTCCAAAGAGATGGCCAAAGTGAGCGACTCCTTCTTCCAC CGGCTGAGGAGTCTTCTGTTGAGGAGGACAAAGAACGACGAGCGGC ACCCCATCTTCGGCAACATCGTGACGAGGTGGCTACCAACGAGAAAGTA CCCCACCATCTACCACTGCGGGAAGAAAGCTGGTGAGTCCACCGGACAAAG GCCGACCTGGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCC GGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGAACCTCCGACGT GGACAAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTGACAGACCTACAAACAGCTGTTGAG GAGAACCCCATCAACGCCCTCCGGCGTGAGCGCCAAAGGCCATCCTGTCCG CCGGCTGTCCAAGTCCCGGGCGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCTGCC CGCGGAGAAAGAAACGGCCCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCCTG GGCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCA AGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACTGCT GGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCGGACCTGTTCTGGCCGCAAGAAC CTGTCCGACGGCATCCTGCTGTCCGACATCCTGGGGTGAAACACCGAGA TCAACCAAGGCCCTCTGTCCGCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCA CCACCAAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGGCAGCAGCTGCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGTCCAAAGAACGGCTACGGCCG GCTACATCGACGGCGGCCCTCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCTATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 9 2】

GCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCTCCA TCCCCACACAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCCCTGAAGGACACCGGGAGAAATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCCGGATCCCTACTACTGCGGCCCTGCGCCCGGGGCA ACTCCCGGTTCCCTGGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCAACCC CTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCTCCGCCCACTCCTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGTGC TGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTACCGGTGTACAAAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCTTCCCTG TCCGGCGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTTCAAGACCAACC GGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCC TCCCTGGGCACCTACCAACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGAACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCCTGCTGAC CCTGACCCCTGTTCCAGGACCCGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCCACTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGC GGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGAAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCCTGAAGTCCGACGGC TTCGCCAACCAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCAGGTGTCGGGCCAGGGCGGACTCCCT GCACGAGCACATCCCAACCTGGCCGGCTCCCCCGCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 9 3】

GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACAGAC CACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCGGAGCGGATGAAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCCTGAAGGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGCCCGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCC GACTACGACGTGGAACACATCGTCCCGCAGTCCCTTCTGAAGGACGACT CCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCCGTCCGACAAAGAACCGGGGCAAGTC CGACAAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAATACTGG CGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAACC TGACCAAGCCGAGCGGGCGGCCCTGTCCGAGCTGGACAAGCCCGGCTT CATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACCGTGGCC CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAAGCTGGTCCGA CTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTGGGGGAGATCAACAACTAC CACCAAGCCCAAGACCGCTACCTGAACCGCGTGGTGGGCACCGCCCTGA TCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAA GGTGTAAGACGTGCGGAAGATGATCGCCCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACCTTCTCA AGACCGAGATCACCCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAAGGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGGGAC TTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAAGACCGAGGTGCAGACCCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCC CAAGCGGAAC TCCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAAGAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 9 4】

	AAGAAGTACGGCGGGCTTCGACTCCCCCAACCGTGGCCTACTCCGTGCTGG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGTCCAAAGAAAGCTGAAGTCCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCCTCTCGAGAAAGAAC CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCG GAAGCGGATGCTGGCCCTCCGCCGGGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAGCTG GCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAAC TTCTGTACCTGGCCTCCCACTACG AGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAAACGAGCAGAAAGCAGCTGTTCGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAG TTCTCCAAAGCGGTGATCCTGGCCGACGCCCAACCTGGACAAAGTGCTGT CCGCC TACAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAA CATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCCTTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAAGTCCATCACCGGCTGTACGA GACCCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGGGGGCGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 9 5】

2 つの C 末端 N LS 配列を有す る、表 4 の低 A コドンを使用し た C a s 9 ニッ カーゼ O R F (開始コドンま たは終止コドン なし、融合タン パク質コード配 列に含めるのに 好適である)	G A C A A G A A G T A C T C C A T C G G C C T G G C C A T C G G C A C C A A C T C C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C G A C G A G T A C A A G G T G C C C T C C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C G A C C G G C A C T C C A T C A A G A A G A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G T T C G A C T C C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C G G A C C G C C C G G C G G T A C A C C C G G C G A A G A A C C G G A T C T G C T A C C T G C A G G A G A T C T T C T C C A A C G A G A T G G C C A A G G T G G A C G A C T C C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G T C C T T C C T G G T G G A G G A G A C A A G A A C A C G A C G G C A C C C C A T C T T C G G C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A A A G T A C C C C A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C T C C A C C G A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C C C A C A T G A T C A A G T T C C G G G G C A C T T C C T G A T C G A G G G C A C C T G A A C C C G A C A A C T C C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A T C C A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A A C C C C A T C A A C G C C T C C G G C G T G G A C G C C A A G G C C A T C C T G T C C G C C C G G C T G T C C A A G T C C C G G C G G C T G G A G A A C C T G A T C G C C C A G C T G C C C G G C G A G A A G A A C G G C C T G T T C G G C A A C C T G A T C G C C C T G T C C C T G G G C C T G A C C C C A A C T T C A A G T C C A A C T T C G A C C T G G C C G A G A C G C C A A G C T G C A G C T G T C C A A G G A C A C C T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T G G C C C A G A T C G G C G A C C A G T A C G C C G A C C T G T T C C T G G C C G C C A A G A A C C T G T C C G A C G C C A T C C T G C T G T C C G A C A T C C T G C G G G T G A A C A C C G A G A T C A C C A A G G C C C C C T G T C C G C C T C C A T G A T C A A G C G G T A C G A C G A G C A C C A C C A G G A C C T G A C C C T G C T G A A G G C C C T G G T G C G G C A G C A G C T G C C C G A G A A G T A C A A G G A G A T C T T C T T C G A C C A G T C C A A G A A C G G C T A C G C C G G C T A C A T C G A C G G C G G C C T C C C A G G A G G A G T T C T A C A A G T T C A T C A A

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 9 6】

GCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGAGGACCTGCTGCGGAAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCTCCA TCCCCAACAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGCGGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCCCTGAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGCA ACTCCCCGTTCCCGTGGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCAACCC CTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAAGGCGCTCCGCCAGTCCCTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAAAGAGAAAGTGC TGCCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCCGTGTACAACGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATCGGGAAGCCGCTTCCTG TCCGGCGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACC GGAAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCC TCCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACT TCCTGGAACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGAC CCTGACCCCTGTTCCAGGACCCGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCCACTGTTTCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGC GGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCGTGAAGTCCGACGGC TTCGCCAACCGGAACCTTCATGCACTGATCCACGAGACTCCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCT GCACGAGCACATCGCCAAACCTGGCCGGCTCCCCCGCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 9 7】

GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCCAGAC CACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCGGAGCGGATGAAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGCCCGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCC GACTACGACCTGGACCAACATCGTCCCGAGTCTCTCTGAAGGAGCACT CCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAAGAACCGGGCAAGTC CGACAAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAATACTGG CGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAACC TGACCAAGCCGAGCGGGCGGCTGTCCGAGCTGGACAAGCCCGGCTT CATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCAAGTGGCC CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAAGCTGGTCCGA CTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAATAC CACCAAGCCCAAGACCCCTACCTGAACCCGCTGGTGGGACCCGCCCTGA TCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTACGGCGACTACAA GGGTACGACGTGCCGAAGATGATCGCCCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACCTTCTCA AGACCGAGATCACCCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAAGGCCCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGGGAC TTCCGCCACCGTGCCGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAAAGCCGAGGTGCAGACCCGGCGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCC CAAGCGGAACCTCCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 9 8】

	AAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGTCCAAGAAAGCTGAAGTCCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCCTCTCGAAGAAAC CCCATCGACTTCCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCCAGCTGGAGAACGGCCG GAAGCGGATGCTGGCCTCCGCCGGGAGCTGCAGAAAGGCAACGAGCTG GCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACTTCCCTGTACCTGGCCTCCCACTACG AGAACTGAAGGGCTCCCCGAGGACAAAGAGCAAGCAAGCTGTTCGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAG TTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGTGCTGT CCGCCACAAACAAGCACCGGGACAGCCCATCCGGGAGCAGCCCGAGAA CATCATCCACCTGTTCACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCTTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCCAAAG AGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACAGTCCATCACCGGCCGTACGA GACCCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGGGACGGCTCCGGCTCCCCC AAGAAAGCGGGAAGGTGGACGGCTCCCCCAAGAAAGCGGAAGGTGG ACTCCGGC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 3 9 9】

表 4 の低 Δ コ ド ンを使用した d C a s 9 O R F (開始コドン または終止コ ンなし、融合タ ンパク質コー ド 配列に含めるの に好適である)	G A C A A G A A A G T A C T C C A T C G G C C T G G C C A T C G G C A C C A A A C T C C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A A G T G C C C T C C A A G A A G T T C A A A G T G C T G G G C A A C A C C G A C C G G C A C T C C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G T T C G A C T C C G G C G A G A C C G C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C G G A C C G C C C G G C G G T A C A C C G G C G G A A G A A C C G G A T C T G C T A C C T G C A G G A G A T C T T C T C C A A C G A G A T G G C C A A G T G A C G A C T C C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G T C C T T C C T G G T G G A G G A G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T C G G C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A G A A G T A C C C A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C T C C A C C G A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C C C A C A T G A T C A A G T T C C G G G C C A C T T C C T G A T C G A G G G C G A C C T G A A C C C G A C A A C T C C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A T C C A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A C C C C A T C A A C G C C T C C G G C T G G A C G C C A A G G C C A T C C T G T C C G C C C G G C T G T C A A G T C C C G G C G G C T G G A G A A C C T G A T C G C C C A G C T G C C C G G C G A A A G A A G A A C G G C C T G T T C G G C A A C C T G A T C G C C C T G T C C C T G G C C C T G A C C C C A A C T T C A A G T C C A A C T T C G A C C T G G C C G A G A C G C C A A G C T G C A G C T G T C C A A G G A C A C C T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T G G C C A G A T C G G C G A C C A G T A C G C C G A C C T G T T C C T G G C C G C A A G A A C C T G T C C G A C G C C A T C C T G C T G T C C G A C A T C C T G C G G T G A A C A C C G A G A T C A C C A A G G C C C C C T G T C C G C C T C C A T G A T C A A G C G G T A C G A C G A G C A C C A C C A G G A C C T G A C C C T G C T G A A G C C C T G G T C C G G C A G C A G C T G C C C G A G A A G T A C A A G G A G A T C T T C T T C G A C C A G T C C A A G A A C G G C T A C G C C G G C T A C A T C G A C G G C G G C C T C C C A G G A G G A G T T C T A C A A G T T C A T C A A

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 0 0】

GCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCTCCA TCCCCACACAGATCCACCTGGCGAGCTGCACGCCATCCTGGCGGGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAAACCGGGAGAAAGATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCCGGAATCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGCA ACTCCGGTTCCCTGGATGACCCGGAAAGTCCGAGGAGACCATCACCCC CTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGACAAAGGCGCTCCGCCAGTCCCTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCAACGAGAAAGTGC TGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGGTGTACAAACGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTACCGAGGGCATGCGGAAGCCCCCTTCCCTG TCCGGCGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTCAAGACCAACCC GGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCC TCCCTGGGCACCTACCAACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGACAAACGAGGAAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTCTGAC CCTGACCCCTGTTCCAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCCAACCTGTTCCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGGC GGTACACCGGCTGGGCGCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAAGTCCGACGGC TTCCGCCAAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCT GCACGAGCACATCGCCCAACCTGGCCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 0 1】

GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCAGAC CACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCCAATCCTGAAGGAGCAACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACTCTACTGCTGCAGAA CGGCCGGACATGTACGTGGACCAAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCC GACTACGACGTGGACGCCATCGTGCCCGAGTCCTTCTGAAGGACGACT CCATCGACAAACAAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAAGAACCGGGGCAAGTC CGACAAAGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAAGAACTACTGG CGGCAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTGGACAAAC TGACCAAGCCCGAGCCGGGGCGGCTGTCCGAGCTGGACAAAGCCCGCTT CATCAAGCCGACGTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAAACGACAAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAAGCTGGTGCCGA CTCCGGAAAGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTAC CACCAAGCCACGACGCCCTACCTGAAGCCCGTGGTGGCACCGCCCTGA TCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCCGTGTACGGCGACTACAA GGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGTCCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCACCCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAAACATCATGAACCTCTTCA AGACCGAGATCAACCTGGCCAAACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGCCGGGAC TTCGCCACCCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAAAGACCGAGGTGCAGACCGGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCC CAAGCGGAACCTCCGACAAAGCTGATCGCCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 0 2】

	AAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCCACCCTGGCCCTACTCCGTGCTGG TGGTGGCCAAAGTGGAGAAAGGCAAGTCCAAAGAAAGCTGAAGTCCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGAGCGGTCCCTTCGAGAAAGAAC CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCCAGCTGGAGAACGGCCG GAAGCGGATGCTGGCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGCAAGGAGCTG GCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTCCCTGTACCTGGCTCCCACTACG AGAACTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAAAGAGCAGAAAGCTGTTCGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAG TTCTCCAAAGCGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAAGTGTGT CCGCCACAAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAA CATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCCTTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAAGCGGTACACCTCCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCTGTATCCACCAAGTCCATCACCGGCTGTACGA GACCCGGATCGAACCTGTCCCAAGCTGGGCGGCGAGCGGGCTCCCCC AAGAAAGCGGAAGGTG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 0 3】

表 4 の低 A コド ンを使用した d C a s 9 OR F (NLS な し、および開始 コドンまたは終 止コドンなし、 融合タンパク質 コード配列に含 めるのに好適で ある)	G A C A A G A A G T A C T C C A T C G G C C T G G C C A T C G G C A C C A A C T C C G T G G C C T G G C C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A A G G T G C C C T C C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G C A A C A C C G A C C G G C A C T C C A T C A A G A A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G T T C G A C T C C G G C G A G A C C G C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C G G A C C G C C C G G G G G T A C A C C G G C G G A A G A A C C G G A T C T G C T A C C T G C A G G A G A T C T T C T C C A A G A G A T G G C C A A G G T G G A C G A C T C C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G T C C T T C C T G G T G G A G G A G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T C G G C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A G A A G T A C C C A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C T C C A C C G A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C C C A C A T G A T C A A G T T C C G G G C C A C T T C C T G A T C G A G G G G A C C T G A A C C C C G A C A A C T C C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A T C C A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A A C C C C A T C A A C G C C T C C G G C G T G G A C G C C A A G G C C A T C C T G T C C G C C G G C T G T C C A A G T C C C G G C G G C T G G A G A A C C T G A T C G C C C A G C T G C C C G C G A G A A G A A A C G G C C T G T T C G G C A A C C T G A T C G C C C T G T C C C T G G C C T G A C C C C C A A C T T C A A G T C C A A C T T C G A C C T G G C C G A G G A C G C C A A G C T G C A G C T G T C C A A G G A C A C C T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T G G C C A G A T C G G C G A C C A G T A C G C C G A C C T G T T C C T G G C C G C C A A G A A C C T G T C C G A C G C C A T C C T G C T G T C C G A C A T C C T G C G G G T G A A C A C C G A G A T C A C C A A G G C C C C C T G T C C G C C T C C A T G A T C A A G C G G T A C G A C G A G C A C C A C C A G G A C C T G A C C C T G C T A A G G C C C T G G T G C G G C A G C A G C T G C C C G A G A A G T A C A A G G A G A T C T T C T T C G A C C A G T C C A A G A C G G C T A C G C C G G C T A C A T C G A C G G C G G C C T C C C A G G A G G A G T T C T A C A A G T T C A T C A A

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 0 4】

	GCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCAACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCTCCA TCCCCACCAAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCCCTGAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGCA ACTCCCGGTTCCGCTGGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCC CTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAAGGCGCCTCCGCCACAGTCCTTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGTGC TGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAAACGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGGGGAAGCCCCCTTCCTG TCCGGGAGCAGAAAGAGGCATCGTGGACCTGCTGTTCAAAGACCAACC GGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCC TCCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCGTGACAAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGTGAC CCTGACCCCTGTTTCGAGGACCCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCCAACCTGTTCCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGGC GGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGACGGC TTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGGACTCCCT GCACGAGCACATCGCCAAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAGGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 0 5】

GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCAGAC CAACCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCGGAGCGGATGAAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGCGGGACATGTACGTGGACACGAGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCC GACTAGGACGTGGACGCCATCGTGCCCCAGTCCCTTCCAGAGGAGACT CCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAAGAACCGGGCAAGTC CGACAAAGTGCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAATACTGG CGGAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAACC TGACCAAGGCCGAGCGGGGGGGCCCTGTCCGAGCTGGACAAAGCCCGCTT CATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAAGCTGGTGCCGA CTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAATACTAC CACCAAGCCCAAGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCAACGCCCTGA TCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTCCGAGTTCCGTACGGCGACTACAA GGTGACGACGTGCGGAAGATGATCGCCCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACTCCAAACATCATGAACCTCTTCA AGACCGAGATCAACCTGGCCACCGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGCCCCGGGAC TTCGCCACCGTGCCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAAGACCGAGGTGCAGACCGGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCC CAAGCGAACTCCGACAAAGCTGATCGCCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 0 6】

	AAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAAGAAAGCTGAAGTCCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCCTTCGAGAAAGAAC CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCCAGCTGGAGAAACGGCCG GAAGCGGATGCTGGCCCTCCCGCGGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTG GCCCTGCCCTCCAAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCTCCCACTACG AGAACTGAAGGGCTCCCCGAGGACACGAGCAGAAAGCAGCTGTTCGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAG TTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAAGTGCTGT CCGCCATACAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAA CATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCCTTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCTGATCCACCAAGTCCATCCCGGCTGTACGA GACCCGGATCGAACCTGTCCCAAGCTGGCGGGGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 0 7】

2つのC末端N LS配列を有す る、表4の低A コドンを使用し たdCas9 ORF（開始コ ドンまたは終止 コドンなし、融 合タンパク質コ ード配列に含め るのに好適であ る）	GACAAAGAAAGTACTCCATCGGCCCTGGCCATCGGCACCAACTCCGTGGGCT GGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGGTGCCCTCCAAAGAAAGTTCAAGGT GCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAAGAACTGATCGGGCGCC CTGCTGTTGGAATCGGCTCGGCGAGACCGCGAGGCCACCGGCTGAAGCGGA CCGCCCGGGGGGTACACCGCGGGAAGAAACCGGATCTGCTACCTGCA GGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAAGTGGACGACTCCTTCTTCCAC CGGCTGGAGGAGTCTCTCTGTGGAGGAGGACAAAGAACACGAGCGGC ACCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACCAAGAAAGTA CCCCACCATCTACCACTCGGGAAGAAAGTGGTGGACTCCACCGACAAAG GCCGACCTGGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAATGATCAAGTTCC GGGGCCACTTCTGATCGAGGGGACCTGAACCCCGACAACTCCGACGT GGACAAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTGACAGACCTACAAACAGCTGTTCCGAG GAGAACCCCATCAACGCCCTCGGCGTGGACGCCAAAGGCCATCCTGTCCG CCCGGCTGTCCAAAGTCCCGCGGCTGGAGAACTGATCGGCCAGCTGCC CGGCGAGAAAGAAACGGCCCTGTTGGCAACCTGATCGGCCCTGTCCTG GGCTGACCCCAACTCAAGTCCAACCTCGACCTGGCCGAGACGCCA AGCTGCAAGCTGTCCAAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACTGCT GGCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAAGAAC CTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCGACATCCTGCGGTGAACACCGAGA TCACCAAGGCCCCCTGTCCGCCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCA CCACCAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGACGAGCTGCCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGTCCAAAGAACGGCTACGCCG GCTACATCGACGGCGGCCCTCCACAGGAGGAGTTCTACAAGTTCAATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 0 8】

GCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGAGGACCTGCTGCGGAAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCTCCA TCCCCAACCAAGATCCACCTGGCGGAGCTGCACGCCCATCCTGCGCGGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCCCTGAAGGACAAACCGGAGAAAGATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACCTGGGCCCCCTGGCCCCGGGCA ACTCCCCGTTCCCTTGGATGACCCCGAAGTCGGAGGAGACCATCAACCC CTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAAGGCGCTCCGCCAGTCCCTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGTGC TGCCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAAAGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGGGGAAGCCGCCCTTCCTG TCCGGCGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACC GGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCACCGCC TCCCTGGGCACCTACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACT TCCTGGACAAGGAGAGAACGAGACATCCTGGAGGACA'TCGTGTGAC CCTGACCCCTGTTCCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCCCACCTGTTTCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGGC GGTACACCGGCTGGGGCCCGCTGTCCCGAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCGTGAAGTCCGACGGC TTCGCCAACCGGAAC'TTCA'TGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAAGGCCAGGTGTCCGGGCCAGGGCGACTCCCT GCACGAGCACATCGCCAACTGGCCCGCTCCCCCGCCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 0 9】

GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACAGAC CACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCAACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACTCTACTACCTGCAGAA CGGCCGGGACATGTACCTGGACACGAGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCC GACTACGACGTGGAACGCCATCGTGGCCCAAGTCCTTCCCTGAAGGACGACT CCATCGACAAACAAGTGTGACCCGGTCCGACAAAGAACCGGGCAAGTC CGACAAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAAGAACTACTGG CGGCAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAACC TGACCAAGGCCGAGCGGGGGGGCCCTGTCCGAGCTGGACAAGCCCGGCTT CATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCAACCAAGCACGTTGGCC CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAAGCTGGTGTCCGA CTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGTGCGGGAGATCAACAACTAC CACCAACCCACGACGCCCTAGCTGAACGCCGTGGTGGGCACGCCCTGA TCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTACGGCGGACTACAA GGTGTACGACCGTGCAGAAAGATGATCGCCCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACCTCTCA AGACCGAGATCACCTGGCCACGCGGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGGGAC TTCGCCACCGGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAGACCGGAGGTGCAGACCCGGGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCC CAAGCGGAACTCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 1 0】

	AAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGTCCAAAGAAAGCTGAAGTCCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCCTTCGAGAAAGAAC CCCATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCG GAAGGGATGCTGGCCTCCGCCCGGCGAGCTGCAGAAAGGCAACGAGCTG GCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACTGGCCTCCCACTACG AGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAAAGAGCAGAAAGCAGCTGTTCTGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAG TTCTCCAAAGCGGTGATCCTGGCCGACGCCCAACCTGGACAAGGTGCTGT CCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGAGCAGGCCGAGAA CATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCCTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCTGATCCACAGTCCATACCGGCCCTGTACGA GACCGGATCGAACCTGTCCAGCTGGCGGGGAGCGCTCCGGCTCCCCC AAGAAAGAGCGGAAGGTGGACGGCTCCCCCAAGAAAGCGGAAGGTGG ACTCCGGC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 1 1】

2つのC末端N LS配列を有す る、表4の低A ／Uコドンを使 用したCas9 ORF（開始コ ドンまたは終止 コドンなし、融 合タンパク質コ ード配列に含め るのに好適であ る）	GACAAAGAAAGTACAGCATCGGCCCTGGACATCGGCACCAACACAGCGTGGGCT GGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGTGCCCGACGCAAGAAAGTTCAAGGT GCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGCGCC CTGCTGTTCCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA CCGCCGGCGCGGTACACCGCGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCA GGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTGAGGAGGACAAAGACGAGCGGC CGGCTGGAGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAAGACGAGCGGC ACCCCATCTTCGGCAACATCGTGACGAGGTGGCTACCAAGAGAAAGTA CCCCACCATCACCACTGCGGGAAGAAAGCTGGTGGACAGCACCGACCAAG GCCGACCTGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCC GGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAACAGCGACGT GGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGACAGCCTACAACAGCTGTTCCGAG GAGAACCCCATCAACGCCAGCGCGGTGGACGCCCAAGGCCATCCTGAGCG CCGGCTGAGCAAGAGCGCGCGGTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCC CGGCGAAGAAAGAACGGCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCCTG GGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCA AGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACTGCT GGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGCGCGCCAAAGAAC CTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAAACCCGAGA TCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCA CCACAGGACCTGACCCCTGCTGAAGGCCCTGGTCCGGCAGCAGCTGCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGCAAGAACGGCTACGGCG GCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAAGTTTCATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 1 2】

GCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGAGGACCTGCTGCGGAAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCAGCA TCCCCAACCAAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGCGGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCCCTGAAGGACAAACCGGAGAAAGATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCGGGATCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGCA ACAGCCGGTTCCCTGGATGACCCGGAAGAGGAGGAGACCATCAACCC CTGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCCCAAGCGCCAGAGCTTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGTGC TGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGGTACAAACGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGGGGAAGCCGGCTTCCTG AGCGCGAGCAGAAAGAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACC GGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCC AGCCTGGGCACTACCAAGACCTGTCTGAAGATCATCAAGGACAAAGACT TCCCTGGACAAAGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGTGAC CCTGACCCCTGTTCCAGGACCGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCCCACCTGTTTCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGGC GGTACACCGGCTGGGCGCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAGCAGAGCGGCAGAAGCCATCCTGGACTTCCCTGAAGGCGGAGGC TTCGCCAACCCGGAACCTTCATGCAAGCTGATCCACGACAGCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGCCGACAGCCT GCACGAGCACATCGCCAAACCTGGCCGGCAGCCCCCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 1 3】

GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCAGAC CACCCAGAAAGGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGCCGGGACATGTACGTGGACACAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGC GACTACGACGTGGACACACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCCAAGAG CGACAACTGTGCCACGCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGTGAAGAACTACTGG CGGCAGCTGCTGAACGCCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCCGACAAAC TGACCAAGCCGAGCGGGCGGGCCCTGAGCGAGCTGCACAAGCCGGCTT CATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGGAGATCACCAAGCACCGTGGCC CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACACAAAGTACGACGAGAACGACCAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGA CTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTAC CACACGCCCAAGAGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGCCACGCCCTGA TCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTACAA GGTGACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGAGCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTCTACAGCAACATCATGAACCTCTTCA AGACCGAGATCACCCCTGGCCAAAGCGGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTTGGGACAAAGGCGGGAC TTCCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAAAGACCGGAGGTGCCAGACCGGGCGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCC CAAGCGGAACAGCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 1 4】

	AAGAAGTACGGCGGGCTTCGACAGACCCCAACCGTGGCCTACAGCGTGCCTGG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGGTGAA GGAGCTGCTGGGCCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAAGAAC CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCCAGCTGGAGAACGGCCCG GAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGGAGCTGCAGAAGGCCAACGAGCTG GCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCCCTGTACCTGGCCAGCCACTACG AGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACACAGCAGAACGACAGCTGTTCGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAG TTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGAGCGCCAACTGGACAAGGTGCTGA GGCCCTACAAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAA CATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGCGCCCGCCGCGCTTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAAGCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCTGATCCACAGAGCATCACCGGCTGTACGA GACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGGGAGCGGACGGGAGCCCC AAGAAAGAAGCGGAAGGTGGACGGGAGCCCCAAGAAAGACGGAAGGTGG ACAGCGGC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 1 5】

表 4 の低 A/U コドンを使用し た Cas 9 O RF (NLS な し、および開始 コドンまたは終 止コドンなし、 融合タンパク質 コード配列に含 めるのに好適で ある)	GACAAAGAAAGTACAGCATCGGCCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCT GGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGGTGCCAGCAAGAAAGTTCAAAGGT GCTGGGCACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGCGGCC CTGCTGTTCCACAGCGCGGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA CCGCCCGCGCGGTACACCCGGCGGAGAAACCGGATCTGCTACCTGCA GGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGGTGGACGACAGCTCTCTCCAC CGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAAGACGACGCGGCC ACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACCAAGAGAAAGTA CCCCACCATCTACCACTGCGGAAAGAAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAAG GCCGACCTGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCC GGGCCCACTTCCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAACAGCGACGT GGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACAGCTGTTGAG GAGAACCCCATCAACGCCAGCGCGGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCG CCCGGCTGAGCAAGAGCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCTGCC CGCGAGAAAGAAACGGCCCTGTTCCGCCAACCTGATCGCCCTGAGCCTG GGCTGACCCCAACTCAAGAGCAACTTCGACCTGCCCGAGGACGCCA AGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACTGCT GGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGCGCCCAAGAAC CTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAAACACCGAGA TCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCA CCACAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGCAGCAGCTGCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGACAGAACGGCTACGCCG GCTACATCGACCGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCAATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 1 6】

	GCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCAACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGAGGACCTGCTGCGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCAGCA TCCCCACCCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCCCTGAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCCGGATCCCTACTAGCTGGGCCCCCTGGCCCCGGGCA ACAGCCGGTTCGCCCTGGATGACCCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCC CTGGAAC TTCGAGGAGGTGGTGACAAAGGGCGCCAGCGCCCCAGAGCTTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGGTGC TGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAAAGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCCGAAGCCCCCTTCCTG AGCGGCGAGCAGAAAGAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAAGACCAACC GGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCACCGCC AGCCTGGGCACCTACCAAGCAGCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGACAAACGAGAGAAAGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGTGAC CCTGACCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCCAACCTGTTTCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGGC GGTACACCGGCTGGGCGCGGCTGAGCCGGGAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAAGCAGAGCGGCAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGC TTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCT GCACGAGCACATCGCCAACTGGCCCGGACGCCCGCCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 1 7】

GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCCAGAC CACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGCCCGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGC GACTACGACGTGGACCAACATCGTCCCAAGAGCTTCCCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCCGAGCGACAAAGAACCGGGCAAGAG CGACAAACGTGCCCAAGGAGGAGGTGGTGAAGAAAGTGAAGAACTACTGG CGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAACC TGACCAAGCCGAGCGGGCGGCTGAGCGAGCTGGACAAGCCCGGCTT CATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGCTGGCC CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGA CTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTAC CACCAAGCCCAAGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGACCCGCCCTGA TCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTACAA GGTGACGACGTGCCGAAGATGATCGCCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTCA AGACCGAGATCACCCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGAACGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGGGAC TTCCGCCACCGTGCCGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAAACCGAGGTGCAGACCCGGCGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCCTGCC CAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 1 8】

	AAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCCTACAGCGTGCTGG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGAGCAAGAGCTGAAGAGCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAGAAC CCCATCGACTTCCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAAGAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCCAGCTGGAGAACGGCCG GAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAGGGCAACGAGCTG GCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTTCCGTGTAACCTGGCCAGCCACTACG AGAACTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAAGAGCAAGAGCAGCTGTTCTGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAG TTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAAGTCTGA GGCCCTACAACAAGCAAGCGGACAAAGCCATCCGGGAGCAGGCCAGAA CATCATCCACCTGTTCACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGGCTTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACCCAGCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACAGAGCATCACCGGCCCTGTACGA GACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGGGGGGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 1 9】

表4の低A/U コドンを使用し たCas9ニッ カーゼORF (開始コドンま たは終止コドン なし、融合タン パク質コード配 列に含めるのに 好適である)	GACAAGAAAGTACAGCATCGGCCCTGGCCATCGGCCACCAACAGCGTGGGCT GGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGGTGCCAGCAAGAAAGTTCAAAGGT GCTGGGCACACCGACCGGCACAGCATCAGAAAGAAACCTGATCGGGCCC CTGCTGTTGACACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA CCGCCCGCGCGGTACACCCCGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCCA GGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTTGGACGACAGCTTCTTCCAC CGGCTGGAGGAGAGCTTCTCTGTTGAGGAGGACAAAGAAACGACGAGCGGC ACCCCATCTTCGGCACAATCGTGGACGAGGTGGCTTACCACGAGAAAGTA CCCCACCATCTACCACCTGGCGAAGAAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAAG GGCGACCTGGCGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCC GGGCCAATCTCTGATCGAGGCGACCTGAACCCGACACACAGCGACGT GGACAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTTCCGAG GAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCG CCCGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCC CGCGGAGAGAAAGAACGGCTGTTGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCCTG GGCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCA AGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACTGCT GGCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTCGCCGCCAAGAAC CTGAGCGACGCCATCTCTGCTGAGCGACATCTCTGGGGTGAAACCGAGA TCAACCAAGGCCCTCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCA CCACCAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGTTGGCGCAGCAGCTGCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCCAGAGCAAGAACGGCTACGCCG GCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCAATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 2 0】

	GCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCAGCA TCCCCACCAAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGCGGCA GGAGGACCTTCAACCTTCCCTGAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCCGGATCCCTACTACCTGGGCCCTTGGCCCCGGGGCA ACAGCCCGGTTCCCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCC CTGGAACCTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGGCCAGAGCTTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGTGC TGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCTGTACAAACGAGCT GACCAAGGTGAAGTACCTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCCCTTCCCTG AGCGCGGAGCAGAAAGAGGCCATCCTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACC GGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGA GTGCTTCGACACGCTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCC AGCCTGGGCACCTACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCCTGCTGAC CCTGACCCCTGTTCCAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCCAACCTGTTTCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGGC GGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAAGCAGAGCGGCAGAACCATCCTGGACTTCCCTGAAGAGCGACGGC TTCGCCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCAGGTGAGCGGCCAGGCCAGAGCCT GCAGGAGCACATCCCAACCTGGCCGGCAGCCCGCCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 2 1】

GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACAGAC CACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAGAAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCCTGTACTACCTGCAGAA CGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGC GACTACGACGTGGACCAACATCGTGCCCAAGAGCTTCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAAGGTGCTGACCCGAGAGCAAGAACCCGGGCAAGAG CGACAACTGTCCAGCGAGGAGGTGTGAAGAAAGTGAAGAACTACTGG CGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCCGACAAAC TGACCAAGCCCGAGCGGGCGGCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTT CATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCGGGCAGATCAACCAAGCAAGTGGCC CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACCAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGA CTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCCGGGAGATCAACAACTAC CACCAAGCCCAAGAGCCCTACCTGAACGGCGTGGTGGGCACCGCCCTGA TCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGGACTACAA GGTGTAACGACGTGCGGAAGATGATCGCCCAAGAGCGAGAGATCGGC AAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCTCA AGACCGAGATCACCTGGCCAAAGCGGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGGGCAGATCTGTGTGGACAAAGGGCCGGGAC TTCCGCCACCGTGGGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAAGACCGAGGTGCAGACCGCGGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCC CAAGCGGAACAGCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 2 2】

	AAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGG TGGTGCCCAAGGTGGAGAAAGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAAGAAC CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAAGGAGGTGAAGAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCCAAGTACAGCCCTGTTCCAGCTGGAGAACGGCCG GAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCAGCTGCAGAAAGGCAACGAGCTG GCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACG AGAACTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAACGAGCAGAAAGCAGCTGTTCGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAG TTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGCCACAAAGTGCTGA GGCCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAA CATCATCCACCTGTTTCAACCTGACCAACCTGGGGCCCCCGCGCCTTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCCGGAAGCGGTACACCAAGCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCCTGTACGA GACCCGGATCGAACCTGAGCCAGCTGGGGGGCGACGGCGGGCGAGCCCC AAGAAAGCGGGAAGGTG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 2 3】

2 つの C 末端 N LS 配列を有す る、表 4 の低 Δ ／U コドンを使 用した Cas 9 ニックアーゼ OR F（開始コドン または終止コド ンなし、融合タ ンパク質コード 配列に含めるの に好適である）	GACAAAGAAGTACAGCATCGGCCCTGGCCATCGGCACCAACAGCGTGGGCT GGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCGCCAGCAAGAAGTTCAAGGT GCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGCCGCC CTGCTGTTCTGACAGCGGCGAGACCGCGGAGGCCACCGGCTGAAGCGGA CCGCCCGGGGGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCA GGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCAC CGGCTGGAGGAGAGCTTCTGCTGGAGGAGGACAAAGAAGCACGAGCGGC ACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCTACCAAGGAAAGTA CCCCACCATCTACCACTGCGGGAAGAAAGCTGGTGGACAGACCGACAAAG GGCGACCTGGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAACATGATCAAGTTCC GGGGCCACTTCCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGT GGACAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTTCCGAG GAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCTCTGAGCG CCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCTGCC GGCGAGAAAGAAAGAACGGCCCTGTTGGCAACCTGATGGCCCTGAGCCCTG GGCTGACCCCAACTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCA AGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT GGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGCGCGCCAAAGAAC CTGAGCGACGCCATCTCTGCTGAGCGACATCTCTGGGGTGAAACCGGAGA TCACCAAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCA CAACGAGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGGTGGCGAGCAGCTGCCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGAGCTACGCGG GCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCAATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 2 4】

GCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCCGAGGAGCTGCTGGTGAAAGCTG AAACGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAAGGCAGCA TCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAAGGACAAACGGGAGAAAGTCGAGAAAG ATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGCA ACAGCCGGTTCCGCTGGATGACCCGGAAGACGAGGAGACCA'TCACCCC CTGGAAC'TTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGCGCCACGCGCCAGAGCTTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGGAAGGTGC TGCCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAAACGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATCGGGAAGCCGCTTCCTG AGCGCGGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACC GGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGAGGACCCGTTCAACGCC AGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGACAAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGAC CCTGACCCCTGTTCCAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCCACCTGTTCCAGCAGCAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGC GGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAGCAGAGCGGCAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGGACGGC TTCGCCAACCGGAAC'TTCATGCAGCTGATCCACGACGAGCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCCGACAGCCT GCACGAGCACATCGCCAAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 2 5】

GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGAC CACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACAGCCCGGAGCGGATGAAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACTCTACTGACAGAA CGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGC GACTAGGACGTGGACCAACATCGTGCCCCCAGAGCTTCCCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAAGAACCGGGCCAAAGAG CGACAAAGTGTGCCCAAGCGAGGAGGTGGTGAAAGAAAGTGAAGAACTACTGG CGGCAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTGGAACAACC TGACCAAGGCCGAGCGGGGGGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTT CATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC CAGATCCTGGACAGCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGA CTCCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTAC CACCAAGCCCAAGCAGCCCTACCTGAAGCCCGTGGTGGGCAAGCCCTGA TCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTACAA GGGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGAGCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTCTACAGCAACATCATGAACCTCTTCA AGACCGAGATCAACCTGGCCACCGCGGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGGGAC TTCCGCCAACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCCGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCC CAAGCGGAACAGCGACAAAGCTGATCGCCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 2 6】

	AAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCTACAGCGTGCTGG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGAGCAAGAGCTGAAGAGCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAAGAAC CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGGCTGTTCCAGCTGGAGAAAGGCCG GAAGCGGATGCTGGCCAGGCCGCCGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAGCTG GCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCCGTACCTGGCCAGCCACTACG AGAACTGAAGGCGAGCCCCGAGGACAAAGAGCAGAAAGCAGCTGTTCTGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAG TTCAGCAAGCGGTGATCCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGTGCTGA GGCCCTACAACAAGCACCGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAA CATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCCTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACAGCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACAGAGCATCACCGGCTGTACGA GACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGCGGGGACGGCAGCGGCAGCCCC AAGAAAGACCGGAAGGTGGACCGGCAGCCCCAAGAAAGCGGAAGGTGG ACAGCGGC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 2 7】

表4の低A/U コドンを使用し たCas9ニッ カーゼORF (NLSなし、 および開始コ ドンまたは終 止コドンなし、 融合タンパク 質コード配 列に含める のに好適であ る)	GACAAAGAAGTACAGCATCGGCCCTGGcCATCGGCACCAACAGCGTGCGCT GGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAAGTTCAAGGT GCTGGGCAACACCGACCGGCCACAGCATCAAGAAAGAACTGATCGGCC CTGCTGTTCCGACAGCGGGGAGACCGCCGAGGCCACCGGCTGAAGCGGA CCGCCCGCGCGGTACACCCCGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCA GGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCAC CGGCTGGAGGAGAGCTTCTGTTGAGGAGGACAAAGAACGACGCGGC ACCCCATCTTCGGCAACATCTGTTGACGAGGTGGCTACCAAGAGAAATA CCCCACCATCTACCACTGCGGAAGAAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAAG GCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGCCCCCTGCCCAACATGATCAAGTTCC GGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAACGACGCT GGACAAAGCTGTTCTATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTTCCGAG GAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCG CCGGCTGAGCAAGAGCCCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCC CGCGAGAAAGAAACGGCCCTGTTCCGCCAACCTGATCGCCCTGAGCCCTG GGCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGACGCCA AGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACTGCT GGCCAGATCGGCGACCACTACGCCGACCTGTTCTGCGCCCAAGAAC CTGAGCGACGCCATCTGCTGAGCGACATCTGCGGGTGAACACCGAGA TCACCAAGGCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCA CCACCAAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGTTGCGGCAAGCACTGCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGCAAGAACGGCTACGCCG GCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGATTTCTACAAGTTCTACAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 2 8】

	GCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGAGGACCTGCTGCGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCAGCA TCCCCACCCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGCGGCCA GGAGGACTTCTACCCCTTCCCTGAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCGGGATCCCCTACTAGGTGGCCCCCTGGCCCCGGGCA ACAGCCGGTTCGCCCTGATGACCCGGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCC CTGGAAC TTCGAGGAGGTGGTGACAAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGGTGC TGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAAACGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCCCTTCCTG AGCGCGAGCAGAAAGAGGCCATCGTGACCTGCTGTTCAAAGACCAACC GGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGCGGTGGAGGACCGGTTCAACGCC AGCCTGGGCACCTACCAAGCCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCCTGACAAACGAGGAGAAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGTGAC CCTGACCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCCCACCTGTTCCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGGC GGTACACCGGCTGGGCGCGGCTGAGCCGGGAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAAGCAGAGCGGCAGAACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGC TTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAAGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCCGACAGCCT GCACGAGCACATCGCCAACTGGCCCGGCGAGCCCCCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 2 9】

GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCCAGAC CACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGCCGGACATGTACCTGGACCCAGGAGCTGGACATCAACCCGGCTGAGC GACTACGACGTGGACCAATCGTGTCCCAAGACTTCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCCGAGCGACAAGAACCCGGGGCAAGAG CGACAAAGTGTCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAATACTGG CGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAAGTTCCGACAAAC TGACCAAGCCGAGCGGGCGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAGCCCGCTT CATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACCTGGCC CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGA CTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTAC CACCAAGCCCAAGACCTACCTGAACCCCTGGTGGGCACCCCTGA TCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTACAA GGTGTAAGACCGTGCCGGAAGATGATCGCCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTACAGCAACATCATGAACCTCTCA AGACCGAGATCACCTGGCCACCGCGAGATCCGGAAAGCGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGGGAC TTCCGCCACCGTGCCGAAAGTTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAGACCGGAGGTGCAGACCCCGCGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCC CAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 3 0】

	AAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAAGAAC CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAAGGAGGTGAAGAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCCAGCTGGAGAAACGGCCG GAAGCGGATGCTGGCCAGCCCGCGGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAGCTG GCCCTGCCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACG AGAAAGCTGAAGGGCAGCCCGAGGACAAACGAGCAAGAACAGCTGTTCCGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAG TTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGA GGCCCTACAACAAGCACCGGACAAAGCCATCCGGAGCAGCCGAGAA CATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGCGCCCGCCGCTTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAAGCGGTACACCAGCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCCTGTACGA GACCCGGATCGAACCTGAGCCAGCTGGCGGGGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 3 1】

表 4 の低 A/U コドンを使用し た d C a s 9 ORF (開始コ ドンまたは終止 コドンなし、融 合タンパク質コ ード配列に含め るのに好適であ る)	G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G C C T G G C C A T C G G C A C C A A C A G C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A A G G T G C C C A G C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A C C G G C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G T T C G A C A G C G G C G A G A C C G C G A G G C A C C C G G C T G A A G C G G A C C G C C C G G C G G T A C A C C G G C G G A A G A A C C G G A T C T G C T A C C T G C A G G A G A T C T T C A G C A A C G A G A T G G C C A A G G T G G A C G A C A G C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G A G C T T C C T G G T G G A G G A G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T C G G C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A A G T A C C C A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C A G C A C C G A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G C C C C T G G C C C A C A T G A T C A A G T T C C G G G C C A C T T C C T G A T C G A G G G C G A C C T G A A C C C G A C A A C A G C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A T C C A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A C C C C A T C A A C G C C A G C G G C G T G G A C G C C A A G G C C A T C C T G A G C G C C C G G C T G A G C A A G A G C C G G C G G C T G G A G A A C C T G A T C G C C C A G C T G C C C G G C G A G A A G A A G A A C G G C C T G T T C G G C A A C C T G A T C G C C C T G A G C C T G G G C C T G A C C C C A A C T T C A A G A G C A A C T T C G A C C T G G C C G A G A C G C C A A G C T G C A G C T G A G C A A G A C A C C T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T G G C C A G A T C G G C G A C C A G T A C G C C G A C C T G T T C C T G G C G C C A A G A A C C T G A G C G A C G C C A T C C T G C T G A G C G C A C A T C C T G C G G T G A A C A C C C G A G A T C A C C A A G G C C C C C T G A G C G C C A G C A T G A T C A A G C G G T A C G A C G A G C A C C A C C A G G A C C T G A C C C T G C T G A A G C C C T G T C G G G C A G C A G C T G C C C G A G A A G T A C A A G G A G A T C T T C T T C G A C C A G A G A A A C G G C T A C G C C G G C T A C A T C G A C G G C G G C C A G C C A G G A G G A G T T C T A C A A G T T C A T C A A

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 3 2】

GCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGGCAACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCAGCA TCCCCACACAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCTGTAAAGACAAACCGGGAGAAAGATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCGGGATCCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGCA ACAGCCGGTTCCGCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCC CTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGACAAAGGCGCCAGCGCCAGAGCTTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACTGCCCCAACGAGAAAGTGC TGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCCCTTCCTG AGCGCGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACC GGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCC AGCCTGGGCACCTACACGACCTGCTGAAAGTATCATAGGACAAAGGACT TCCTGGACAAACGAGGAGAAACGAGGACATCCTGAGGACATCGTGGCTGAC CCTGACCCCTGTTCCAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCCAACCTGTTCCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGGC GGTACACCGGCTGGGCCCCGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAAGCAGAGCGGCAAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAAGAGCGACGGC TTCGCCAAACCGGAACCTTCATGCAAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCT GCACGAGCACATCGCCAAACCTGGCCCCGAGCCCCGCCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 3 3】

	GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACAGAC CACCCAGAAAGGGCCAGAAAGAAACAGCCGGGAGCGGATGAAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGCCGGGACATGTACGTGGACACAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGC GACTACGACGTGGACgCATCGTGGCCAGAGCTTCCGTAAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAAGAACCGGGCAAGAG CGACAACTGTCACAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAAGAACTACTGG CGGAGCTGTCTAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCCGACAAAC TGACCAAGCCAGCGGGGGGGCTGAGCGAGCTGGACAAGCGGGCTT CATCAAGCCGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACCTGGCC CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGA CTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAATACTAC CACCAAGCCACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGCACCCGCTGA TCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTACAA GGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGAGCGAGGAGATCGGC AAGGCCACCGCCAAGTACTTCTCTACAGCAACATCATGAACCTCTTCA AGACCGAGATCACCTGGCCACCGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGACAAAGGGCCGGGAC TTGCCACCCGTGGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAAGACCGGAGGTGCAGACCGGGGGCTTCAGCAAGGAGACATCCTGCC CAAGCGGAACAGCGACAAAGCTGATCGCCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 3 4】

	AAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGAGCGGAGCAGCTTCGAGAGAGAAC CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAGGAGGTGAGAGAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCCAGCTGGAGAACGGCCG GAAGCGGATGCTGGCCAGGCCGGCCGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAGCTG GCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACCTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACG AGAAGCTGAAGGGCAGCCCGAGGACACGAGCAGAGAGCTGTTCTGT GGAGCAGCACAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAG TTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAAGTGCTGA GGCCCTACAAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAA CATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGGCCCCCGCCCTTC AAGTACTTCGACACCACTCGACCGGAAGCGGTACACCAAGCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCCGTGATCCACCAAGAGCATCACCGGCCGTGTACGA GACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGGCGGCGACGGCGGCGAGCCCC AAGAAGACCGGAAGTG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 3 5】

2 つの C 末端 N LS 配列を有す る、表 4 の低 A /U コドンを使 用した dCus 9 ORF (開 始コドンまたは 終止コドンな し、融合タンパ ク質コード配列 に含めるのに好 適である)	GACAAAGAAGTACAGCATCGGCCCTGGCCATCGGCCACCAACAGCGTGGGCT GGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGGTGCCACGCAAGAAAGTTCAAAGGT GCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGGCGCC CTGCTGTTTGGACAGCGCGGAGACCGCGGAGGCCACCGGGCTGAAAGCGGA CGGCCGGGGGGGTACACCGCGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCTGCA GGAGATCTTCAGCAACGAGATGCCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCAC CGGCTGGAGGAGAGCTTCTCTGGTGGAGGAGACAAAGACGACGCGGC ACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCCTACCAAGAGAAAGTA CCCCACCATCTACCACTGCGGGAAGAAAGCTGGTGGACAGCAACGACAAAG GGCGACCTGGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCC GGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAACAGCGACGT GGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTTGAG GAGAACCCCATCAACGCCACGCGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCG CCCGGCTGAGCAAGAGCCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCTGCC CGCGAGAAAGAAACGGCCCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCCTG GGCTGACCCCAACTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCA AGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACTGCT GGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGCGCCGCCAAGAAC CTGAGCGAGCGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGA TCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCA CCACGAGGACCTGACCCCTGCTGAAGGCCCTGGTGGGCGAGCAGCTGCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGACCGCTACGCGG GCTACATCGACCGCGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 3 6】

	GCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCAACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTG AACCGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCAGCA TCCCCACCCAGATCCACCTGGGGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCTGGAAGGACAAACGGGAGAAATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACGTGGCCCCCTGGCCCCGGCA ACAGCCGGTTCCGCTGGATGACCCGGAAAGAGCGAGGAGACCATCAACCC CTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGAACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGTGC TGCCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCGTGTACAACGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATCGGGAAGCCCCCTTCCTG AGCGCGAGCAGAAAGAGCCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACC GGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGCGGTGGAGGACCGGTTCAACGCC AGCCTGGGCACCTACCAAGACCTGCTGAAAGATCATCAAGGACAAAGACT TCCGTGACAAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGTGAC CCTGACCCCTGTTCCAGGACCCGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCACACCTGTTCCAGCACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGGC GGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAAGCAGAGCGGCAAAGACCATCCTGGACTTCTGAAAGGACGGC TTCGCCAACCCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAGCCCCAGGTGAGCGGCCAGGCCGACAGCCT GCAGGAGCACATCGCCAAACCTGGCCCGGACGCCGCCCATCAAGAGGGC ATCCTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 3 7】

GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACAGAC CACCCAGAAAGGGCCAGAAAGAACAGCCGGAGCGGATGAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAGAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGC GACTACGACGTTGGACGGCCATCGTGCCCCAGAGCTTCCCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAACCGGGGCAAGAG CGACAAAGTGTCCAGCCAGGAGGTGGTGAAAGAGATGAAGAACTACTGG CGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAAC TGACCAAGGCCGAGCGGGGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAAGCCCGCTT CATCAAGCGGCAGCTGGTGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGA CTTCCGGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGGTGCGGAGATCAACAACTAC CACCAAGCCCAAGACGGCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACGGCCCTGA TCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTACAA GGGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGAGCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTACAGCAACATCATGAACCTCTTCA AGACCGAGATCACCTGGCCCAACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGAT CGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAAGGCCGGGAC TTCCGCCACCGTGCAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAGACCGAGGTGCAGACCGGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCC CAAGCGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCCCCGGAAAGAAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 3 8】

	AAGAAGTACGGCGGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGTGG TGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAAGAAC CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAGGAGCC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCCG GAAAGGGATGCTGGCCAGCGCGGGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAGCTG GCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAAC TTCTGTACCTGGCCAGCCACTACG AGAACTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAAGAGCAGAGAGCAGCTGTTCGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAG TTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCCAACCTGGACAAAGGTGCTGA GGCCCTACAAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGCCCGAGAA CATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCCTTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAAGCACAAGG AGGTGCTGGACGCCACCTGATCCACAGAGCATCACCGGCCCTGTACGA GACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGGGGCGACGGCAGCGGCAGCCCC AAGAAAGACCGGAAGGTGGACGGCAGCCCCCAAGAAAGCGGAAGGTGG ACAGCGGC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 3 9】

表4の底A/U コドンを使用し たdCas9 ORF (NLS なし、および開 始コドンまたは 終止コドンな し、融合タンパ ク質コード配列 を含めるのに好 適である)	36 2	GACAAAGAAGTACAGCATCGGCCCTGGcCATCGGCACCAACAGCGTGCGCT GGCCGTGATCACCAGAGTACAAAGGTGCCAGCAGAAAGTTCAAGGT GCTGGCAACACCCAGCCGGCACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGCCCC CTGCTGTTCCGACAGCGGGGAGACCCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA CCGCCCGGGGGGTACACCCGGGGGAGAAACCGGATCTGCTACCTGCA GGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTGAGCGACAGCTTCTTCCAC CGGCTGAGGAGAGCTTCCCTGGTGAGGAGGACAAAGAACGACGAGCGGC ACCCCATCTTCGGCAACATCTGTGGACGAGGTGGCTACCAACGAGAAAGTA CCCCACCATCTACCACTGCGGGAAGAAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAAG GGGACCTGGGGCTGATCTAACCCTGGCCCTGGCCCAACATGATCAAGTTCC GGGGCCACTTCCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAACAGCGACGT GGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTTCCGAG GAGAACCCCATCAACGCCAGCGGGCTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCG CCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCC CGGCGAAGAAAGAACGGCCCTGTTCCGCCAACCTGATCGCCCTGAGCCCTG GGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCA AGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACTGCT GGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCGCCGCCAAGAAC CTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAAACCGAGA TCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCA CCACCAGGACCTGACCCCTGCTGAAGGCCCTGGTGGGCGAGCAGCTGCC GAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGACGGCTACGCCG GCTACATCGACCGCGGCCACAGCCAGGAGGATTCTACAAAGTTCAACAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 4 0】

GCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAAGCTG AACGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCAGCA TCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCA GGAGGACTTCTACCCCTTCCCTGAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAGAAAG ATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACGTGGCCCCCTGGCCCCGGGCA ACAGCCGGTTCGCCCTGGATGACCCGGAAGAGGAGAGACCATCACCCC CTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAAGGGGCCAGGCCCCAGAGCTTC ATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGTG TGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGGTACAAACGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCCCTTCCTG AGCGCGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACC GGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGA GTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCC AGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGAACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGAC CCTGACCCCTGTTCCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACC TACGCCCAACCTGTTCCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGGC GGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCG GGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGGCGGC TTCGCCAACCAGGAACTTCATGCAAGCTGATCCACGACGACGCTGACCT TCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCCGACAGCCT GCACGAGCACATCGCCAAACCTGGCCCGGACGCCCCCATCAAGAAAGGC ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 4 1】

GGCACAAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCAGAC CACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAG GAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGG AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCCAGAA CGCCCGGGACATGTACGTGGACCCAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGC GACTACGACGTGGACCGCATCGTGGCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAAGAACCCGGGGCAAGAG CGACAAACGTGCCCAAGGAGGAGGTGGTGAAGAAAGTGAAGAACTACTGG CGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAACC TGACCAAGCCGAGCCGGGGGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAGCCGGCTT CATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCAACCAAGCACGTGGCC CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAAGC TGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGA CTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTAC CACCAAGCCACGACGCCCTACCTGAACCCCGTGGTGGGCACCCCTGA TCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACCGCGACTACAA GGTGTACGACCGTGCCGGAAGATGATCGCCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGC AAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCTCA AGACCGAGATCACCCCTGGCCACGCGGAGATCCGGAAAGCGCCCTGAT CGAGACCCAAAGCGAGACCGGGAGATCGTGTGGGACAAAGGGCCGGGAC TTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAAAGACCGAGGTGCAGACCCGGCGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCC CAAGCGGAACAGCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 4 2】

	AAAGAGTACGGCGGCTTCGACACAGCCCCACCGTGGCCCTACAGCGTGCTGG TGGTGGCCAAAGTGGAGAAAGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTGAA GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAGAAAGAAC CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCCAGCTGGAGAACGGCCG GAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGGAGCTGCAGAAAGGCCAACGAGCTG GCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACG AGAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAAGAGCAGAGAGAGCTGTTCCGT GGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAG TTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGAGCCCAACCTGGACAAAGGTGCTGA GGCCCTACAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAA CATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCCTTC AAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAGCGGTACACCAAGCACCAAGG AGGTGCTGGACGCCACCTGTATCCACCAAGCATCACCGGCTGTACGA GACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGGGAC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 4 3】

表 4 の低 A コド ンを使用した N me Cas9 ORF (開始コ ドンまたは終止 コドンなし、融 合タンパク質コ ード配列に含め るのに好適であ る)	36 3	GCCGCCCTTCAAGCCCCAACTCCATCAACTACATCCTGGGCCCTGGACATCG GCATCGCCCTCCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGATCGACGAGGAGGAGAA CCCCATCCGGCTGATCGAACCTGGGCGTGGGGTGTTCGAGCGGGCCGAG GTGCCCAAGACCGGGGACTCCCTTGGCCATGGCCCGGGGCTGGCCCGGT CCGTGGCGGGCTGACCCGGGGGGGGGCCACCGGCTGCTGGGACCCG CCGGCTGCTGAAGCGGGAGGGCGTGTGCAGGCCGCCAACTTCGACGAG AACGGCCGTGATCAAGTCCCTGCCCAACACCCCTTGGCAGCTGGGGCCG CCGCCCTGGACCGGAAAGCTGACCCCTCGAGTGGTCCGCCGTGCTGCT GCACTGTATCAAGCACCGGGGCTACCTGTCCACGGGAAGAACGAGGGC GAGACCCCGACAAAGAGCTGGGGCCCTGCTGAAGGGCTGGCCGCCA ACGCCACGCCCTGCAGACCGGGCGACTTCGGGACCCCGCCGAGCTGGC CCTGAACAAAGTTTCGAGAAGGAGTCCGGCCACATCCGGAAACAGCGGTCC GACTACTCCCAACACTTCTCCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATCC TGCTGTTTCGAGAAGCAGAAAGAGTTCGGCAACCCCACTGTCGGCGG CCTGAAGGAGGGCATCCAGACCTGCTGTATGACCCAGCCCGCCCTG TCCGGCGACCGGTGCAGAAAGTGTGGGCCACTGCACCTTCGAGCCCG CCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCCCGGAGCGGTTCATCTG GCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGAGAGCAGGGCTCCGAGCGG CCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCTGTATGGACGAGCCCTACCGGA AGTCCAAAGCTGACCTACGCCCAGGCCCGGAAGCTGCTGGGCCCTGGAGGA CACCGCCCTTCTTCAAGGCCCTGCGGTACGGCAAGGACAAACCGGAGGCC TCCACCCCTGATGGAGATGAAGGCCACCAAGCCATCTCCCGGGCCCTGG AGAAAGGAGGGCCCTGAAGGACAAAGAAAGTCCCCCTGAACCTGTCCCCCGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 4 4】

	GCTGCAGGACGAGATCGGCACCGCCTTCTCCCTGTTCAGACCGACGAG GACATCACCGGCCGGCTGAAGGACCGGATCCAGCCCGAGATCCTGGAGG CCCTGCTGAAGCACATCTCCTTCGACAAAGTTCTGTGCAGATCTCCCTGAA GGCCCTGCGGCGGATCTGTGCCCTGATGGAGCAGGGCAGCGGTACGAC GAGGCCCTGGCCCGAGATCTACGGCGACCACTACGGCAAGAAACACCG AGGAGAAAGATCTACCTGCCCCCAATCCCGCCGACGAGATCCGGAAACC CGTGGTGCTGCGGGCCCTGTCCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGCGTG GTGCGGCGGTACGGCTCCCCGCCGATCCACATCGAGACCGCCCGGG AGGTGGGCAGTCTCTCAGGACCGGAAAGGAGATCGAGAGCGGCAGGA GGAGAACCGGAAGACCGGGAGAGGCCGCCGCCCAAGTCCAGGACATCCTGAAGCTGC TTCCCCAACTTCGTGGCGGAGCCCAAGTCCAAGGACATCCTGAAGCTGC GGCTGTACGAGCAGCAGCACGGCAAGTGCTGTACTCCGGCAAGGAGAT CAACCTGGGCCGGCTGAACGAGAAAGGCTACGTGGAGATCGACCAAGCC CTGCCCTTCTCCCGGACCTGGGACGACTCCTTCAACAAACAAAGTGCTGG TGCTGGGCTCCGAGAACCAAGAACAGGGCAACCAAGACCCCTACGAGTA CTTCAACGGCAAGGACAACTCCCGGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCCCGG GTGGAGACCTCCCGGTTCCCGGTCCAAGAGCAGCGGATCCTGCTGC AGAAGTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGCGGAACCTGAACGACACCCG GTACGTGAACCGGTTCTGTGCCAGTTCTGTGCCCGACCGGATGCGGCTG ACCGGCAAGGGCAAGAACGGGTGTTCCGCTCCAACGGCCAGATCACCA ACC'TGCTGGGGGCTTCTGGGGCC'TGCGGAAGTGCGGGCCGAGAACGA CCGGCACACGCCCTGGACCGCGTGGTGGTGGCTGCTCCACCGTGGCC ATGCAGCAGAAAGATCACCCGGTTCGTGGGTACAAAGGAGATGAACGCCT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 4 5】

TCGACGGCAAGACCATCGACAAAGGAGACCGGCGAGGTGCTGCACCAGAA GACCCACTTCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCCAGGAGGTGATGATC CGGTGTTCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGTTCGAGGAGGCCGACA CCCTGGAGAAAGCTGCGGACCCCTGCTGCGCGAGAAAGCTGCTCCCCGCC CGAGGCCGTGCACGAGTACGTGACCCCCCTGTTCCGTCCCCGGCCCCC AACCGGAAGATGTCGGGCCAAGGCCACATGGAGACCGTGAAATCCGCCA AGCGGCTGGACGAGGGCGTGTCCGTGCTGCGGGTGCCCCCTGACCCAGCT GAAGCTGAAGGACCTGGAGAAAGATGGTGAACCGGAGCGGGAGCCCAAG CTGTACGAGGCCCTGAAGGCCCGGCTGGAGGCCCCACAAGGACGACCCCG CCAGGCCCTTCGCCGAGCCCTTCTACAAAGTACGACAAAGCCGGCAACCG GACCCAGCAGGTGAAGGCCGTGCGGGTGGAGCAGGTGCAGAAAGACCGGC GTGTGGGTGCGGAACCAACAGGCATCGCCGACAAACGCCACCATGGTGC GGGTGGACGTGTTCGAGAAAGGCGGACAAAGTACTACCTGGTGCCCATCTA CTCCTGGCAGGTGCCCAAGGCGATCCTGCCCGACCGGGCCGTGGTGCAG GGCAAGGACGAGGAGACTGGCAGCTGATCGACGACTCCTTCAACTTCA AGTTCTCCCTGCACCCCAACGACCTGGTGGAGGTGATCACCAAGAAAGGC CCGGATGTTCCGGCTACTTCGCCCTCCTGCCACCGGGCACCGGCAACATC AACATCCGGATCCACGACCTGGACCAACAAGATCGGCAAGAACGGCATCC TGGAGGGCATCGGCGTGAAAGACCGCCCTGTCTTCCAGAAAGTACCAAGAT CGACGAGCTGGGCAGGAGATCCGGCCCTGCGCGGCTGAAGAAAGCGGCC CCCGTGCGGTCCGGCAAGCGGACCGGCCGACCGGCTCCGAGTTCCGAGTCCC CCAGAGAAAGCCGGAAGTGGAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 4 6】

表 4 の低 A/U コドンを使用し た Nme Cas9 ORF (開始コドンま たは終止コドン なし、融合タン パク質コード配 列に含めるのに 好適である)	36 4	GCCGCCCTTCAAGCCCCAACAGCATCAACTACATCCTGGGCCCTGGACATCG GCATCGCCAGCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGATCGACGAGGAGAGAA CCCCATCCGGCTGATCGACCTGGGCCGTGGGGTGTTCGAGCGGCCGAG GTGCCCAAGACCGGCGACAGCCCTGGCCATGGCCCGGGGCTGGCCCCGGA CGGTGCGCGGCTGACCCGCGCGCGGCCACCGGCTGCTGCCGACCCG GGGCTGCTGAAGCGGAGGGGCTGCTGCAGGCCGCCAACTTGCACGAG AACGGCTGTATCAAGAGCCTGCCCCAACACCCCTTGGCAGCTGGGGCCG CCGCCCTGGACCGGAAGCTGACCCCTGAGAGTGGAGCGCGCTGCTGCT GCACCTGATCAAGCACCGGGGCTACCTGAGCCAGCGAAGAACGAGGGC GAGACCGCGACAAAGAGCTGGCGCCCTGCTGAAGGCGTGGCCCCGA ACGCCAAGCCCTGCAGACCGGCGACTTCCGGACCCCGCCGAGCTGGC CCTGAACAAGTTCGAGAAAGAGAGCGGCCACATCCGGAACCAAGCGGAGC GACTACAGCCACACCTTCAGCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATCC TGCTGTTTCGAGAAAGCAGAAAGGAGTTCGGCAACCCCACTGAGCGGGCG CCTGAAGGAGGCGATCGAGACCTGCTGATGACCCAGCGGCCCGCTG AGCGCGACGCGTGCAGAAAGATGCTGGGCCACTGCACCTTCGAGCCCG CCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCCCGAGCGGTTTCATCTG GCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGGCAGCGAGCGG CCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCTGATGGACGAGCCCTACCGGA AGAGCAAGCTGACCTACGCCCAAGGCCCGGAAGCTGCTGGGCTGGAGGA CACCGCCCTTCTTCAAGGGCCCTGCGGTACGGCAAGGACAAACCGGAGGCC AGCACCCCTGATGGAGATGAAGGCCCTACCAAGCCATCAGCCGGGCCCTGG AGAAGGAGGGCCCTGAAGGACAAAGAGCCCCCTGAACCTGAGCCCCGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 4 7】

	GCTGCAGGACGAGATCGGGCACCGCCCTTCAGCCCTGTTCAAGACCGACGAG GACATCACCGCGCGGCTGAAGGACCGGATCCAGCCGAGATCCTGGAGG CCCTGCTGAAGCACATCAGCTTCGACAAAGTTTCGTGCAGATCAGCCTGAA GGCCCTGCGGGGATCGTGCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACGAC GAGGCTGCGGCGGAGATCTACGGCGACCACTACGGCAAGAAGAACACCG AGAGAAAGATCTACCTGCCCCCATCCCCCGGACGAGATCCGGAAACCC CGTGGTGCTGCGGGCCCTGAGCCAGGCCCGGAAGTGATCAACGGCGTG GTGGGCGGTACGGCAGCCCCCGCCGGATCCACATCGAGACCGCCCGGG AGGTGGGCAAGAGCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGAGAAAGCGGCAGGA GGAGAACCGGAAGGACCGGAGAGAGCGGCCGCCAAGTTCCGGGAGTAC TTCCCCAAGTTTCGTGGCGGAGCCCAAGAGCAAGGACATCCTGAAGCTGC GGCTGTACGAGCAGCAGCACGGCAAGTGCCCTGTACAGCGGCAAGGAGAT CAACCTGGGCGGCTGAACGAGAGGGCTACGTGGAGATCGACCAAGCC CTGCCCTTCAGCCGGACCTGGGACGACAGCTTCAACACAAAGGTGCTGG TGCTGGGACGCGAGAACAGAACAGGGCAACAGACCCCTACGAGTA CTTCAACGGCAAGGACAAACAGCCGGAGTGCCAGGAGTTCAAGGCCCGG GTGGAGACCAAGCCGGTTCCCCCGGAGCAAGAAAGCAGCGGATCCTGCTGC AGAAAGTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGCGGAACCTGAACGACACCCG GTACGTGAACCGGTTCTGTGCCAGTTTCGTGGCCGACCGGATGCGGCTG ACGGGCAGGGCAAGAAAGCGGGTGTTCGCCAGCAACGGCCAGATCACCA ACCTGCTGCGGGGCTTCTGGGGCTCGCGAAGGTGCGGCCGAGAACGA CCGGCACCAAGCCCTGGACCGCCGTGGTGGTGGCTGCAGCACCGTGGCC ATGCAGCAGAAGATCACCCGGTTTCGTGCGGTACAAGGAGATGAACGCCCT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 4 8】

TCGACGGCAAGACCCATCGACAAGGAGACCGCGGAGGTGCTGCCACCAGAA GACCCACTTCCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCCAGGAGGTGATGATC CGGGTGTTCGGCAAGCCCCGACGGCAAGCCCGAGTTCGAGGAGGCCGACA CCCTGGAGAAAGCTGGGGAACCCCTGCTGGCCGAGAAAGCTGAGCAGCCCGCC CGAGGCCGTGCACGAGTACGTGACCCCCCTGTTCTGAGCCGGGCCCC AACCGGAAGATGAGCGGCCAGGCCACATGGAGACCGTGAAAGCGCCA AGCGCTGGACGAGGGCGTGAGCGTGCTGCGGGTGCCCTGACCCAGCT GAAAGCTAAGGACCTGGAGAAAGATGGTGAACCGGGAGCGGGAGCCCAAAG CTGTACGAGGCCCTGAAGGCCCGGCTGGAGGCCCAAGGACGACCCCG CCAGGCCCTTCGCCGAGCCCTTCTACAAGTACGACAAAGCCCGCAACCG GACCCAGCAGGTGAAGGCCGTGCGGTGGAGCAGGTGCAGAAAGACCGGC GTGTGGGTGCGGAACCAACCGGCATCGCCGACAAAGCCACCATGGTGC GGGTGGACGTGTTCGAGAAAGGCGACAAAGTACTACTGCTGGTGCCCATCTA CAGCTGGCAGGTGGCCAAAGGGCATCCTGCCCGACCGGGCGGTGGTGCAG GGCAAGGACGAGGAGGACTGGCAGCTGATCGACGACAGCTTCAACTTCA AGTTCAAGCCTGCACCCCAACGACCTGGTGGAGGTGATCACCAAGAAAGGC CCGGATGTTTCGGCTACTTCGCCAGCTGCCACCGGGGCAACGGCAACATC AACATCCGGATCCACGACCTGGACCAACAAGATCGGCAGAAGACGGCATCC TGGAGGGCATCGGCCGTGAAGACCGCCCTGAGCTTCCAGAAGTACCAAGAT CGACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCCGGCTGAAGAAAGCGGCC CCCGTGGGAGCGGCAAGCGGACCGCCGACCGGACCGAGTTCCGAGAGCC CCAAAGAAAGCGGAAGGTGGAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 4 9】

NLS Iを有するC a s 9のオープンリーディングフレーム (開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である)	GAC AAG AAG TAC AGC ATC GGA CAC TGG ACA TCG GAA CAA A CAG CGT CGG AT GGG CAG TCA TCA CAG ACG AA TAC AAG GTC CCG AGC AAG AAG TTC AAG GT CCT GGG AAA CAC AGA CAG ACA CAG CAT CAA GAA GAA CCG TGA TCG GAG CA CTG CTG TTC GAC AGCG GAG AAA CAG CAG AAG CAA CAA GAC TGA AG A GAA CAG CAA GAA AAG ATAC ACA AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG AAG GGA AAT CTT CAG CAA CCG AAA TGG CAA AAG TCG ACG ACG CTT CTT CCA C AG ACT GGA AAG AAA GCTT CCT GGT C GAA GAA GAA CAA GAA GAA CAA GAA GAA C ACCC GAT CTT CGG AAA CAC ATCG TCG ACG AAG TCG CAT ACC ACG AAA AAG TA CCG GACA ATCT ACC ACC CTG A GAA AAG AAG TGG TCG ACG ACG ACG ACG ACG AAG GCAG ACC TGA GAC TGA TCT ACC TGG CACT GGC ACA CACA TGA TCA AG TTCA GAG GACA CTT CCT GAT CGA AGG AGA CCT GAA CCG GACA A CAG CG ACG T CGACA AGCTG TTC ATCC AGCTGG TCC AGACA TACA ACC AGCTG TTC GAA GAAA CCG CATCA ACG CAA GCG GAG TCG ACG CAA AAG CAA TCC TGA GCG CAA GACTGAG CAA GAG CAG AAG ACTGG AAAAA CCG TGA TCG CAC AGCTGCC GGG AGA AAG AAG AAG ACG GACTG TTC GGA AAC CTG ATCG CACTG AGC CTG GGA CTGAC ACC GAA CTTCAA GAG CAA CTTCG ACC TGG CAG AAG ACG CAA AGCTGC AGCTGAG CAA GGC ACA CATAC GAG CAG CAG CCG TGG ACA ACC CTGCT GGC ACAG ATCGG AGACC AGTAC GCAG ACC TGTTCCTGG CAG CAA AAG AAC CTG AGCG ACG CAA TCC TGTGAG CGACA TCC TGA GAG TCA A CAG A GAA TCA CAA AAG CACC GCTGAG CGC AAG CATGATCAA GAG ATAC GAC GAA CA CCACC AGG ACC TGA CACTGCTGA AGG CACTGG TCAG A CAG CAG CTGCC G GAAA AGTACA AGG AAA TCTTCTTCG ACCAG A GAA ACG GATAC GCG AG GATACA TCG ACG GAG GACA AGCC AGG AAG AATCTACA AGTTCA TCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 5 0】

	GCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAGCTG AACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAAAGCA TCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCCAATCCTGAGAAAGACA GGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAAGGACAAACAGAAAAAGATCGAAAAAG ATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAA ACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAAATCACACC GTGGAACCTTCGAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTC ATCGAAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCC TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAAACGAACCT GACAAAGGTCAAGTACGTACAGAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCCTG AGCGGAGAAACAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACA GAAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAAGACTACTTCAAAGAAAGATCGA ATGCTTCGACAGCGTCGAAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAAACGCA AGCCTGGGAAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCC'TGGACAAACGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCC'TGAC ACTGACACTGTTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACA TACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAA GATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACGGAAATCAG AGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGGACGGA TTTCGCAAAACAGAAACTTCATGCAAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAGCCT GCACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAAGGA ATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACCTGGTCAAGGTCATGGGAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 5 1】

	GACACAAAGCCGGAAAAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCAGAC AACACAGAAAGGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAAATCGAA GAAAGAAATCAAGGAATCTGGGAAAGCCAGATCCTGAAAGAAACACCGGTCTG AAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGAAGAGACATGTACGTGACACAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGC GACTACGACGTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTCTGTACAAGAAAGCGAACGAAACAGAGGAAAGAG CGACAAAGCTCCCGAGCGAAGAAAGTCTGTCAAAGAAAGTGAAGAACTACTGG AGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCGACAAAC TGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGACCGAATCGGACAAAGCCAGGATT CATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCAACAAGCACGTCCGA CAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACGACAAAGC TGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGA CTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTAC CACACGCACACGACGCATACCTGAACCGCAGTCGTCCGAACAGCACTGA TCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCACCGAGACTACAA GGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAAACAGGAAATCGGA AAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTCTACAGCAACATCATGAACCTCTTCA AGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAACGGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGAGAC TTCCGCAACAGTCAGAAAGTCTCTGAGCATGCCGCAAGTCAACATCGTCA AGAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCCTGCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 5 2】

	AAAGAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCCTGG TCGTCCGCAAAAGGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTCAA GGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAAGCAAGCTTCGAAAGAAAC CCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAGGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGGACCC TGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCAACTGGAAAACCGAAG AAAGAGAAATGCTGGCAAGCCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTG GCCTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAGCTGAAGGGAAGCCCGAAAGCAACGAAACAGAAAGCAAGCTGTTCGT CGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAA TTCAGCAAGAGAGTCACTCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAAGTCCCTGA GGGCATACAAACAAGCACAGAGACAAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAA CATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAACCTGGGAGCAACCGGCAGCATTC AAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAAAGG AAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGA AACAAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAAGCCTG GCAGCAAGAGAAAGCAACAACA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 5 3】

NLS 2 を有する C a s 9 のオーブンリーディングプレーム (開始コードまたは終止コードなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である)	GACAAAGAAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGCAGTCAATCACAGACGAATACAAAGGTCCCGAGCAAGAAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACTGATCGGAGCACTGCTGTTGGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAGACTGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGTGGCAAAAGTGGACGACAGCTTCTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTCTGGTCGAAGAAAGACAAAGACGCAAAAGACACCGGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAAGTCGCATACCAAGAAAGTAACCGACAAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAAGTTCAAGGACACTTCCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGACCTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTTCGAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGCCAAAGACTGAGCAAGAGCAAGACTGGAAACCTGATCGCACTGAGCCCTGGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCCCTGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGATCGGAGACAGTACGCAGACCTGTTCTGGCACAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACAACCCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGCAAGAACGGATACGGCAGGATACATCGACGGAGGCAAGCCAGCAAGAAATTTCTACAAGTTTCATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 5 4】

	GCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTG AACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAAACATTCGACAAAGGAAAGCA TCCCGCACAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCCAATCCTGAGAAAGCA GGAAGACTTCTACCCGTTCCCTGAAGGACAAACAGAAAGATCGAANAAG ATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAA ACAGCAGATTCCGATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACC GTGGAACCTTCGAAAGAACTCGTCGCAAGGGAGCAAGCGCACAGACTTC ATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACTGCGGAAACGAAAGGTCC TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTCAACGAACT GACAAAGGTCAACTACGTCAACAGAAAGAAATGAGAAAGCCGCCATTCCTG AGCGAGAAACAGAAAGAGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACA GAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAAGAAAGACTACTTCAAGAAAGATCGA ATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGACAAAGAAAGAAAGACATCCTGGAGACATCGTCCCTGAC ACTGACACTGTTGGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACA TAGGCACACCTGTTTCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAA GATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAG AGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGA TTCCGAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAGCCT GCACGAACACATCGCAAACTGGCAGGAAAGCCCGCAATCAAGAAAGGA ATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGGAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 5 5】

	GACACAAAGCCGGAAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCAGAC AACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAAGAGAAATCGAA GAAAGAAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAAGAAACCCCGGTCCG AAAAACACAGCTGCAGAACCGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGAAGAGACATGTACGTCGACCAAGAACTGCCAGAGCTTCCTGAAAGACGACA GACTACGACCTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAAGACGACA GCATCGACAAACAAAGTCCCTGACAAAGAGCGAACAGAACAGAGGAAAGAG CGACAAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTGTCTAAGAAAGATGAAAGAACTACTGG AGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCGACAAACC TGACAAAGGCAGAGAGAGAGGAGACTGAGCGAACTGGACAAAGGCAGGATT CATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCAACAAAGCACGTCCGA CAGATCCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACCGACAAAGC TGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAAGCGA CTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTCAAGAGAAATCAACAACTAC CACCAAGCACACGACCGCATACCTGAACCGCAGTCGTCCGAACAGCACTGA TCAAGAAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAAATTCGTCTACCGAGACTACAA GGTCTACGACGTCAAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATCGGA AAGGCAAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCA AGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGGAAGAGAC TTCCGCAACAGTCAGAAAGGTCCCTGAGCATGCCCGCAGGTCAACATCGTCA AGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCCTGCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 5 6】

	AAAGAAAGTACGGAGGAGATTTCGACAGGCCCGACAGTTCGCATACAGCGTCTGG TCGTGCGCAAAAGGTCGAAAAGGAAAGAGCAAGAAAGCTGAAAGAGCGTCAA GGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAGCAGCTTCGAAAAGAAC CCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAGGGATACAGGAAGTCAAGAGGACCC TGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAAG AAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTG GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAAACGAACAGAAAGCAGCTGTTCGT CGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAA TTCAGCAAGAGAGTCAATCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAAGTCTGA GGCATACAAACAAGCACAGAGACAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAA CATCATCCACCTGTTCCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTC AAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAAAGG AAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACAGAGCATCACAGGACTGTACGA AACAAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGAAAGCCAG GCAGCAAAAGAGAGCAGAACACA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 5 7】

NLS 3を有するC a s 9のオープンリーディングフレーム（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）	GACAAAGAAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACACGCGTGGGATGGCAGTCAACACAGACGAAATACAAAGGTCCGAGCAAAGAAAGTTCAAAGGTCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACACGACAGAAAGCAACAAAGACTGAAGAGAAACAGCAAGAAAGATACACAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGTGGCAATCTGCTACCTGCAAGAAATCTTACGCAACGAAATGGCAAGGTGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGCTCGAAAGAAAGCAAGAAAGCAAGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCCGACGAAAGTCCGATACCCACGAAAGTAACCGACAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAAGGACACTTCTGATCGAAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGAGCTCGACAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTTGAAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTCCGAAACCTGATCCGACTGAGCCTGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAGAAACCTGAGCGACGCAATCTCTGCTGAGCGACATCTCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACAACCCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACCGGAGGACAAAGCCAGGAAGAAATCTTACAAAGTTCAATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 5 8】

GCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTG AACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAAACAATTCGACAAACGAAAGCA TCCCCGACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCCAATCCTGAGAAAGACA GGAAGACTTCTACCCGTTCTGTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAAG ATCCTGACATTTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCCCTGGCAAGAGGAA ACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACC GTGGAACTTCGAAGGAAGTCGTGCACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTC ATCGAAAAGAAATGACAAAACCTTCGACAAAGAACCTGCCGAAACGAAAAGGTCC TGCCGAAGCACAGCCCTGCTGTACGAATACTTTCACAGTCTACAAACGAACT GACAAAGGTCAAAGTACGTACAGAAAGGAAATGAGAAAGCCGGCATTCCTG AGCGGAGAACAGAAAGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAAACA GAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGA ATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGACAAACGAAACGAAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCCCTGAC ACTGACACTGTTCCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACA TAGGCACACCTGTTCCGACGACAAAGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAA GATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGGAATCAG AGACAAAGCAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCTGAAAGCGGACCGGA TTCCGAAAACAGAACTTTCATGCAAGCTGATCCACGACGACAGCCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGAGACAGCCCT GCACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAACAAAGGA ATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACCTGGTCAAGGTCAATGGGAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 5 9】

	GACACAAGCCGGAAAAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCAGAC AACACAGAAAGGGACAGAAAGAACAGACAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAA GAAAGAAATCAAGGAATCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCG AAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGAAGAGACATGTACCTCGACCAAGAACTGGACATCAACAGACTGAGC GACTACGACGTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTCTCTGACAAAGAAAGCAAAAGAACAGAGAAAGAG CGACAAAGTCCCGAGCGAAGAAAGTCTGTAAGAAAGATGAAGAACTACTGG AGACAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTGACACAACC TGACAAAGGCAGAGAGAGAGGAGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATT CATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA CAGATCCTGGACACAGCAAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACGACAAAGC TGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGA CTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTAC CACCAAGCACACGACGCAACCTGAACCGAGTCGTCGGAACAGCACTGA TCAAGAAAGTACCCGAAGCTGAAAGCGAAATTCGTCTACGGAGACTACAA GGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAAACAGGAAATCGGA AAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCTTCA AGACAGAAATCACACTGGCAACCGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGAGAC TTCCGCAACAGTCAGAAAGGTCTCTGAGCATGCCCGCAGGTCAACATCGTCA AGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 6 0】

	AAAGAAAGTACGGAGGATTTCGACAGGCCCGACAGTTCGCATACAGCGTCTGG TCGTCCGCAAAAGGTCGAAAAGGAAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTCAA GGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAGCAGCTTCGAAAAAGAAC CCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAACCTGGAAAACCGAAG AAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTG GCAC TGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGAACAGAAAGCAGCTGTCTGT CGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGGAATCATCGAACAGATCAGCGAA TTCAGCAAGAGAGTCACTCCTGGCAGACGCAACCTGGACAAAGTCTGA GGGCA TACAACAAGCACAGACAGCAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAA CATCATCCACCTGTTCCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTC AAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGG AAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGACTGTACGA AACAAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGAGGAGGAAAGCCCG GCACCCGGCAAAGAGAGAAAGAACACA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 6 1】

NLS 4 を有する Cas9 のオープンリーディングフレーム (開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である)	GACAAAGAAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACACAGCGTCGGATGGCAGTCATCACAGACGAAATACAAAGGTCCTCCGAGCAAGAAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAAGACTGAAGAGAAACAGCAAGAAAGATACACAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCTGCCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAGGTCGACGACAGCTCTCTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGGTCGAAAGAAAGACAAAGAACGCAAGAAAGACACCGATCTTCGGAAACATCTGTCGACGAAAGTCGCATACCAACGAAAGATAACCGACAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCAACAGCAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGACCTCGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTTCCGAAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAAGAAAGAACCGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCCCTGGACTGACACCGAACTTCAAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAGAACCTGAGCGGCAATCCTGCTGAGCGGACATCCTGAGAGTCAAACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAAGAGATACGACGAAACAACACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGCAAGAACGGATACGGCAGGATACATCGACGGAGGCAAGCCAGGAAGAAATCTACAAAGTTCAATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 6 2】

GCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTG AACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAAACAATTGACAAACGGAAAGCA TCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACA GGAAGACTTCTACCCCGTTCCCTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAAG ATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTGGGACCGCTGGCAAGAGGAA ACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGACGGAAGAAACAATCACACCC GTGGAACCTTCGAAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTC ATCGAAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACCTGCCGAAACGAAAAGGTCC TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAAACGAACT GACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTG AGCGGAGAACAGAAAGAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAAACA GAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGA ATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCA AGCTGGGAAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGACAAACGAAAGAAACGAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCCCTGAC ACTGACACTGTTCGAAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAGACA TACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAA GATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAG AGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGCGGACGGA TTCGCAAAACAGAAACTTCAATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCT GCACGAACACATCGCAAACTTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAAGGA ATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGGAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 6 3】

GACACAAGCCGGAAAAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCAGAC AACACAGAAGGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAAGAGAAATCGAA GAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCCG AAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGAAGAGACATGTACGTCCAGCCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGC GACTACGACCTCGACACATCGTCCCCCAGAGCTTCCCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTCCCTGACAAAGAGCGACAAAGAACAGAGGAAAGAG CGACAAAGTCCCCGAGCGAAGAAAGTCTGTAAGAAAGATGAAGAACTACTGG AGACAGCTGTGAACGCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTGGAACAAAC TGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACCTGGACAAAGCAGGATT CATCAAGAGACAGCTGGTCCAAACAAAGACAGATCACAAAGCACGTCCGA CAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACGAAACGAAAGC TGATCAGAGAGAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAAGCGA CTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTAC CACCAAGCACACGACGCATACCTGAACGAGTCGTCGGAACAGCACTGA TCAAGAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCCGTCTACGGAGACTACAA GGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAAACAGGAAATCGGA AAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCTTCA AGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGAGAC TTCGGCAACAGTCAGAAAGGTCCCTGAGCATGCCGCAAGTCAACATCGTCA AGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 6 4】

	AAGAAGTACGGAGGATTGACACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGG TCGTGGCAAGGTGGAAGGGAAGAGCAAGCAAGCTGAAGAGCGTCAA GGAAGTGCCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAGAAAC CCGATCGAAGCTTCTGGAAAGCAAGGGAATACAAAGGAAGTCAAGAAAGGAGCC TGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTGGAACCTGGAACACCGGAAG AAAGAGAAATGCTGGCAAGCCGACGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTG GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAGCTGAAAGGAAAGCCCGGAAGACAAAGCAAGAAAGCAAGCTGTTCGT CGAAAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAAACAGATCAGCGAA TTCAGCAAGAGAGTCACTCTGGCAGACGCAAACTGGACAAAGTCTCTGA GGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAA CATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTC AAGTACTTCGACACAAACAAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAAAGG AAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGACTGTACGA AACAAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACCGGAGGAAAGCCAG GCAGCAAGAGACCGAGAACACA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 6 5】

NLS 5を有するCa s 9のオーブンリーディングフレーム (開始コドンは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である)	GACAAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGCAGTCAATCAGACGAAATACAAAGTCCCGAGCAAGAAAGTTCAAAGTCTGGGAAACACAGACAGACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAGACTGAAAGAGAAACAGCAAGAAAGATACACAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCTGCAAGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGTCCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGTTGGTCGAAGAAAGACAAAGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAAGTCCATACCAAGAAAGTAACCGACAAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAAGGACACTTCTGATCGAAAGGAGACCTGAAACCCGGACAAACAGGACGTGGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTTTCGAAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCCCTGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGCAAAAGAAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACAACCCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAGTACAAGGAAATCTCTTCGACCAAGAGCAAGACGGATACGGCAGGATACATCATCGACCGGAGGAGCAAGCCAGGAAAGAAATCTACAAAGTTCAATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 6 6】

	GGCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTG AACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAAACAATTCGACAAACGGAAAGCA TCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACA GGAAGACTTCTACCCGTTCTGTGAAGGACAAACAGAAAAGATCGAAAAAG ATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTAGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAA ACAGCAGATTCCGATGGATGACAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACC GTGGAACCTTCGAAGAAAGTCGTGCAAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTC ATCGAAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACTGCCGAACGAAAAGGTCC TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAAATACTTCACAGTCTACAAACGAACT GACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAAATGAGAAAGCCGGCATTCCTG AGCGGAGAACAGAAAGAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAAGACAAACA GAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAAGACTACTTCAAAGAAAGATCGA ATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGGAACAATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGACACGAAAGAAACGAAGACATCCTGGAGACATCGTCCCTGAC ACTGACACTGTTCCGAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAGACA TACGCACACCTGTTCCGACGACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAA GATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACGGAATCAG AGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACCGA TTGCAAAACAGAACTTCAATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAAGGACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAGCCT GCACGAAACACATCGCAAACTGGCAGGAAAGCCCGCAATCAAGAAAGGA ATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGGAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 6 7】

	GACACAAAGCCGGAAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAAGAC AACACAGAAAGGGACAGAAAGAAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAA GAAAGAAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCG AAAACACACAGCTGCAGAACGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGAAGAGACATGTACGTCGACCAAGAACTGGACA'TCAACAGACTGAGC GACTACGACCTCGACCAATCGTCCCGCAGAGCTTCCCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTCCCTGACAAAGAAGCGACAAGAACAGAGAAAGAG CGACAAAGTCCCGAGCGAAGAAAGTCTGTAAGAAAGTGAAGAACTACTGG AGACAGCTGCTGAACGGCAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTGGACAACC TGACAAAGGCAGAGAGAGAGGAGCTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATT CATCAAAGAGACAGCTGGTCCGAAACAAGACAGATCACAAAAGCACGTCGCA CAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACCGACAAGC TGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGA CTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTCAAGAAATCAACAACTAC CACCAAGCACACGACGCAATACCTGAACCGAGTCGTCCGAAACAGCACTGA TCAAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAAATTCGTCTACGGAGACTACAA GGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCCGAAACAGGAAATCGGA AAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTCTACAGCAACATCATGAATCTTCA AGACAGAAATCACTGGCAACCGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGAGAC TTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCCTGAGCATGCCCGCAGGTCAACATCGTCA AGACAGACAGAGTCCAGACACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCC GAAAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 6 8】

	AAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCCGATACAGCGTCCTGG TCGTGCAAAAGTCCGAAAAGGAAAAGAGCAAGAAGCTGAAAGAGCGTCAA GGAACGTGCTGGGAAATCACCAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAGAAC CCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAAAGGATACAAAGGAAGTCAAAGAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAAC TGGAAAAACGGAAAG AAAGAGAAATGCTGGCAAGCCGAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTG GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGAAAGCCCGAAGACAAAGAAACAAAGCAGCTGTTCTGT CGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAA TTCAGCAAGAGAGTCACTCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAGGTCCTGA GGGCA TACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCGAGAAA CATCATCCACCCTGTTCAACACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCAGCATTC AAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAAGG AAGTCCTGGACCGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGA AACAAAGAA TCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAAGCAGA GCAGCAAGAGACCCGAGAACAAACA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 6 9】

NLS6を有するCas9のオープンリーディングフレーム（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）	GACAAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACACAGCGTCGGATGGCAGTCAACAGACGAAATACAAAGTCCGAGCAAAGAAAGTTCAAAGTCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAAGATACACAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCTGCAAGAAATCTTCAAGCAACGAAATGGCAAGGTGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGCTCGAAAGAAAGACAAAGACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCTGTCGACGAAAGTGGCATACCAACGAAAGTACCCGACAATCTACCACTGAGAAAGAGCTGGTCGACACAGACAAAGGCAGACCTTGATCTACTGCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAAGGACACTTCTGATCGAAAGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGACCTCGACAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTTCGAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGCAGAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAAGAAAGAACCGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAAGAACCTGAGCGACGCAATCTGCTGAGCGACATCTCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACTCCAGAGGAAATCTTCTTCGACCAGACAAAGACGATACGCAGGATACATCGACCGGAGCAAGCCAGGAAGATTCTACAAAGTTCA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 7 0】

	GCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAGCTG AACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAAAGCA TCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACA GGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAAACAGAAAAAGATCGAAAAAG ATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAA ACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGACGGAAGAAACAATCACACC GTGGAACCTTCGAAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTC ATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACTGCGCAACGAAAGAGTCC TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAAACGAACT GACAAAGGTCAAGTACGTACAGAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCCTG AGGGAGAAACAGAAAGGAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACA GAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAAGACTACTTCAAGAAAGATCGA ATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAAACGCA AGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGAACAACGAAGAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCCTGAC ACTGACACTGTTCTGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACA TACGCACACCTGTTCTGACGACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAA GATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAG AGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGGCGGA TTGCGAAACAGAAACTTCATGCAAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAGCCT GCACGAACACATCGCAAACTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAAGGA ATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGGAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 7 1】

	GACACAAGCCGGAAAAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCAGAC AAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAAGAAATCGAA GAAGGAATCAAGGAATCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCCGGTCCG AAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAAGCTGTACTCTACTCCTGCAGAA CGGAAGAGACATGTACGTCCAGCCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGC GACTACGACGTCGACCCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAAGGACGACA GCATCGACAAACAAAGGTCCCTGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGGAAAGAG CGACAAAGTCCCCGAGCGAAGAAAGTCTGTCAAAGAAAGATGAAGAACTACTGG AGACAGCTGCTGAACGCCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAAGTTCCGACAAAC TGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAAGCTGGACAAAGGCAGGATT CATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA CAGATCCTGGACAGCAGAAATGAAACACAAAGTACGACGAAACGAAACGAAAGC TGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGA CTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTAC CACCAAGCACACGACGCGATACCTGAAGCGAGTCGTCGGAACAGCACTGA TCAAGAAAGTACCCGAAAGCTGGAAGCGAAATTCGTCTACGGAGACTACAA GGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAGAGCGAAACAGGAAATCGGA AAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTCA AGACAGAAATCAACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAAACCGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGAGAC TTCGGCAACAGTCAGAAAGGTCCCTGAGCATGCCGAGGTCAACATCGTCA AGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 7 2】

	AAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCTGCATACAGCGTCCCTGG TCGTGCAAAAGGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTCAA GGAACGTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAGAGCAGCTTCGAAAAGAAC CCGATCGACTTCCCTGGAGCAAGGATACAGGAGTCAAGAGGACCC TGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAACCTGGAAAACGGGAAG AAAGAGAAATGCTGGCAAGCCGACGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTG GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACTCTGGCAAGCCACTACG AAAGCTGAAGGAGCCCGGAAGACACGAAACAGAACGAGCTGTTCTGT CGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATTCGAAACAGATCAGCGAA TTCAGCAAGAGAGTCACTCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAGGTCTCTGA GGCATACAAACAAGCACAGACAGACAAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAA CATCATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTC AAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAAAGG AAGTCTCTGGACGCAACACTGATCCACAGAGCATCACAGGACTGTACGA AACAAAGAAATCGAACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAAAGCGCA GCAGCAAAAGAGAAAGCTGGAGCATGGCAGCA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 7 3】

NLS 7を有するCas9のオーブンリーディングフレーム（開始コードまたは終止コードなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）	GACAAAGAAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACACGCGTCGGATGGCAGTCAACAGACGAAATACAAAGGTCCGAGCAAGAAAGTTCAAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACACAGCAGAAAGCAACCAAGACTGAAAGAGAACAGCAAGAAAGATACACAGAAAGAAAGAACAGAAATCTGCTACCTGCAAGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGCTGGTCGAAGAAAGACAAAGACACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCTGTCGACGAAAGTGGCATACCAACGAAAGTACCCGACAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGACACAGACAAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAAGGACACTTCTGATCGAAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGACCTCGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAAGCTGTTTCGAAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACGTGAGCCCTGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGCGCAGCAAGAAACCTGAGCGACCAATCCTGCTGAGCGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACAACACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGCAAGAACGGATACGGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCACAAAGTTTCATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 7 4】

GCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAGCTG AACAGAGAAAGACCTGCTGTGAGAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAAAGCA TCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACA GGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAAACAGAGAAAGATCGAAAAAG ATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAA ACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACC GTGAAACTTCGAAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTC ATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACCTGCCGAAACGAAAGGTCC TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAAACGAACT GACAAAGGTCAGTAGCTCACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCAATTCCTG AGCGGAGAACAGAAAGAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACA GAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAAGACTACTTCAAGAAAGATCGA ATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACT TCCCTGGACAAAGAAACCAAGACATCCTGGAAAGACA TCGTCCCTGAC ACTGACACTGTTCCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACA TACGCACACCCTGTTTCGACGACAAAGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAA GATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAG AGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCGTGAAGCGGACGGG TTCCGCAACACAGAAACTTCTATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAAGCCACAGGTCAGCGGACAGGGGAGACAGCCT GCACGAACACATCCCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAGGA ATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGGAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 7 5】

	GACACAAGCCGGAAAACAATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAAGAC AACACAGAAAGGACAGAAAGAAACAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAAATCGAA GAAAGAAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCG AAAACACACAGCTGCAGAACCGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCCAGAA CGGAAGAGACATGTACGTGGACCCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGC GACTACGACGTCGACCAATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTCTGTACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAAGAG CGACAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCTCAAGAAGATGAAGAACTACTGG AGACAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCGACAAACC TGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGCCAGGATT CATCAAGAGACAGGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAAGCACGTCCGA CAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGC TGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGA CTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTCAAGAGAAATCAACAACTAC CACCACGCACACGACATACCTGAACCGAGTCGTCCGGAACAGCACTGA TCAAGAAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAAATTCGTCTACGGAGACTACAA GGTCTACGACGTCAGAAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAAACAGGAAATCGGA AAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTCA AGACAGAAATCACACTGGCAACCGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAAACCGGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGGAAGAGAC TTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCGTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCCTCA AGAGACAGAAAGTCCAGACACAGGAGATTCAAGCAAGGAAAGCATCCTGCC GAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAAGAAAGGACTGGGACCCG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 7 6】

	AAAGAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGG TCGTCCGCAAAAGGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAGCTGAAAGAGCGTCAA GGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAGAAAC CCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAGGGATACAAAGGAAGTCAAAGAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAACCTGGAAAACCGAAG AAAGAGAAATGCTGGCAAGCCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTG GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGAAAGCCCGAAAGACAAACGAAAGCAAGCAGCTGTTCGT CGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAA TTCAGCAAGAGAGTCACTCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAAGTCCTGA GGGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAA CATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAACCTGGGAGCAACCGCAGCATTC AAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGG AAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGA AACAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAGCGCA GCAGCAAGAGAGTCTGGAGCATGGCAATTC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 7 7】

NLS 8を有するCa s 9のオーブンリーディングフレーム (開始コードまたは終止コードなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である)	GACAAAGAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCCGGAT GGCAGTCAATCAGACGAAATACAAAGTCCCGAGCAAGAAAGTTCAAGGT CCTGGAAACACAGACAGACACAGCATCAGAAAGAACCTGATCGGAGCA CTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAAGACTGAAGAGAA CAGCAAGAAAGATACACAAGAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCTGCA GGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGTCCGACGACAGCTTCTTCCAC AGACTGGAAAGAAAGCTTCTGCTGGTCGAAGAAAGACAAAGACGAAAGAC ACCCGATCTTCGGAAACATCTGTCGACGAAAGTCCGATACCAACGAAAGTA CCCGACAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAAG GCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCA GAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGGACGT CGACAAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTTCCGAA GAAACCCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGCG CAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCC GGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCCTG GGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGAA AGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAAACCTGCT GGCACAGATCGGAGACCCAGTACGCAGACCTGTTCTGCGACGCAAAAGAAC CTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAA TCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACA CCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCG GAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGACGGATACGGCAG GATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAAGAAATCTACAAGTTTCATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 7 8】

	GCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAGCTG AACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAAAGCA TCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACA GGAAGACTTCTACCCGTTCCCTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAAG ATCCTGACATTACAGAAATCCCGTACTAGGTCGGACCCGCTGGCAAGAGGAA ACAGCAGATTCCGATGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACC GTGGAACCTTCGAAAGAACTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTC ATCGAAAGAAATGACAAAACCTTCGACAAAGAAACCTGCCGAACGAAAAGGTCC TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAAACGAACT GACAAAGGTCAAATACGTACAGAAAGGAAATGAGAAAGCCGGCAATTCCTG AGCGGAGAAACAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAAGACAAACA GAAAGGTCAACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAAGAAAGATCGA ATGCTTCGACAGCGTCGAAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAACGCA AGCCTGGGAACATACCAAGCCTGCTGAAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCCTGGACAAACGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCCTGAC ACTGACACTGTTTCGAAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAGACA TACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGTCAAGAGCAGCTGAAGAGAAAGAA GATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAAGCTGATCAAACGGAATCAG AGCAAGCAGAGCGGGAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAAGAGCGACGGA TTCGCAAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAAGCGGACAGGAGACAGCCT GCACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAAGGA ATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACCTGGTCAAAGTCAATGGGA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 7 9】

	GACACAAAGCCGGAAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAAACACAGAC AACACAGAAAGGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAAGAAATGAAAGAGAAATCGAA GAAAGAAATCAAAGGAATCTGGGAAGCCAGATCCTGAAAGAAACACCCGGTCTG AAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGAAGAGACATGTACCTCGACCCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGC GACTACGACCTCGACCCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGTAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTCTCTGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGGAAAGAG CGACAAAGCTCCCGAGCGAAGAAAGTCTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGG AGACAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCGACAAAC TGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGCCAGGATT CATCAAGAGACAGCTGGTCCGAACAAGACAGATCAACAAGCACGTCGCA CAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACGACAAAGC TGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGA CTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTAC CACCAAGCACACGACCGCATACCTGAACCGAGTCGTCGGAACAGCACTGA TCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTGCTACCGAGACTACAA GGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAAACAGGAAATCGGA AAGGCAAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAATCTTCA AGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAAACCGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGAGAC TTCCGCAACAGTCAGAAAGGTCTCTAGCATGCCCGCAGGTCAACATCGTCA AGAAAGACAGAAAGTCCAGACACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 8 0】

	AAAGAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTTCGCATACAGCGTCCTGG TCGTGCGCAAAAGGTCGAAAAGGAAAAGAGCAAGAGCTGAAGAGCGTCAA GGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAAC CCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAGGGATACAAAGGAAGTCAGAGGACC TGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCAACTGGAAAAACGGAAAG AAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCCAGAAAGGAAACGAACTG GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAAGAACAGAGCAGCTGTTCTGT CGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAA TTCAGCAAGAGAGTCACTCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAAGTCCCTGA GGGCATACAAACAAGCACAGAGACAAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAA CATCATCCACCCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTC AAGTACTTCGACACACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGG AAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGA AACAAAGAAATCGACCCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAAGCGCA GCAGCAAAAGCAAGCTGCAGCATGGCATTC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 8 1】

NLS9を有するCa s 9のオーブンリーディングフレーム (開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である)	GACAAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGAT GGCAGTCAATCACAGACGAATACAAAGTCCGAGCAAGAAAGTTCAAGGT CCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCA CTGCTGTTCCACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAGACTGAAGAGAA CAGCAAGAAGAAAGATACACAAAGAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCTGCA GGAATCTTCAGCAACGAAA'TGGCAAAGGTCCAGGACAGCTTCTTCCAC AGACTGGAAGAAAGCTTCTGCTCGAAGAAAGACAAAGAACGAAAGAC ACCCGATCTTCGGAAACATCTGTCGACGAAAGTCCGATACCAAGAAAGTA CCCGACAATCTACCACTCTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCAAGACAAAG GCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCA GAGGACACTTCTTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGGACGT CGACAAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACCAAGCTGTTGAA GAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGCG CAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCC GGGAGAAAAGAAACGGACTGTTGGGAAACCTGATCGCACTGAGCCCTG GGACTGACACCGAAGCTTCAAGAGCAAGCTTCCAGCTGGCAGAAAGACGAA AGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAAACCTGCT GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGTCAGCAAAAGAAC CTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAA TCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACA CCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGGACCTGCCG GAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGATACGCAAG GATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAAGAAATTCACAAAGTTCAACAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 8 2】

GCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAGCTG AACAGAGAAAGACCTGCTGTAGAAAGCAGAGAAACAATTCGACAAACGGAAAGCA TCCCGCACCCAGATCCACCCCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACA GGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAAGGACAAACAGAGAAAAAGATCGAAAAAG ATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCCGCTGGCAAGAGGAA ACAGCAGATTGGCATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCAACACC GTGGAACCTTCGAAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTC ATCGAAAAGAAATGACAAAACCTTCGACAAAGAACCTGCCGAAACGAAAAGGTCC TGCCGAAGCACAGCCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAAACGAACT GACAAAGGTCAAAGTACGTACACAGAAAGGAAATGAGAAAGCCGGCAATTCCTG AGCGGAGAACACAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACA GAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGA ATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCA AGCCTGGGAACATACACGACCTGCTGAAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGACAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAGACAATCGTCCCTGAC ACTGACACTGTTCCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACA TACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAA GATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAG AGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCTGAAAGCGGACGGA TTCGCAAAACAGAAACTTCAATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCT GCACGAACACATCCGCAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAAGGA ATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACCTGGTCAAGGTCAATGGGAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 8 3】

	GACACAAAGCCGGAAAAACATCGTCAATCGAAAATGGCAAGAGAAAAACCAGAC AACACAGAAAGGGACAGAAAGAACACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAA GAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCCTGAAGGAACACCCCGGTCCG AAAAACACACAGCTGCAGAAACGAAAGCTGTACCTGTACTCCTGCAAGAA CGGAAGAGACATGTACGTCCAGCCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGC GACTACGACGTCGACCCACATCGTCCCCCAGAGCTTCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTCCCTGACAAAGAACGCAAGAAACAGAGGAAAGAG CGACAAAGTCCCCGAGCGAAGAGTCTGTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGG AGACAGCTGCTGAACCGCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTGGAACAAAC TGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAAGGCAGGATT CATCAAGAGACAGCTCGTCCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA CAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACGAAACGAAAGC TGATCAGAGAAAGTCAAGGTCTATCACACTGAAGAGCAAGCTGCTCAGCGA CTTCAGAAAGGACTTCAGTCTCTACAAAGTCAAGAGTCAAGAAATCAACAACTAC CACCAAGCACACGACCGCATACCTGAACGCACTCGTCCGAAACAGCACTGA TCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTACGGAGACTACAA GGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAAACAGGAAATCGGA AAGGCAAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCA AGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGAGAC TTCCGCAACAGTCAGAAAGGTCCCTGAGCATGCCGCAAGGTCAACATCGTCA AGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCAATCCTGCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 8 4】

	AAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGG TCGTCCGCAAAAGGTCGAAAAAGGAAAGAGCAAGAAAGCTGAAAGAGCGTCAA GGAAC TGCTGGGAATCACAAATCATGGAAGAAAGCAGCTTCGAAAAAGAAC CCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAGGGATACAAAGGAAGTCAAAGAGGACC TGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCGAACTGGAAAAACGGGAAG AAAGAGAAATGCTGGCAAGCCGAGGAGAACTGCAGAAAGGGAACGAACTG GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGAAAGCCCCGGAAGACAAACGAAACAGAAAGCAGCTGTTCTGT CGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAAACAGATCAGCGAA TTCAGCAAGAGAGTCACTCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAAGTCCCTGA GGGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAA CATCATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCAGCATTC AAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCAACAAGG AAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACAGAGCATCACAGGACTGTACGA AACAAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAAGCGCA GCAGCAAAAGAGAAAGTACTTCGCAGCA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 8 5】

NLS10を有するCas9のオープンリーディングフレーム（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）	GACAAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACACAGCGTCGGATGGCAGTCATCACAGACGAAATACAAAGGTCCTCCGAGCAAGAAAGTTCAAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACACAGCAGAAAGCAACAAAGACTGAAGAGAAACAGCAAGAAGATACACAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCTGCCAGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGGTCGAAAGAAAGACAAAGACACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCTGTCGACGAAAGTCGCATACCAACGAAAGTAACCGACAATCTACCACTGTAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAAGGACACTTCCCTGATCGAAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGACCTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTTCGAAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAAGAAAGAACCGGACTGTTCCGGAAACCTGATCGCACCTGAGACGCAAGGCTGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGCGCAGCAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACAACACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGCAAGAACGGATACGGCAGATACATCGACCGAGGAGCAAGCCAGGAAAGAAATTCCTACAAAGTTTCATCAA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 8 6】

GCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAGCTG AAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAAAGCA TCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACA GGAAGACTTCTACCCGTTCTTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAAG ATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTAGCTCGGACCGCTGGCAAGAGGAA ACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACC GTGAAACTTCGAAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTC ATCGAAAGAAATGACAAAACCTTCGACAAAGAAACCTGCCGAAACGAAAAGGTCC TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAAATACCTCACAGTCTACAAACGAACT GACAAAGGTCAAAGTACGTCACAGAAAGGAAATGAGAAAGCCGGCATTCCTG AGCGGAGAAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAAGACAAACA GAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAAGACTACTTCAAGAAAGATCGA ATGCTTCGACAGCGTCGAAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAACGCA AGCCTGGGAACATACCAAGACCTGCTGAAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCCTGGAACAAACGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAGACATCCTCCTGAC ACTGACACTGTTCCGAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAGACA TACGCACACCTGTTCCGACGACAAAGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAA GATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACGGAAATCAG AGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAAGAGCGGAG TTCGCAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAAGCACAGGTCAGCCGACAGGGAGACAGCCT GCACGAACACATCGCAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAGGA ATCCTGCAGACAGTCAAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAAGGTCAATGGGA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 8 7】

GACACAAAGCCGGAAAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCAGAC AACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAAATCGAA GAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCG AAAAACACAGCTGCAGAACCGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA CGGAAGAGACATGTACGTGACCCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGC GACTACGACGTCGACCAACATCGTCCGGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTCCTGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGGAAAAGAG CGACAAAGCTCCGGAGCGAAGAAAGTCGTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGG AGACAGCTGCTGAAAGCGCAAGCTGATCAACACAGAGAAAGTTTCGACAAACC TGACAAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAAGGCAGGATT CATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCACAAAAGCACGTCGCA CAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAAGTACGACGAAAACGACAAAGC TGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGA CTTCAGAAAAGGACTTCCAGTTCTAAGGTCAAGAGAAATCAACAACTAC CACCAAGCACACGACGCAATACCTGAACCGAGTCGTGGAAACAGCACTGA TCAAGAAAGTACCCGAAGCTGCAAGCGAAATTCGTCTACCGACACTACAA GGTCTACGACGTCAGAAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAAACAGGAAATCGGA AAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCA AGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGGAAGAGAC TTCCGCAACAGTCAGAAAGGTCCGTAGCATGCCCGCAGGTCAACATCGTCA AGAAACACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAAGCAAGGAAAGCATCCTGCC GAAAGAAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAAGAAAGGACTGGGACCCG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 8 8】

	AAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGG TCGTGCAAAAGGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAGCTGAAGAGCGTCAA GGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAGAAC CCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCCAACTGGAAAACGGAAAG AAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAGGGAAACGAACCTG GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAAAGAACAAAGAACAGCTGTTCGT CGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAA TTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACCGCAAAACCTGGACAAAGTCCTGA GGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAA CATCATCCACCCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCAGCATTC AAGTACTTCGACACACAACAAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAAAGG AAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACACAGAGCATCACAGGACTGTACGA AACAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAAGCAGA GCAGCAAAAGAGAAAGGCATTTCGACAGCA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 8 9】

NLS11を有するCas9のオープンリーディングフレーム(開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である)	37 5
GACAAAGAAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACACAGCGTCGGAT GGCAGTCAATCACAGACGAAATACAAAGTCCCGAGCAAGAAAGTTCAAAGGT CCTGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCA CTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAAGACTGAAGAGAA CAGCAAGAAAGATACACAAGAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCTGCA GAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGTCCGACGACAGCTTCTTCCAC AGACTGGAAGAAAGCTTCTGCTGTCGAAAGAAAGACAAAGACGCAAAAGAC ACCCGATCTTCGAAACATCGTCGACGAAAGTCGATACCAAGAAAGTA CCCGACAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAAG GCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCA GAGGACACTTCTTGATCGAAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGACGT CGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTTCCGAA GAAACCCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGCG CAAGACTGAGCAAGAGCAGAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCC GGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCCTG GGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAA AGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTGCT GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGCAAGAAAC CTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAA TCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAAC CCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCG GAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGACGGATACGCAG GATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCACAAAGTTTCATCAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 9 0】

GCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAGCTG AACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACATTTCGACAAACGGAAAGCA TCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACA GGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAAACAGAGAAAGATCGAAAAAG ATCCTGACATTTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAA ACAGCAGATTTCGCA'GGATGACAAAGAAAGACGAAAGAAACAATCACACC GTGGAAC'TTCGAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGACTTC ATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAAGAGTCC TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAAACGAACCT GACAAAGGTCAGTACGTCACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCCTG AGCGGAGAACAGAAAGAGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACA GAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGA ATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAAACGCA AGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT TCC'TGGACAAAGAAAGAAACGAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCCCTGAC ACTGACACTGTTCCGAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAGACA TACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGGTCA'TGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAA GATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAG AGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGGACGGA TTCGC'AAACAGAAACTTTCATGCACTGATCCACGACAGCCTGACAT TCAAGGAAGACATCCAGAAAGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCT GCACGAACACATCCCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAGGA ATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAAC'TGGTCAAGGTCA'TGGGAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 9 1】

	GACACAAGCCGGAAAAACAATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAGAAAAACAGAC AACACAGAAAGGACAGAAAGAAACAGCAGAGAAAGAAATGAAAGAAATCGAA GAAGGAATCAAGGAATCTGGAAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCG AAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAGCTGTACCTGTACTACTGCAGAA CGGAAGAGACATGTACGTGGACCAAGAACCTGGACATCAACAGACTGAGC GACTACGACGTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCC'TGAAGGACGACA GCATCGACAAACAAGGTCC'TGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGGAAAGAG CGACAACGTCCCGAGCGAAAGTCTGTAAGAAAGATGAAGAACTACTGG AGACAGCTGCTGAACGCAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTGACAAACC TGACAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAAC'TGGACAAGGCAGGATT CATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA CAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACGACAAAGC TGATCAGAGAAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGA CTTCAGAAAGGACTTCCAGTCTTACAAGGTCAGAGAAATCAACAAC'TAC CACCAAGCACAGACGCAATACCTGAACGCACTCGTCCGAAACAGCACTGA TCAAGAAAGTACCCGAAAGCTGGAAAGCGAAATTCGTC'TACGGAGACTACAA GGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAGAGCGAACAGGAAATCGGA AAGGCAACAGCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAAC'TCTTCA AGACAGAAATCACACTGGCAACCGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGAGAC TTCCGCAACAGTCAGAAAGGTCC'TGAGCATGCCGAGGTCAACATCGTCA AGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCCTGCC GAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 9 2】

	AAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCGATACAGCGTCCTGG TCGTGCGCAAAAGGTCGAAAAAGGAAAAGAGCAAGAGCTGAAGAGCGTCAA GGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAGAAAGCAGCTTCGAAAAAGAAC CCGATCGACTTCCTGGAAGCAAGGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAAC TGGAAAAACGGAAG AAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAACGAACTG GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCCTGTACCTGGCAAGCCACTACG AAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGAACAGAAAGCAGCTGTTCGT CGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAA TTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAAGTCCCTGA GGGCATACAAACAAGCACAGAGACAAAGCCGATCAGAGAAACAGGCAGAAAA CATCATCCACCCTGTTCCACACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCAGCATTC AAGTACTTCGACACACAACATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAAAGG AAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCCAGAGCATCACAGGACTGTACGA AACAAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACCGAGGAGGAGGAGGAG GCAGCAAAAGAGAAAAGTACTTCCGAGTC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 9 3】

XBG UTR および表4の低 U1コードを有 するCas9 ORFを有する mRNA転写産 物	37 6	GGGAAGCCUCAGAAUAAAAGCCUCAAACUUUUGGCCGGGAUCUGCCACCAUGGA CAAGAAGUACAGCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCAACAGCGUGGGCUGG GCCGUGAUCACCGACGAGUACAGGUGCCACAGCAAGAAUUCAGAGGUGC UGGGCAACACCGACAGACACAGCAUCAGAAAGAAACCUAGUCCGCGCCU GCUUUCGACAGCGCGAGACCGCCGAGGCCACCAAGACUGAAGAGAAC GCCAGAAAGAUACACAGAAAGAAAGAACAGAAUUCUGCUACCGCAGG AGAUUUCAAGCAACGAGAUUGGCCAAGGUGGACGACAGCUUUCACAG ACUGGAGGAGAGCUUCCUGGUGGAGGAGACAAAGAAACAGAGACAC CCCUCUUCGGCAACAUUCGUGGACGAGGUGGCCUACCAAGAGAAUACC CCACCAUCUACCAACUGAGAAAGAACUGGUGGACAGCACCGACAAGGC CGACCUAGACUGAUUACCUGGCCUUGCCCAUAGAUCAAGUUCAGA GGCCACUUCUGAUCGAGGGGACCUUGAACCCGACAAACAGCGACGUGG ACAAAGCUGUUCAUCACAGCUGGUGCAGACCUAACACAGCUUUCGAGGA GAAACCCAUCAAACGCCAGCGGGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGAGCGCC AGACUGAGCAAGACAGACAGACUGGAGAACCUUGAUCCGCCAGCUGCCCG GGAGAAAGAAAGGCCUGUUUGGCAACCUUGAUCCGCCUGAGCCUGGG CCUGACCCCCAAACUUCAGAGCAACUUCGACCUUGGCCGAGGACGCCAAG CUGCAGCUGAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUUGGACAAACUUGCUGG CCCAGAUCCGGCACAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCGCCAAGAACCU GAGCGACGCCAUCCUGCUGAGCGACAUCUUGAGAGUGAACCCGAGAU ACCAAGGCCCCUUGAGGCCAGCAUGAUCAAGAGAUACGAGGACAC ACCAAGGACCUAGCCUUGCUGAAGGCCCUUGUGAGAGACAGCAGCUGCCCGA GAAGUACAAGGAGAUUCUUUCGACCAAGAGCAAGAACGGCUACGCCGGC

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 9 4】

UACAUCGACGGCGCGCCAGCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGC CCAUCCUGGAGAAAGAUUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAA CAGAGAGGACCUUCUGAGAAAGCAGAGAACCUUCGACACCGGACGCAUC CCCCACCAAGAUCCACCCUGGGCGAGUGCACCGCCAUCCUGAGAGACAGG AGGACUUCUACCCUUCUAGAGACACAGAGAGAGAUCCGAGAGAGAU CCUGACCUUCAGAAUCCCUACUACGUGGGCCCCCUGGCCAGAGGCAAC AGCAGAUUCGCCUGGAUGACACAGAAAGAGCGAGGAGACCAUACCCCCU GGAACUUCGAGGAGGUGGACAAAGGGGCCAGCGCCACAGAGCUUCAU CGAGAGAAUGACCAACUUCGACAAAGAACCUGCCCAACGAGAGGUGCUG CCAAAGCACAGCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAAAGAGCUGA CCAAAGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGAGAAAGCCGCCUUCUGAG CGGCGAGCAGAAAGAGCCAUCCUGGACCUUGCUUCAAAGACCAACAGA AAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAAGAAAGUCGAGU GCUUCGACAGCGUGGAGAUACAGCGGCGUGGAGGACAGAUUCAAAGCCAG CCUGGGCACCUACCAAGACCUUGCUAGAGAUCAUCAAAGGACAGGACUUC CUGGACAAAGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCCGUGGACCC UGACCCUGUUCGAGGACAGAGAGAUAGUCCGAGGAGAGACUGAAGACCUA CGCCCAACCUUGUUCGACGACAAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGAGAAAGA UACACCGGCUUGGGCAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCACGGCAUCAGAG ACAAAGCAGAGCGGCAGAACCAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGGCUU CGCCAAACAGAAACUUCAUUGCAGCUGAUCCACGAGCAGCCUGACCUUC AAGGAGGACAUCCAGAGGCCAGGUGAGCGGCCAGGGCGACAGCCUCC ACGAGCACAUCCGCCAACCUUGGCCGGCAGCCCCGCCAUCAAAGAGGGCAU	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 9 5】

CCUGCAGACCCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCAGA CACAAAGCCCGAGAAACAUCGUGAUCGAGAUUGGCCAGAGAGAAACCAGACCA CCCAGAAAGGCCAGAAAGAACAGCAAGAGAGAAUGAAAGAAUUCGAGGA GGGCAUCAAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAG AACACCCAGCUGCAGAACGAGAGCUGUACCUUAUACCUCCAGAACG GCAGAGACAUGUACGUGGACCCAGGAGCUGGACAUCACAGACUGAGCGA CUACGACGUGGACCAUACGUGCCCAAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC AUCGACAAACAAAGGUGCUGACCAAGAGCCAAAGAACAGAGGCCAAGAGCG ACAAAGUGCCCAAGCAGGAGGUGGUAAGAAAGAUAGAAACUACUUGGAG ACAGCUGCUGAACGCCAACGUGAUCACCCAGAGAAAGUUCGACAAACUUG ACCAAGGCCGAGAGAGGGGCCUGAGCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCA UCAAAGAGACAGCUGGUGGAGACCAAGACAGAUCAACCAAGCACGUGGCCA GAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAAGCUG AUCAGAGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGAGCAAGCUGGUGAGCGACU UCAGAAAGGACUUCAGAUUCUACAAGGUGAGAGAUCAACAACUACCA CCAGGCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGACCGCCUUGAUC AAGAAGUACCCAAAGCUGGAGAGCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAAGG UGUACGACGUGAGAAAGAUAGAUCCGCAAGAGCGAGCAGGAGAUCCGCAA GGCCACCCGCCAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUCAAAG ACCGAGAUCAACCUGGCCACCGGCGAGAUCAAGAAAGAGACCCUGAUCG AGACCAACGGCGAGACCGCGAGAUCCGUGUGGACAAAGGCGAGAGACUU CGCCACCCGUGAGAAAGGUGCUGAGCAUGCCCGAGGUGAACAUCCGUGAAG AAGACCGAGGUGCAGACCCGGCGGUUCAGCAAGGAGAGCAUCCUGCCCA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 9 6】

AGAGAAACAGCGACAAAGCUGAUCCGCCAGAGAAAAGGACUGGGACCCCAA GAAGUACGGCGGUUCGACACGCCCCACCGUGGCCUACAGCGUGCUGGUG GUGGCCAAGGUGGAGAAAGGCCAAGAGCAAGAGCUGAAGAGCGUGAAGG AGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGAGAGAGCAGCUUCGAGAGAGAACCC CAUCGACUUCUUGGAGGCCAAGGCCUACAAGGAGGUGAAGAGGACCUUG AUCAUCAAGCUGCCCAAGUACAGCCUUGUCCAGCUGGAGAACGGCAGAA AGAGAAUGCUGGCCAGCGCCGCGAGCUGCAGAAAGGCCAACGAGCUGGC CCUGCCCAGCAAGUACGUGAACUUCUUGUACUUGGCCAGCCACUACGAG AAGCUGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAAGAGCAGAGCAGCUGUUCGUGG AGCAGCACAAAGCACUACUUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUACGCGAGUU CAGCAAGAGAGUGAUCCUGGCCGAGCCACCUUGGACAAAGGUGCUGAGC GCCUACAAACAAGCACAGAGACAAGCCCCAUCAGAGAGCAGGCCGAGAACCA UCAUCCACCUGUUACCCUGACCAACCUUGGGCGCCCCCGCCUUCAA GUACUUCGACACCAUCCAGACAGAAAGAGAUACACGACACCAAGGAG GUGCUGGACCGCACCCUGAUCCACAGCAGCAUACCGGCCUGUACGAGA CCAGAAUCCGACCUAGCCAGCUGGGCGGCGAGCGGGCGGCGAGCCCAA GAAGAAAGAGAAAGGUGUACUAGCACCAAGCCUCAAAGAACCCCGA AUGG AGUCUCUAAAGCUACAUAUAACCAACUUAACACUUUACAAAUGUUGUCCC CCAAAUGUAGCCAUUCGUUUCUGCUUUUAAAAGAAAAGUUUUUUUC ACAUUCUCUCGAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAG AAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 9 7】

XBG UTR および表4の低 Aコドンを含む Cas9 O RFを有するm RNA転写産物	GGGAAAGCUCAGAAUAAAAGCUCUAAAUUUGGCGCGGAUCUGCCACCAUGGA CAAGAAAGUACUCCAUCCGGCCUGGACAUCGGCACCAACUCCGUGGGCUGG GCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGUGCCUCCAAAGAAUUAAGGUGC UGGGCAACACCGACCGGACUCCAUCAAGAAAGAAACUUAUCCGCGCCCU GCUGUUUGACUCCGGCGAGACCGCGAGGCCACCGGGGUGAAGCGGAGC GCCCGGGCGGUAACACCGCGGGAAGAACCGGAUCUUCUACCUCCAGG AGAUUUUUCACAGAGAUGGCCAGGUGGACGACUCCUUCUCCACCG GCUGGAGGAGUCCUUCUGGUGGAGGAGGACAAAGACAGCGGCGAC CCAUUUUUGGCAACAUUGUGGACGAGGUGGCCUACCAAGAGAAUAC CCACCAUCUACCAUCCGGGAAGAGCUGGUGGACUCCACCGACAAGC CGACUUGCGGCUGAUCUACUUGGCCUUGGCCCAUGAUCAAGUUCGG GGCAUUCUUGAUCGAGGGCGACUUAACCGGACAAUCCGACGUGG ACAAAGCUGUUUAUCCAGCUGGUGGACCAUACAAACAGCUUUGAGGA GAAACCAUCAAACGCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCGC CGGCUGUCCAAGUCCCGCGGCUUGGAGAACUUAUCCCGACUCCCG GGAGAGAAAGAACGGCCUUGUCCGGCAACUUAUCCGCGUCCCGG CCUGACCCCAACUUAAGUCCAAUUCGACUUGCCGAGGACGCGCAAG CUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUUGGACAAUCCUGG CCAGAUCCGGGACCAAGUACCGCGACCUUCCUUGGCCCGCAAGAACCU GUCCGACGCCAUCCUGCUUGUCCGACAUCCUGGGGUGAACACCGAGAU ACCAAGCCCCCUUGUCCGCUCCAUAGAUCAAGCGUACGACGACCC ACCAAGGACCUGACCCUUGUAGAGGCCUUGGCGGACGACUUGCCCGA GAAGUACAAAGGAGAUUUUUUUGGACCAAGUCCAAAGAACCGCGGC	37 7

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 9 8】

	UACAUCGACGGCGCGCCUCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUC AAGC CCAUCUGGAGAAUAUGGACGGCACCGAGGAGCUCUGGUGAAGCUGAA CCGGAGGACUCUGUGCGGAAAGCAGCGGACCUUCGACACCGGUCUUAUC CCCCACAGAUCCACCCUGGGGAGCUCACGCCAUCCUGCGGCGGCGAGG AGGACUUCUACCCUUCUGAAGGACACCGGGAGAAUAUCGAGAGAAU CCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCCCUGGCCCGGGGCAAC UCCCGUUCGCCUGGAGUACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUACCCCUU GGAACUUCGAGGAGGUGGAGACAAAGGGCGCCUCCGCCACAGUCCUUAU CGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAAGAACCUGCCAACGAGAGGUGGUG CCCAAGCACUCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACACGAGCUGA CCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCGCCUUCUUGUC CGCGAGCAGAAAGGACCAUCGUGGACCUUGUUAAGACCAACCGG AAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAAGAAAUUGAGU GCUUCGACUCCGUGGAGAUUCCGGCCUGGAGGACCGGUUCAAAGCCUC CCUGGCACCUACCAAGACCUUGCUGAAGAUCAUCAAAGACAAAGACUUC CUGGACAAAGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCCUGGUGACCC UGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUUAUCGAGGAGCGGCUUAGAGACCUA CGCCACCUUGUUCGACGACAAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGCGGCGG UACACCGGCUGGGCGCGGCUUGUCCCGGAGGCUUCAAAGCGCAUCCGGG ACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACUUCUGAAGUCCGACGGCUU CGCCAACCGGAACUUCAGCAGCUUAUCCAGGACCAUCCUUGACCUUC AAGGAGGACAUCCAGAAAGGCCAGGUGUCCGGCCAGGGGACUCCCGC ACGAGCACAUCCGCCAACCUUGGCCGCUCCCGCCCAUCAAAGAGGGCAU

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 4 9 9】

CCUGCAGACCCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGG CACAAAGCCCCGAGAAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCCGGGAGAAACAGACCA CCCAGAAAGGCCAGAAAGAACUCCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGA GGGCAUCAAAGGAGCUGGGCUCACAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAG AACACCCAGCUGCAGAACGAGAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACG GCCCCGACAUCUACUGGACCCAGGAGCUGGACAUCAAACCGGCUUCCGA CUACGACGUGGACCAUAUGUCCCCAGUCCUCCUGAAGGACGACUCC AUCGACAACAAGGUCUACCCGGUCCGACAAAGAACCGGGGCAAGUCCG ACAAAGUGCCCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAAGAUAGAAACUACUUGCG GCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUGGACAAACUG ACCAAGGCCGAGCCGGGCGGCUUGUCCGAGCUGGACAAGCCGGCUUCA UCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCAACCAAGCAGUGGCCA GAUCCUGGACUCCCGAUGAAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAAGCUG AUCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAAGCUGGUGUCCGACU UCCGGAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUGCGGAGAUCAACAACUACCA CCACGCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGUGGGCACGCCCUGAUC AAGAAUAACCCAAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAAG UGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAAGUCCGAGCAGGAGAUCCGCAA GGCCACCCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAAACAUCAUGAACUUCUCAA ACCGAGAUCAACCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAAGCGGCCUGAUCG AGACCAACGGCGAGACCGCGAGAUCCGUGGACAAAGGCCGGACUU CGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUUGCCCCAGGUGAACAUCCUGAAG AAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUCUCCAAAGGAGUCCAUCCUGCCCCA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 0 0】

AGCGGAACUCCGACAAAGCUGAUCCGCCCGGAAGAAAGGACUGGGACCCCAA GAAUAACGGCGGUUCGACUCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUG GUGGCCAAGGUGGAGAAAGGCCAAGUCCAAAGAAAGCUAAGUCCGUGAAGG AGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAAAGAACCC CAUCGACUUCUGGAGGCCAAGGCCUACAAAGAGGUAGAAAGGACCUUG AUCAUCAAGCUGCCCAAGUACUCCUGUUCGAGCUGGAGAACGCCCGGA AGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGCGAGCUCGCAAGAAAGGCAACGAGCUGGC CCUGCCCUCCAAAGUACGUGAACUUCUGUACCUUGGCCUCCCAUACGAG AAGCUGAAGGGCUCGCCCGAGGACAAAGAGCAGAAAGCAGCUGUUCGUGG AGCAGCAACAAGCACUACUUGGACGAGAUCAUUGAGCAGAUCCCGAGUU CUCCAAAGCGGGUGAUCCUGGCCGAGCCCAACUUGGACAAAGGUGCUGUCC GCCUACAACAAGCACCGGGACAAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACCA UCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUUGGGCGCCCGCCGCCUUCCAA GUACUUCGACACCAUCCAGCAGGAGCGGUAACCUCCACCAAGGAG GUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAAGUCCAUACCGGCCUGUACGAGA CCCGGAUCCGACCUUGUCCAGCUGGGCGGAGCGGCCGCCGCCCAA GAAGAAGCGGAAGGUGUACUAGCACCAAGCCUCAAGAACACCCGAAUGG AGUCUCUAAGCUACAUAUACCAACUUAACACUUAACAAAUGUUGUCCC CCAAAAGUAGCCAUUCGUUUCUGUCCUAAUAAAAGAAAGUUUUCUUC ACAUUCUCUCGAGAAAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 0 1】

XBG UTR および表 4 の低 U / Δコドン を有する Cas 9 ORF を有する mRNA 転写産 物	GGGAAGCUCAGAAUAAAGCCUCAAUUUGGCCGGGAUCUGCCACCAUGGA CAAAGAAUACAGCAUCGGCCUUGGACAUUGGCACCAACAGCGUGGCGUGG GCCGUGAUCACCGACGAGUAACAGGUGCCACGCAAGAAUUAAGGUGC UGGGCAACACCGACCGGCACAGCAUCAGAAAGAAACUUGAGCGGCCCU GCUGUUCGACAGCGCGGAGACCGCGGAGGCCACCGGCUAGAGCGGACC GCCCGCGCGGUAACACCGCGGAGAAACGGGAUCUGCUACCUCCAGG AGAUCUUCAGCAACGAGAUUGGCCAAGGUGGACGACAGCUUCUCCACCG GCUGGAGGAGAGCUUCUCCUGGUGGAGGAGGACAAAGAACGAGCGGCAC CCAUUCUCCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACACGAGAAAGUACC CCACCAUCUACCAUCUGCGGAAGAAGUGGUGGACAGCACCGACAAGGC CGACUUGCGGCUGAUCUACUUGGCCUUGGCCACAUGAUCAAGUUCGCG GGCAACUUCUGAUCGAGGGGACCUUGAACCCCGACAAACAGCGACGUGG ACAAGCUGUUCUUCACGCUUGGUGCAGACCUACAAACCAAGCUUCGAGGA GAACCCCAUCAAAGCGCGCGGUGGACGCAAGGCCAUCCUGAGCGCC CGGCUAGCAAGACCGCGCGGUGGAGAACUUGAUCCGCCAGCUCCCG GGAGAAAGAAACGGCCUGUUCGGCAACCUUGAUCCGCCUAGCCUGGG CCUGACCCCAACUUCAGAGCAACUUCGACCUUGGCCGAGGACGCCAAG CUGCAGCUGAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUUGGACAAACUUGCUG CCCAGAUCCGGGACCAUAACCGCACCUUGUUCUUGGCCGCCAAGAACCU GAGCGACGCCAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGCGGUGAACACCGAGAU ACCAAGGCCCCCUAGAGCGCACGAUGAUCAAGCGGUACGAGCGACAC ACCAGGACCUGACCCUCCUGAAGGCCCUUGGUGCGGACGACGUGCCCGA GAAGUACAAAGGAGAUUCUUCGACCAAGAGCAAGAACGGCUACGGCGC	37 8

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 0 2】

UACAUCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGUUUCACAAAGUUCAUCAAGC CCAUCUUGGAGAAAGAUUGGACGGCACCCGAGGAGCUCUGUGUGAAGCUGAA CCGGGAGGACCUUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACACACGGCAGCAUC CCCCACAGAUCCACUUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGCGCGCAGG AGGACUUUAACCCCUUCUGAAGGACAAACCGGAGAAAGAUCCGAGAAAGAU CCUGAACUUCCGGAUCCCUACUACGUGGGCCCCUGCCCCGGGCAAC AGCCGUUCCGCUUGGAUGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCAUACCCCU GGAACUUCGAGGAGGUGGACAAAGGCGCCAGCGCCACAGCUUCAU CGAGCGGAGUACCAACUUCCGACAAAGAACCUGCCAACGAGAAAGGUGCUG CCCAAGCACAGCCUGCUGUACGAGUAACUUCACCGUGUACAAAGAGCUGA CCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCCGAAGCCCCCUCCUGAG CGCGGAGCAGAAAGGCAUCGUGGACCUUGCUGUUCAGACCAACCGG AAGGUAACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAAGAAAGUAGAGU GCUUCGACAGCGUGGAGAUACGCGCGUGGAGGACCGGUUCAAACGCCAG CCUGGGCACCUACCAAGACCUUGCUGAAGAUCAUCAAAGACAAGGACUUC CUGGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCCUGUCCUACCC UGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUA CGCCCAACCUUGUUCGACGACAAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGCGCGG UACACCGGCUUGGGCGCGCUGAGCGGAAAGCUGAUCAAACGGCAUCCGGG ACAAGCAGAGCGGCAAGACCAUCCUGGACUUCUUGAAGAGCGACGGCUU CGCCAACCGGAACUUC AUGCAGCUGAUCCACGACGACGACCUAGCCUUC AAGGAGGACAUCCAGAAAGCCACAGGUGAGCGGCCAGGGCAGACCCUGC ACGAGCACAUCCGCCAACCUUGGCCGCGCAGCCCCGCCAUCAAAGAAAGGCAU	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 0 3】

CCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGG CACAAAGCCCGAGAAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAAACAGACCA CCAGAAAGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGA GGGCAUCAAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAGGAGCAACCCGUGGAG AACACCCAGCUGCAGAACGAGAGCUGUACCUUACUACUGCAGAACG GCCCCGACAUGUACGUGGACCAAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGAGCGA CUACGACGUGGACCAUAUCGUGCCCAAGAGCUUCUGAAGGACGACAGC AUCGACAAACAAGGUGCUGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGCCAAAGCG ACAACGUGCCCAAGCGAGGAGGUGUAGAAAGAAAGAUAGAACUACUGGGC GCAGCUGCUGAACGCCAACGUGAUCACCCAGCCGAAGUUCGACAAACUG ACCAAGGCCGAGCGGGCGGCCUGAGCGAGCUGGACAAGCGCGGUUCA UCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCAACAAGCACGUGGCCCA GAUCCUGGACACAGCCGGAUGAAACCAAGUACGACGAGAAACGACAAAGCUG AUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGAGCAAGCUGGUGAGCGACU UCCGGAAGGACUUCACAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCA CCAGCCCAAGACGCCUACCUGAACCGCGUGGUGGGCACCGCCUGAUC AAGAAAUACCCAAAGCUGGAGAGCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAAGG UGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCCGCAAGAGCGAGCAGGAGUCCGGCAA GGCCACCGCCAAGUACUUCUUCACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAAG ACCGAGAUACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAGCGGCCCGCGAUCG AGACCAACGGCGAGACCGCGAGAUCCGUGGGACAAGGCCCGGACUU CGCCACCGGUGCGGAAGGUGCUGAGCAUGGCCCGCAGGUAACAUCGUGAAG AAGACCGAGGUGCAGACCCGGCGGCUUCAGCAAGGAGAGCAUCCUGCCCA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 0 4】

AGCGGAACAGCGACAAAGCCUGAUCGCCCGGAAGAAAGGACUUGGGACCCCAA GAAGUACGGCGGCUUCGACACAGCCCCACCGUGGCCUACAGCGUGCGUGGUG GUGGCCAAGGUGGAGAAAGGCAAGAGCAAGAAAGCUGAAGAGCGGUGAAGG AGCUGCUGGGCAUCACCAUCUAGGAGCGGAGCAGCUCUGGAGAAAGAACCC CAUCGACUUCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAGGACCUUG AUCAUCAAGCUGCCCAAGUACAGCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCCGGA AGCGGAUGCUGGCCAGCGCCGGCGAGCUCGACAGAAAGGCAACGAGCUGGC CCUGCCAGCAAGUACGUGAACUUCUGUACCUUGGCCAGCCACUACGAG AAGCUGAAGGCGAGCCCGGAGGACACAGAGCAGAAAGCAGCUGUUCGUGG AGCAGCAACAAGCACUACCUUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAAGCGAGUU CAGCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGAGCCCAACCUUGGACAAAGGUCUGAGC GCCUACAAACAAGCACCGGGACAAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACCA UCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUUGGGCGCCCGCCGCUUCAA GUACUUCGACACCAACUAGACCGGAGCGGUAACACAGCACCAAGGAG GUGCUGGACGCCACCCUGAUCACCAAGAGCAUACCGGCCUGUACGAGA CCCGGAUCCGACCUAGCCAGCUGGGCGGGAGCGGCCGCGAGCCCAA GAAGAAGCGGAAGGUGUGACUAGCACCAAGCCUCAAAGAACACCCGAUUG AGUCUCUAAGCUACAUAUACCAACUUAACUUAACAAAUGUUGUCCC CCAAAUGUAGCCAUUCGUUUCUGCUCCUAAUAAAAGAAAGUUUCUUC ACAUUCUCUCGAGAAAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

10

20

30

40

50

7	3	6

HiBitタグ、HSD	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTCTG	37
5' UTRおよびヒトALB	TTGCAGGCCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAAGATACAGCATCG	9
3' UTRを有するCas 9をコードするORFを有するmRNA転写産物	GACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGA ATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGTCCCTGGGAACACAGACAGA CACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCCGACGGGAG AAACAGCAGAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAATACAC AAGAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTACCTGCAGGAAAATCTTCAGCAACGAA ATGGCAAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCC TGGTCGAAGAAGACAAAGAAAGCAGAAAGACACCCGATCTTCGGAACCAT CGTCGACGAAGTCGCATACCAACGAAAGTACCCGACAAATCTACCACTG AGAAAGAGCTGGTCGACAGCAGACAGAGGACACTGAGACTGATCT ACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCCTGATCGA AGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCAGCAGTCGACAAAGCTGTTCAATCCAG CTGGTCCAGACATACAAACCAGCTGTTCGAAGAAACCCGATCAACGCAA GCGGAGTCGACGCAAGGCAATCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAG AAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAGAAAGACCGA CTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAATCTCA AGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGA CACATACGACGACGACCTGGACAAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCCAG TACGCAGACCTGTTCCCTGGCAGCAAAAGAACCTGAGCGACGCAATCTCTGC TGAGCCACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCAACAAGGCACCGCTGAG CGAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCAAGGACCTGACACTG CTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAGATCAAGGAAATCT	

30

40

【表 4 3 - 5 0 6】

TCTTCGACCAGAGCAAGAAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGC AAGCCAGGAAGAAATTCTACAAGTTCAATCAAGCCGATCCTGGAAAAAGATG GACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGA GAAAGCAGAGAACATTCGACAAACGGAAAGCATCCCGCACAGATCCACCT GGAGAACTGCACCGCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTT CTGAAGGACAAACAGAGAAAGATCGAAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCC CGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCCGATGGAT GACAAAGAAAGAGCGAAGAAACATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAAGTC GTCGACAAAGGGAGCAAGCCACAGAGCTTCATCGAAAGAAATGACAAACT TCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAAGGTCTCTCCGAAAGCACAGCCTGCT GTACGAAATAC'TTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTC ACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGG CAATCGTCGACCTGCTGTCAAGACAAACAGAAAGGTCAAGTCAAGCA GCTGAAGGAAGACTACTTCAAAGAAAGATCGAAATGCTTCGACAGCGTCGAA ATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCAAG ACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAAGAAAA CGAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTCGAAGAC AGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACG ACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAAATACACAGGATGGGGAAAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAG ACAACTCCTGGACTTCCTGAAGAGCCAGCGATTCCGAAACAGAAACTCA TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAGGAAGACATCCAGAA GGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCAACGAAACATCGCAAAAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 0 7】

CTGGCAGGAAGCCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGG TCGTGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACCAAGCCGGGAAAACAT CGTCATCGAAATGGCAGAGAAAACCCAGCACCACAGAAAGGACAGAAAG AACAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAGAGAAATCAAGGAATCTGG GAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAACACACACAGCTGCAGAA CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACCGAAGAGACATGTACGTC GACCAAGGAATCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCCACA TCGTCCCCGACAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAAAGTCTCT GACAAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAGAGCGACAAAGTCCCAGAGCGAA GAAGTCGTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAA AGCTGATCACACAGAGAAAAGTTCCAGCAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGG AGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTC GAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAA TGAAACACAAGTACGACGAAAACGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGT CATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAAGGACTTCCAG TTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCAACGACACGACAGCGCAT ACCTGAACGCGAGTCGTGGAAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCGAAGCT GGAAGCGGAATTGCTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAG ATGATCGCAAGAGCGGAACAGGAATTCGGAAAGGCACAGCAAGTACT TCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGC AAACGGAGAAAATCAGAAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAAACGGAGAAACA GGAGAAAATCGTCTGGGACAAAGGAAGAGACTTCGCCAACAGTCAGAAAGG TCCTGAGCATGCCGCGAGGTCAACATCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 0 8】

AGGAGGATTTCAGCAAGGAAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAAG CTGATCGCAAGAAAAGGACTGGGACCCGGAAGAAAGTACGGAGGATTTCG ACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAAGGTCGAAAA GGGAAAGAGCAAGAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACCTGCTGGGAATCACA ATCATGGAAAAGAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAAG CAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA GTACAGCCTGTTCCGAACCTGGAAAACGGAAAGAAAGAAATGCTGGCAAGC GCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACG TCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGAAAGCCC GGAAGACAACGAAACAGAAAGCAGCTGTTGTCGAAACAGCAAGCACTAC CTGGACGAAAATCATCGAAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCC TGGCAGACGCAAACTGGACAAAGGTCTGAGCGCATACAAACAAGCACAG AGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCAACA CTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAAGTACTTCGACACAAACAA TCGACAGAAAAGAGATACACAAGCAAAAAGGAAGTCTCGACGCAACACT GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAAATCGACCTGAGC CAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAAGCCCGAAGAAAGAAAGAGAAAGGTCA GCGAAAGGCAACACCGGAAAAGCGTCAGCGGATGGAGACTGTTCAAGAA GATCAGCTAGCTAGCCATCACTTTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAG AATAAGAGAAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCTCTCTCTTTCTTT TTTTCGTTGGTGTAAAGCCAAACACCCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTT AATCATTTTTCCTCTTTTCTCTCTGCTTCAATTAAATAAAATGGAAAG	

10

20

30

40

50

	AACCTCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

20

40

50

【表 4 3 - 5 1 0】

HiBiTク グ、CMV-1 5' UTRおよび びトALB 3' UTRを有 するCas9を コードするOR Fを有するmR NA転写産物	GGGCAGATCGCCCTGGAGACGCCCATCCACGCTGTTTTTGACCTCCATCGCC ACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCG TCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAAATACAAAGTCCCAGCAAGAAGTT CAAAGTCCCTGGGAAACACAGACACACAGCATCAAGAAACCTGATC GGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGACAGCAACAAAGACTGA AGAGAACAGCAAGAGAAGATACACAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTA CCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGTCGACGACAGCTTC TTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGCTGCGAAGAAAGCAAGAAAGCAG AAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAAGTCGCTACCCACGA AAAGTACCCGACAAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACA GACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAG CGACGTCGACAAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTG TTCGAAAGAAACCCGATCAACGCAAAGCGAGTCGACGCAAGGCAATCC TGAGCGCAAGACTGAGCAAGACAGCAAGACTGGAAACCTGATCGCACCA GCTGCCCGGAGAAAAGAAACCGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTG AGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAG ACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAA CCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGCA AAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACA CAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGA CGAACACCAAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAG CTGCCGGAAAAGTACAAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 1 1】

ACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATCTACAAAGTT CATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTC AAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAAACATTCGACAAACG GAAGCATCCCGCACAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCCAATCCTGAG AAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATC GAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAA GAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAAAT CACACCGTGGAACCTCGAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGGCCACAG AGCTTCATCGAAAAGAAATGACAAAACCTTCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAA AGTCCCTGCCGAAGCACAGCCCTGCTGTACGAATACCTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCA TTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGA CAAAACAGAAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAA GATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCT AAGCAAGCCCTGGAAACATACCAACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACA AGGACTTCCCTGGACAAACGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAGACATCGT CCTGACACTGACACTGTTCTGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTG AAGACATACGCACACCTGTTCTGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGA GAGAAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGG AATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGAAAGCAATCCTGGACTTCTGTGAAGAGC GACGGATTCCGCAAAACAGAAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCC TGACATTCAGGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTGAGCGGACAGGGAGA CAGCCTGCACGAAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 1 2】

AAAGGGAATCCGTGCAGACAGTCAAGGTCGTTCGACGAACTGGTCAAGGTCA TGGGAAGACACAAGCCGGAAAAACAATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAA CCAGACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGA ATCGAAGAAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC CGGTCCGAAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAAACGGAAGAGACATGTACGTCCGACAGGAACTGGACATCAACAGA CTGAGCGACTACGACGTCGACCCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGG ACGACAGCATCGACAAACAAGTCCGTGACAAAGAACGACAAAGAACAGAGG AAAGAGCGACAACTGTCGCGAGCGAAGAGTCTGTCAGAAAGATGAAGAAC TACTGGAGACAGCTGCTGAAACGCAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCG ACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAAGCC AGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAAGCAC GTCCGACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACCG ACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCATCACCCTGAAAGCAAGCTGGT CAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTCAAGAGAAATCAAC AACTACCAACCCACACAGACGCAATACCTGAACGCACTCGTCGGAACAG CACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAGCGAAATTCGTCTACGGAGA CTACAAAGGTCACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAA ATCGGAAGAGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACT TCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACC GCTGATCGAAACAAACCGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGA AGAGACTTCGCCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACA TCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCAT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 1 3】

	CCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGG GACCCGAAAGAAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCAATACAGCG TCCTGGTCGTGCGCAAGGTCGAAAGGAAAGGAAAGAGCAAGCTGAAGAG CGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAGAAAGACAGCTTCGAA AAGAACCCGATCGACTTCCTGGAGCAAGGATACAAAGGAAGTCAAGA AGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTGGAACCTGGA CGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAAACTGCAGAAAGGAAAC GAACCTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCC ACTACGAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGAAACAGAAAGCAGCT GTTCGTCGAAACAGCACAGCAAGCACTACCTGGAGGAAATCATCGAACAGATC AGCGAATTTCAGCAAGAGAGTCACTCTGGCAGACGCCAAACCTGGACAAAG TCCTGAGCGCATACAAACAAAGCACAGAGACAAAGCCGATCAGAGAAACAGGC AGAAAACATCATCCACCTGTTCCACACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCA GCATTCAAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCA CAAGGAAGTCCTGGAGGCAACACACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGACT GTACGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGA AGCCCGAAGAAAGAGAAAGGTCAGCCGAAAGCGCAACACCCGAAAGCG TCAGCGGATGGAGACTGTTCAAGAAGATCAGCTAGCTAGCCATCACATT TAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAGAGAAAGAAATGAAAGATC AATAGCTTATTCATCTCTTTTCTTTTCTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCAAACCC CTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAAATCATTTTGCCTCTTTCTCTGT GCTTCAATTATAAAAAATCGAAAGAACCTCGAGAAAAA

10

20

30

40

50

[illegible]

20

40

50

【表 4 3 - 5 1 5】

HiBiTク グ、CMV-2 5' UTRおよび びトALB 3' UTRを有 するCas 9を コードするOR Fを有するmR NA転写産物	GGGAGAAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGCGCC ACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCG TCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATTACAAAGTCCCGAGCAAGAAAGTT CAAAGTCTCTGGGAACACAGACACAGACATCAGCATCAAGAAACCTGATC GGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAGCAACAAAGACTGA AGAGAAACAGCAAGAAAGATACACAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTA CCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAGGTCGACGACAGCTTC TTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTCTGGTCGAAAGAAAGAAAGAACG AAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCTCGTGGACGAAAGTCGCATACCCACGA AAAGTACCCGACAAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACA GACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA AGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAG CGACGTCGACAAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACCAAGCTG TTCGAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCC TGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAA GCTGCCCGGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTGGAAACCTGATCGCACTG AGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAG ACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAA CCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCA AAGAACTGAGCGAGCGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACA CAGAAATCACAAAGGACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGA CGAACACCAACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAG CTGCCGGAAAGTACAAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGAAACGGAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 1 6】

ACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCTACAAAGTT CATCAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTC AAGCTGAACAGAGAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAAACG GAAGCATCCCGACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCCAATCCTGAG AAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACACACAGAGAAAAAGATC GAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCCCTGGCAA GAGGAAACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAAAT CACACCGTGGAACTTCGAAAGAAAGTCGTGACAAAGGAGCAGCGCACAG AGCTTCATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACCTGCCGAAACGAAA AGGTCCCTGCCGAAGCACAGCCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACACAGAAAGAAATGAGAAAGCCGGCA TTCTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGA CAAAACAGAAAGGTACACAGTCAAGCAGCTGAAAGGAAGACTACTTCAAGAA GATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCTC AACGCAAGCCCTGGGAACATACCAACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACA AGGACTTCCTGGACAAAGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAGACATCGT CCTGACACTGACACTGTTTCGAAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTG AAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGGTCTATGAAGCAGCTGAAGA GAAGAAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGG AATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCTGAAAGAGC GACGGATTCCGAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCC TGACATTCAAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTACGCGGACAGGGAGA CAGCCTGCACGAAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAG	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 1 7】

AAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCCGTGACGAACTGGTCAAGGTCA TGGGAAGACACAAAGCCGGAAAACAATCGTCATCGAAATGGCAAAGAAAA CCAGACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCACAGAAAGAAATGAAAGAGA ATCGAAGAAAGGAATCAAGGAATCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACC CGGTGGAACAACACAGCTGCAGAACGAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAAAGGAAGAGACATGTACGTGACCCAGGAACCTGGACATCAACAGA CTGAGCGACTACGACGTGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAAGG ACGACAGCATCGACAAACAAAGTCTTGACAAAGAAAGCAAGAACAGAGG AAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCTCAAGAAAGTGAAGAAC TACTGGAGACAGCTGCTGAAAGCAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTGG ACAACTTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAAGGC AGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCACAAAGCAC GTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACCG ACAAAGCTGATCAGAGAAATCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGT CAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAAC AACTACCAACACGACACAGACGCAATACCTGAACGCACTCGTGGAAACAG CACTGATCAAGAAAGTACCCGAAGCTGGAAGCGAAATTCGTCTACGGAGA CTACAAAGGCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAGAGCGAACAGGAA ATCGGAAGGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACT TCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAAGAAAGAGACC GCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGA AGAGACTTCGCCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACA TCGTCAAGAAAGACAGAAATCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCAT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 1 8】

CCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAGGACTGG GACCCGAAGAAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCG TCCTGGTCGTGCAAAAGGTCGAAAGGAAAGAGCAAGAGCTGAAGAG CGTCAAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAA AAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAGGGATACAAAGGAAGTCAAGA AGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTGGAACCTGGA CGAAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGA GAACCTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCC ACTACGAAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGAAACAGAAAGCAGCT GTTGGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATC AGCGAATTCAGCAAGAGAGTCACTCCTGGCAGACGCAACCTGGACAAAG TCCTGAGCGCATACAAACAAAGCACAGAGACAAAGCCGATCAGAGAAACAGGC AGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCA GCATTCAAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCA CAAGGAAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGGATCACAGGACT GTACGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGA AGCCCCGAAGAAAGAGAAAGGTCAGCGAAAGCGCAACACCCGAAAGCG TCAGCCGATGGAGACTGTTCAAGAAGATCAGCTAGCTAGCCATCACATT TAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAGAGAAAGAAATGAAAGATC AATAGCTTATTCTCTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTT CTGTCTAAAAAACATAAAATTTCTTTTAAATCAATTTTGGCTCTTTTCTGT GCTTCAATTAAATAAAATGGAAAGAACCTCGAGAAAAA	

10

20

30

40

50

50

【表 4 3 - 5 2 0】

HiBiTタ グ、CMV-3 5' UTRおよび ヒトALB 3' UTRを有 するCas9を コードするOR Fを有するmR NA転写産物	38 2
	GGGTGCATTGGAAACGGCGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACTCACCGCGCC ACCATGGACAAAGTAACAGCATCGGACTGGACATCGGAAACAAACAGCG TCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAAGTCCCCGAGCAAGAAAGTT CAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATC GGAGCACTGCTGTTCCACAGCGGAGAAACAGCAGAACCAACAGACTGA AGAGAACAGCAAGAAAGATACACAAAGAAAGAAACAGAAATCTGCTA CCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGTCCGACGACAGCTTC TTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGTGTCGAAAGACAAAGAAAGCAG AAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCAACGA AAAGTACCCGACAACTCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACA GACAAAGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCAACATGATCA AGTTCAGAGGACACTTCTGTATCGAAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAG CGACGTCGACAAAGCTGTTCTATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACCAAGCTG TTCGAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGCAATCC TGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAA GCTGCCGGGAGAAAGAAAGAACCGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTG AGCCTGGGACTGACACCCGAACCTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAG ACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAA CCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGACAGACCTGTTCTCTGGCAGCA AAGAACTGTAGCGGACGCAATCTCTGTGTGAGCGACATCTCTGAGAGTCACCA CAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGA CGAACACCAACGAGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAG CTGCCGGAAGATACAAAGGAATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGAAACGGAT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 2 1】

	ACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCTACAAGTT CATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTC AAGCTGAAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAAGAAATTCGACAAACG GAAGCATCCCGCACACAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAG AAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATC GAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAA GAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAAAT CACACCGTGGAACTTCGAAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAG AGCTTCATCGAAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACTTCCGAAACGAAA AGGTCCTGCCGAAGCACAGCCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAAC TGACAAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAAGAAATGAGAAAGCCGGCA TTCTTGAGCGGAGAAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAAGA CAAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAAGACTACTTCAAAGAA GATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCTC AAGCAAGCCCTGGAAACATACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACA AGGACTTCCCTGGACAAACGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAGACATCGT CCTGACACTGACACTGTTTCGAAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTG AAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGA GAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGG AATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCTGAAAGAGC GACGGATTTCGCAACACAGAAACTTCATGACAGCTGATCCACGACGACAGCC TGACATTCAAAGGAAGACATCCAGAAAGGCAAGGTGACGGGACAGGGAGA CAGCCTGCACGAAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 2 2】

AAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAAGGTCA TGGGAAGACACAAAGCCGGAATAACATCGTCAATCGAATATGGCAAGAGAAAA CCAGACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGA ATCGAAGAAAGGAATCAAAGGAAGTGGGAAGCCAGATCCTGAAAGGAACACCC CGGTCCGAAAAACACACAGCTGCAGAACCGAAAAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAAACGGGAAGAGACATGTACGTCCGACCAAGAACTGGACATCAACAGA CTGAGCGACTACGACGTCCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAAGG ACGACAGCATCGACAAACAAAGTCTCTGACAAAGAAAGCGAACAGAGAGG AAAGAGCGACAAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCTGTCAGAAAGATGAAGAAAC TACTGGAGACAGCTGCTGAAACGCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCC ACAACTGACAAAGGCAGAGAGAGAGGAGACTGAGCGAACTGGACAAAGGC AGGATTCATCAAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCACAAAGCAC GTCGCACAGATCCTGGACAGCAGATGAACACAAAGTACGACGAAACAG ACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAAGTCAATCACTGAAAGCAAGCTGGT CAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAAC AACTACCAACACCGCACACGACATACCTGAACCGAGTCCTCGGAACAG CACTGATCAAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAGCGAATTCGTCTACGGAGA CTACAAAGGTCTACGACGTCAAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGA ATCGGAAGAGCAACAGCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACT TCTTCAAAGACAGAAATCACACTGGCAACCGGAGAAATCAGAAAGAGACC GCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGA AGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGAGCAATGCCGACAGGTCAACA TCGTCAAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCAT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 2 3】

CCTGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAAGGACTGG GACCCGAAGAAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCG TCCTGGTCGTCGCAAGGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAGCTGAAGAG CGTCAAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAGAGAGCAGCTTCGAA AAGACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAGGATACAAAGGAAGTCAAGA AGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAAGTGGAAAA CGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAC GAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCC ACTAGGAAGAAGCTGAAGGGAAGCCGGGAAGACAACGAACAGAAAGCAGCT GTTGGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATC AGCGAAATTCAGCAAGAGAGTCACTCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAGG TCCTGAGCGCATACAAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACACAGGC AGAAAACATCATCCACCTGTTCACTGACAAAACCTGGGAGCACCCGCA GCATTCAAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCA CAAGGAAGTCCTGGACGCAAACTGATCCACCAAGAGCATCACAGGACT GTACGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGA AGCCCGAAGAAAGAGAAAGGTCAGCGAAAGCGCAACACCGGAAAGCG TCAGCGGATGGAGACTGTTCAAGAAAGATCAGCTAGCTAGCCATCACATT TAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAGAGAAAGAAATGAAAGATC AATAGCTTATTCACTCTCTTTTCTTTTAAATCATTTTGCCCTCTTCTCTGT CTGTCATAAAAAACATAAAATTTCTTTTAAATCATTTTGCCCTCTTCTCTGT GCTTCAAATTAATAAAAAATGGAAGAACCTCCAGAAAAAATAAAAAA	

10

20

30

40

50

[illegible]

50

【表 4 3 - 5 2 5】

H i B i t タ ク、H B A 5' U T R およ びヒト A L B 3' U T R を有 する C a s 9 を コードする O R F を有する m R N A 転写産物	GGGCATAAACCCCTGGCGCGCTCGCGGCCCGGCCCACTCTTCTGGTCCCCAC AGACTCAGAGAGAAACCCACCCGCGCCACCATGGACAAAGATACAGCATCG GACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCACTCATCACAGACGA ATACAAAGGTCCCGAGCAAGAAGTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGA CACAGCATCAAGAGAACCCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAG AAACAGCAGAAAGCAACAAAGACTGAAGAGAAGCAAGAAAGATACAC AAGAAAGAAAGAACAGAAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAA ATGGCAAAAGTCCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGGCTTCC TGGTCGAAGAGACAAAGAAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACAT CGTCGACGAAGTCGCA'TACCAAGAAAAGTACCCGACAATCTACCACTG AGAAAGAAAGCTGGTCCACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCT ACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTGTATCGA AGGAGACCTGAACCCCGACAAACAGCGACGTCGACAAAGCTGTTCATCCAG CTGGTCCAGACATACAAACCAAGCTGTTCGAAGAAACCCGATCAACGCAA GGGAGTCGACCGCAAGGCAATCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAG AAGACTGGAAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAGAAAGAACGGA CTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCCGAACCTCA AGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGA CACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGATCGGAGACCCAG TACGCAGACCTGTTCTTGGCAGCAAAAGAACTGAGCGACGCAATCTCTGC TGAGCGACATCTCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCCGCTGAG CCCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCAACGAGACCTGACACTG CTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAGATACAAAGGAAATCT

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 2 6】

TCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGC AAGCCAGGAAGAAATTCACAAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAAGATG GACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGA GAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAAAGCATCCCGCACAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACAGAAAGACTTCTACCCGTTTC CTGAAGGACAAACAGAGAAAAAGATCGAAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCC CGTACTACGTCCGACCCCTGGCAAGAGGAAAAACAGCAGATTCGCATGGAT GACAAAGAAAGAGCGAAAGAAACAAATCAACCCGTGGAACTTCGAAAGAAAGTC GTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAATGACAAACT TCGACAAAGAACCTGCCGAACCGAAAAGGTCTCTGCCGAAGCACAGCCTGCT GTACGAAATACTTACAGTCTACAAAGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTC ACAGAAAGGAATGAGAAAGCCCGGCAATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGAGG CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAACAGTCAAGCA GCTGAAGGAAGACTACTTCAAAGAAAGATCGAAATGCTTCGACAGCGTCGAA ATCAGCCGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACG ACCCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAAACGAAAGAAA CGAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCTGTGACACTGACACTGTTCGAAAGAC AGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACG ACAAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAAATACACAGGATGGGGAAAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAAGCAGCGGAAAG ACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCCAAACAGAAACTTCA TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAAGGAAGACATCCAGAA GGCACAGGTCAGCCGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAACACATCGCAAAAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 2 7】

CTGGCAGGAAGCCCCGGCAATCAAGAAGGGAAATCCTGCAGACAGTCAAGG TCGTGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAAGCCGGAAAAACAT CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAACCAAGCAACACAGAAAGGACAGAAAG AACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAAGAAATCAAGGAACCTGG GAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAACACACAGCTGCAGAA CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAAGAGACATGTACGTC GACCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCCACA TCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAAAGTCCCT GACAAAGAAGCGACAAAGAACAGAGGAAGAGCGACAAAGTCCCGAGCGAA GAAGTCGTCAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACCCAA AGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCGACAACTGACAAAGGCAGAGAGGG AGGACTGAGCGAATCTGGACAAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTC GAAACAAAGACAGATCACAAAGCACGTCCGACACAGATCCTGGACAGCAGAA TGAACACAAAGTACGACGAAACGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGT CATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAG TTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCAACGACACAGACGGCAT ACCTGAACGCAAGTCGTCCGAAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCGAAAGCT GGAAAGCGAAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAG ATGATCGCAAAAGAGCGAAACAGGAAATCGGAAAGGCACACGCAAGTACT TCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCTTCAAGACAGAAATCACACCTGGC AAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGG TCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGAC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 2 8】

AGGAGGATTTCAGCAAGGAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAAG CTGATCGCAAGAAAAGGACTGGGACCCGGAAGAAAGTACGGAGGATTTCG ACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCCTGGTCGTCGAAAGGTCGAAAA GGGAAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACCTGCTGGGAATCACAA ATCATGGAAGAAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAG CAAAAGGATACAAGGAAGTCAAGAAAGGACCTGATCA'TCAAGCTGCCGAA GTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAAACGGAAAGAAAGAAATGCTGGCAAGC GCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACG TCAACTTCCTGTACTCCTGGCAAGCCACTACGAAAAAGCTGAAGGGAAGCCC GGAAGACAACGAACAGAAAGCAGCTGTTCTCGAACAGCAACAAGCACTAC CTGGACGAAATCATCGAAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCA'TCC TGGCAGACGCAAAACCTGGACAAAGTCCCTGAGCGCATACAAACAAAGCACAG AGACAAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAAACATCATCCACCTGTTCAACA CTGACAAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAAGTACTTCGACACAAACAA TCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAAGAAAGTCC'TGGACGCAACACT GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAAACAAGAAATCGACCTGAGC CAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAAGAAAGAAAGAAAGGTCA GCGAAAGCGCAACACCCGGAAGCGTCAGCGGATGGAGACTGTTCAAGAA GATCAGCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAG AATAAGAGAAAAGAAAATGAAAGATCAATAGCTTATTCA'TCTCTTTCTTT TTTCTGTTGGTGTAAAAGCCAAACACCCCTGTC'TAAAAAACATAAATTTCTTT AATCATTTTGGCCTCTTTTCTCTGTCCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAG	

10

20

30

40

50

	AACCTCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

50

【表 4 3 - 5 3 0】

HiBiTク グ、HBB 5' UTRおよび びヒトALB 3' UTRを有 するCas 9を コードするOR Fを有するmR NA転写産物	GGGACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCACCTAGCAAACTCATAACAGACAG CACCGGATCTCGCCACCATGGACAAAGTAAGTACAGCATCGGACTGGACAT CGGAAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCAATCACAGACGAAATACAGGTC CCGAGCAAGAAAGTTCAAGGTCCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCA AGAAGAACTGATCGGAGCACCTGCTGTTCCGACAGCCGGAGAAACAGCAGA AGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAAGATACACAAGAAAGAAAG AACAGAACTCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGG TCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCCCTGGTCGAAAGA AGACAAAGAAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAA GTCCGATACCAAGAAAGTACCCGACAACTACCACTGAGAAAGAAAGC TGGTCGACAGCACAGACAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACT GGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCCTGATCGAAGGAGACCTG AACCCGGACAAACAGCGACGTCGACAAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGA CATACAAACAGCTGTTCCGAAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGA CGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGACAGCAAGACTGGAA AACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAAGAAAGAAAGAAAGCTGTTCCGAA ACCTGATCGCACTGAGCTGGGACTGACACCCGAACTTCAAGAGCAACTT CGACCTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGAC GACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGATCGGAGACCACTACGCAAGCC TGTTCTCTGGCAGCAAGAACTGAGCGAGCAATCCTGCTGAGCGGACAT CCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCAACGCTGAGCGCAAGCATG ATCAAGAGATACGACGAAACACCAAGGACCTGACACTGCTGAAGGCAC TGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAGTACAAAGGAAATCTTCTTCGACCA

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 3 1】

GAGCAAGAAACGGATACGCCAGGATACATCGACGGAGGAGCCAAAGCCACAGGAA GAATTCTACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAG AAGAACTGCTGCTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAG AACATTCCGACAAACGGAAAGCATCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTG CACGCCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGACATTCTACCCGTTCTGAAAGGACA ACAGAGAAAGATCGAAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGT CGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAG AGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAAGAAAGTCGTCGACAAAGG GAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAAGATGACAAACTTCGACAAAGAA CCTGCCGAAACGAAAAAGGTCCCTGCCGAAGCACAGCCCTGCTGTACGAATAC TTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACACAGAAAGGAA TGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCGA CCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTACAGTCAAGTCAAGCAGCTGAAAGGAA GACTACTTCAAGAAAGATCGAAATGCTTCGACACGCTCGAAATCAGCGGGAG TCGAAAGACAGATTCAACGCAAGCCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAA GATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACACCGAAGAAACGAAAGACATC CTGGAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGTTTCGAAAGACAGAGAAATGA TCGAAAGAAAGACTGAAAGACATACGCCACACCTGTTTCGACGACAAAGGTCT GAAAGCAGCTGAAAGAAAGAAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGA AAGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGG ACTTCCTGAAGAGCGGACCGATTCCGCAAAACAGAAACTTCATGCAGCTGAT CCAGGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAAGACATCCAGAAAGGACAGGTC AGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 3 2】

GCCCGGCAATCAAGAAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGA ACTGGTCAAGGT CATGGGAAGACACAAAGCCGGAAACATCGTCAATCGAA ATGGCAAGAGAAACCCAGACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAG AAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGAT CCTGAAGGAACACCCGGTCGAAACACACAGCTGCAGAACGAAAGCTG TACCTGTACTACCTGCAGAACCGAAGAGACATGTACCTCCAGCCAGGAAC TGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCAATCGTCCCGCA GAGCTTCTGAAAGGACGACAGCATCGACAAACAAAGGTCTGACAAAGAAC GACAAAGAACAGAGGAAGAGCGGACAAAGTCCCGAGCGAAGAAAGTCGTCA AGAAATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAGCTGATCAC ACAGAGAAAGTTCCGACAACTGACAAAGGACAGAGAGAGAGGACTGAGC GAACCTGGACAAAGGACAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGAC AGATCACAAAGCACGTGCGACACAGATCCTGGACACAGAAATGAAACCAAA GTACGACGAAACCGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTG AAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGG TCAGAGAAATCAACAACTACCAACCGCACAGGACGATACCTGAACGC AGTCGTCGGAAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCGAAGCTGGAAGCGAA TTCGTCTACGGAGACTACAAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAA AGAGCGAACAGGAATCGGAAGGCAACAGCAAGTACTTCTTCTACAG CAACATCATGAACCTTCTCAAGACAGAAATCACACTGGCAACCGGAGAA ATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCG TCTGGGACAAAGGAAAGAGACTTCGCAACAGTCAAGAAAGTCTCTGAGCAT GCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGATTCTC	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 3 3】

AGCAAAGGAAAAGCATCCTGCCCAGAAAGAGAAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAA GAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAAGAAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGAC AGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAAGTCCGAAAAGGAAAAGAGC AAGAAAGCTGAAGAGCGTCAAAGGAACTGCTGGGAAATCACAATCATGGAAA GAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAAGGATA CAAGGAAGTCAAAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTG TTCGAACTGGAAAACGGAAAGAAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAAC TGCAGAAAGGAAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCT GTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAAC GAACAGAAAGCAGCTGTTCTGTCGAAACAGCACACAAGCACTACCTGGACGAAA TCATCGAAACAGATCAGCGAAATTCAGCAAGAGAGTCACTCCTGCCAGACGC AAACCTGGACAAAGTCCTGAGCGCATACAACAAAGCACAGAGACAAAGCCG ATCAGAGAAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACC TGGGAGCACCCGGCAGCATTCAAAGTACTTCGACACACAATCGACAGAAA GAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACCCAG AGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAG GAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAAGAAAGAAAGTCAAGCGAAAAGCGC AACACCGGAAAGCGTCAGCGGATGGAGACTGTTCAAGAAATCAGCTAG CTAGCCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAAGAGAA AGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTCTTTTCTGTTGGT GTAAAGCCCAACACCCTGCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTG CCTCTTTTCTCTCTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAGAACCTCGAGA	

10

20

30

40

50

[illegible]

50

【表 4 3 - 5 3 5】

HiBitタグ、XBG 5' UTRおよびヒトALB 3' UTRを含むCas9コードするORFを有するmRNA転写単物	GGGAAGCTCAGAAATAAACGCTCAACTTTGGCCGGATCTCGCCACCATGG ACAAAGAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATG GGCAGTCATCACAGACGAAATACAGGTCCGAGCAGAAAGTTCAAGGTC CTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCAC TGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAGCAACAAAGACTGAAGAGAAC AGCAAGAAAGATACACAGAGAAAGAAAGAACAGAAATCTGCTACCTGCAG GAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAGGTGACGACAGCTTCTTCCACA GACTGGAAAGAAAGCTTCTCTGGTCGAAAGAAAGACAAAGAACGAAAGACA CCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAAGTGGCATACCAAGAAAGTAC CCGACAACTTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAAG CAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAAG AGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGACGTC GACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTTCTGAAG AAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGC AAGACTGAGCAAGAGCAGAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCG GGAGAAAAGAAAGAACGGACTGTTCCGAAAACCTGATCGCACTGAGCCTGG GACTGACACCCGAACCTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAA GCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAAACCTGCTG GCACAGATCGGAGACCAAGTACGACAGACCTGTTCTGGCAGCAAGAACCC TGAGCGACGCAATCTCTGCTGAGCGACATCTCTGAGAGTCAACACAGAAAT CACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACAC CACCAAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGACGCTGCCGG AAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGATACGCAGG

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 3 6】

ATACATCGACGGAGGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAAGTTTCATCAAG CCGATCCTGGAAAAGAATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAAGCTGA ACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAAACATTCGACAAACGGAAAGCAT CCGGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATTCCTGAGAAAGACAG GAAGACTTCTACCCGTTCTGAAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAAGA TCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAA CAGCAGATTTCGCAATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAAATCACACCG TGGAACTTCGAAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGGCTTCA TCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACTGCCGAAACGAAAGGTCCT GCCGAGCACAGCCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTG ACAAAGGTCAAGTACGTCAACAGAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGA GCGAGAAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAAGACAAACAG AAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAA TGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAAACGCAA GCCGCGGAACATACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACTT CCTGGACAAACGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACA CTGACACTGTTTCGAAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAGACAT ACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAG ATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGA GACAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAAGAGCGACGGAT TCGCAAAACAGAAACTTCATGACAGCTGATCCACGACCGACAGCCCTGACAT CAAGGAAGACATCCAGAAAGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCCTG CACGAACACATCGCAAACTCTGGCAGGAAGCCCCGGCAATCAAAGAAAGGAA	

10

20

30

40

50

TCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAG ACACAAAGCCGAAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACA ACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAG AAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGA AAACACACAGCTGCAGAACGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAAC GGAAGAGACATGTACGTGACACAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCG ACTACGACGTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAG CATCGACAAACAAAGTCCCTGACAAAGAAAGCGACAAAGAACAGGAAGAAGC GACAAAGTCCCGAGCGAAGAAAGTCTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGGA GACAGCTGCTGAACGCAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCGACAACT GACAAAGGACAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAAGGACGATTCTC ATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCACAAAGCACGTCGAC AGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACGACAAAGCT GATCAGAGAAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGAC TTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACC ACCACGCACAGACGCATACCTGAACGCACTGTCGGAAACAGCACTGAT CAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAGCGAAATTCGTCTACGGAGACTACAAAG GTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAA AGGCACACAGCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAA GACAGAAATCACACTGGCAACGGAAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATC GAAACAACCGAGAAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAGACACT TCGCAACAGTCAGAAAGTCTTGAGCATGCGCAGGTCACACATCGTCAA GAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAGCATCCTGCGG	

50

【表 4 3 - 5 3 8】

AAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGA AGAAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCCTGGT CGTCGC AAAAGGT CG AAAAGG AAAAGAGCAAGAGCTGAAAGCGCTCAAG GAACTGCTGGGAATCACAATCATGTGAAAAGAACAGCTTCGAAAAGAAACC CGATCGACTTCCTGGAAGCAAGGGATACAAAGGAAGTCAAGAGGACCT GATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCCTGTTCCGAAC TGG AAAACGGAGA AAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAAGAGGAAACGAACTGG CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGA AAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGAAACAGAAAGCAGCTGTTCTGTC GAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAAT TCAGCAAGAGAGTCACTCCTGGCAGACGCCAAACCTGGACAAGGTCCTGAG CGCATACAAACAAAGCACAGAGACAAAGCCGATCAGAGAAACAGGCAGAAAC ATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCAGCATTCA AGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATCACAAAGCACAAAGGA AGTCCTGGACGGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAA ACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGAACCCCGA AGAAGAAAGAGAAAGGTCAAGCAAGGCAACACCCGGAAGCGTCAGCGG ATGGAGACTGTTCAAGAAGATCAGCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGC ATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAGAAAGAAATGAAGATCAATAGCT TATTCATCTCTTTTCTTTTAAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGCTTCAA AAAAACATAAAATTTCTTTAAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGCTTCAA TTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAGAAAAA AAAAAA AAAAAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 4 0】

NLS1を有するCas9のアミノ酸配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFF IIRLEESFLVEEDKKIIRIPIFGNIVDEVAYHIEKYPTIYHILRKKLVDSTD KADLRLIYLALAIMIKFRGHFLIEGDLNPDNSVDKLFILQVQTYNQFLF EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAKQLLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVRQQL PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPHIILGELIILRRQEDFYFLKDNREKIE KILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAMWTRKSEETITPWNFEFVVDKGASQS FIERMTNFDKNL PNEKVL PKHSLLYEYFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYYHDL LKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLK TYAAILFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSD GFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSLHEHIANLAGSPA IKK GILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRI EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYDVDHI VPSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNY WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKIIV AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINN YHHAHDAYLNAVVG TALI KKYPKLESEFVYGDYKVVDVRKMI AKSEQE I GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDW D	38 6

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 4 1】

	PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVEKGSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFLYLASHIEKLGSPEDNEQQLFVEQIKHIYLDDEIEQIS EFSKRVI LADANLDKVL SAYNKHIRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRRKRYTSTKEVLDA TL IHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGS LAAKRSRTT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 4 2】

NLS2を有するCass9のアミノ酸配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRKRNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSF IIRLEESFLVEEDKKHIERIPIFGNIVDEVAYHIEKYPTIYHILRKKLV KADRLIYALAIMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFILQVQTYNQ EENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAK NLSDAIILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVR PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEEL LNREDLLRKQRTFDNGSIPHIILGELHAILRRQEDFYFLKDNREKIE KILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSHLLYFYFTVYNELTKVYVTEGMRKPA LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDR ASLGTYHDLKLIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERL TYAILFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD GFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPA GILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTKGQKNSRERM EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDIN SDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKM WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITK AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRE YHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSE GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK DFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 4 3】

	PKKYGGFDSP TVAYSVLVVAKVEKSKKLSVKELLGITIMERSSEFK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFY LASHIYEKLGSPEDNEQKQLFVEQIKHIYLDDEIIIEQIS EFSKRVI LADANLDKVL SAYNKHIRDKPIREQAENI IILFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGS QAAKRSRTT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 4 4】

NLS3を有するCa ²⁺ のアンチペプチド配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF HIREESFLVEEDKKHIERIPIFGNIVDEVAHYIEKYPTIYIIRKKLVDS KADLRLIYLAALAIMIKFRGHIPIEGDLNPDNSDVKLFILQVQTYNQ LEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDITYDDLDNLQAIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQ PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLV LNREDLLRKQRTFDNGSIPHIILGELHAILRRQEDFYPFLLKDNREKIE KILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQS FIERM'TNFDKKNLPNEKVLPHKSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDILLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIERLK TYAHLFDDKVMKQLKRRTYTGWRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD GFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGSLSHEHIANLAGSPAICK GILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMRI EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYDVVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVKKMKNY WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKIIV AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQYKVRINN YHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMKIAKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD	38 8

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 4 5】

	PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFYLAHIEKLGSPEDNEQQLFVEQHIIYLDDEIIIEQIS EFSKRVIILADANLDKVL SAYNKHIRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGS PAPAKRERTT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 4 6】

NLS4を有するCas9のヌクレオチド配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF IIRLEESFLVEEDKKHIERIPIFGNIVDEVAYHIEKYPTIYIILRKKLV DSTDKADRLIYLAALHIMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDFIKLVQTYN QLFEEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNL IALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADLF LAANKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLL KALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE KMDGTTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHIILGELIAILRRQED FYPFLLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETI TPWNFEFVVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLYEYF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQ LKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNE ENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAIILFDDKVMKQLKRRRY TGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSDGFANRNFMLIHDDSL TFKEDIQKAQVSGQGDLSLHEHIANLAGSPAIIKGILQTVKVVDL ELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKQKNSRERMKRIEEGIKEL GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVKKMKNY WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT KIIVAQIILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFY KVRINNYYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFFVYGDYKVVYD VRKMIAKSEFQFI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPL IETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNI VKKTEVQTGGFSKES ILPKRNSDKL IARKKDWD

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 4 7】

	PKKYGGFDSP TVAYSVLVVAKVEKSKKLSVKELLGITIMERSSEFEK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNF LYLASHIEKLGSPEDNEQKQLFVEQIHKIHYLDEII EQIS EFSKRVI LADANLDKVL SAYNKHIRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGS QAAKRPRTT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 4 8】

NLS5を有するCas9のアミノ酸配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF IIRLEESFLVEEDKKHIERIPIFGNIVDEVAHYIEKYPTIYIILRKKLVDST KADRLIYALAIIMIKFRGHIPIEGDLNPDNSDVDFKLFILVQTYNQFL EENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPIHQIHLGELIAILRRQEDFYFLLKDNREKIE KILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEFVVDKGASQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYEFTVYNELTKVYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLKLIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLK TYAILFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD GFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPAIAKK GILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGKNSRFRMKRI EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNY WRQLLNAKLI TQRKFDNLTKAERGGLSELDAKAGFIKRQLVETRQITKIIV AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINN YHHAHDAYLNAVVGTA LKKYPKLESEFFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQFI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD	39 0

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 4 9】

	PKKYGGFDSP TVAYS LVVAKVEK GKSKKLKSVKEL LGITIMERSSF EK NPIDFLEAKGYKEVKKDL I IKLPKYS LFELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNF LYLASHIYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQIHKIHYLDE I IEQIS EFSKRVI LADANLDKVLSAYNKIIRDKPIREQAENI I IILFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRRYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGS RAAKRPRTT	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 5 0】

NLS6を有するCas9の7ミノ酸配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRKKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFF IIRLEESFLVEEDKKIIRIPIFGNIVDEVAYIEKYPTIYIILRKKLV DST KADLRLLYALAHIMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFILVQTYNQFLF EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENIAQLPGKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAFDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAK NLSDAIILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPHIILGELHAILRRQEDFYFLKDNREKIE KILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAMTRKSEETITPWNFEVVDKGSASQS FIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYYHDLKLIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLK TYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIILDFLKSD GFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSLHEHIANLAGSPAIAKK GILQTVKVVDFELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRFRMKRI EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYDVHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNY WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKIIV AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVIENN YHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVVDRKMIKSEFEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD	39 1

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 5 1】

	PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQIKHIYLDDEIIIEQIS EFSKRVI LADANLDKVL SAYNKHIRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGS AAAKRSWSMAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 5 2】

NLS7を有するCas9のアーミノ酸配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG	39
	ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRNRI CYLQEIFS NEMAKVDDSF	2
HRL EESFLVEEDKKIHERIPIFGNIVDEVAYIEKYPTIYHILRKKLV DSTD		
KADLR LIYLA LAIMIKFRGIHFLIEGDLNPDNSDVKLF IQLVQTYNQLF		
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL ENL I AQLPGEKKNGLFGNLIALS		
LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAK		
NLSDAI LLSDI LRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL		
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVK		
LNREDLLRKQRTFDNGSIPIHQIHLGELHAILRRQEDFYFFLKDNREKIE		
KILTFRIPIYVVGPLARNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGCASQS		
FIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSHLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF		
LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN		
ASLGTYHDL LK I IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMI EERLK		
TYAILFD DDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKSGKTILDFLKSD		
GFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGS LHEHIANLAGSPA I K		
GILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIFMARENQTTQKGQKNSRFRMKRI		
EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRL		
SDYVDVHI VPSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKNY		
WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKIIV		
AQI LDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS KLVSDFRKDFQFYK VREINN		
YHHAHDAYLNAVVGTA L I K K Y P K L E S E F V Y G D Y K V Y D V R K M I A K S E Q E I		
GKATAKYFFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR		
DFATVRKVLSPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWD		

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 5 3】

	PKKYGGFDSP TVAYSVLVVAKVEKGSKKLKS VKELLGITIMERSSF EK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNF LYLASHYEKLKGS PEDNEQQLFVEQIHKIYLD EII EQIS EFSKRVI LADANL DKVLSAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGS AAAKRVVWSMAF	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 5 4】

NLS8を有するCas9のアミノ酸配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF IIRLEESFLVEEDKKIHERIPIFGNIVDEVAYIEKYPTIYHLRKKLVDS TDKADLRLIYLAALAIMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDFKLFILQVQTYNQ LFFENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENIAQLPGEKKNGLCFNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDLYDDDLNLLAQIGDQYADLF LAANKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTL LLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPI LEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHIQIILGELHAILRRQ EDFYFFLKDNRKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETIT PWNFEFVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVY NELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDY FKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILE DIVLTLTLFEDREMIEERLKTAYAILFDDKVMKQLKRRRYTGWR LSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDI QKAQVSGQGDLSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDLVKVMGRH KPEINIVEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHP VENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL KDDSIDNKVLTNRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLIT QRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKIIV AQI L DSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYK VREINNYYHHAHDAYLNAVVGTA L I K K Y P K L E S E F V Y G D Y K V Y D V R K M I A K S E Q E I G K A T A K Y F F Y S N I M N F F K T E I T L A N G E I R K R P L I E T N G E T G E I V W D K G R D F A T V R K V L S M P Q V N I V K K T E V Q T G G F S K E S I L P K R N S D K L I A R K K D W D	39 3

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 5 5】

	PKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKSKKLSVKELLGITIMERSSEK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFYLAHIEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKIYLDIIEQIS EFSKRVI LADANLDKVL SAYNKIIRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TL IHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGS AAAKRSWSMAF	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 5 6】

NLS9を有するCas9のヌクレオチド配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF IIRLEESFLVEEDKKIHERIPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYIILRKKLV KADRLIYLALAIMIKFRGHFLIEGDLNPDNSVDKFLIQLVQTYNQ FENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENIAQLPCEKKNGLFGNLA LGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKDLYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVR PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEEL LNREDLLRKQRTFDNGSIPHIILGELIAILRRQEDFYFLLKDNREK KILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAMTRKSEETITPWNFEVVDKGS FIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTVKYVTEGMRKPA LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED ASLGTYHDLKLIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEER TYAILFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFL GFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAVSGQGDLSLHEHIANLAGSPA GILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTKGQKNSRERM EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELD SDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTSDKNRGKSDNVPSEEVVKKM WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVR YHHAHDAYLNAVVGTA L I K K Y P K L E S E F V Y G D Y K V Y D V R K M I A K S F Q E I G K A T A K Y F F Y S N I M N F F K T E I T L A N G E I R K R P L I E T N G E T G E I V W D K G R D F A T V R K V L S M P Q V N I V K K T E V Q T G G F S K E S I L P K R N S D K L I A R K K D W D

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 5 7】

	PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFLYLASHIEKCLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDDEIIEQIS EFSKRVI LADANLDKVL S AYNKH RD KPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TL I HQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGS AAAKRKYFAA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 5 8】

NLS10を有するCas9のアミノ酸配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRRNRRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFF IIRLEESFLVEEDKKHIERIPIFGNIVDEVAYIEKYPTIYILRRKKLVDSTD KADRLIYLAALAIMIKFRGHIFLIEGDLNPDNSDVKLFILVQTYNQFLF EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALS LGLTPNFKSNFDLAEDAQLLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVRQQL PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVK LNREDLLRKQRTFDNGSIPHIILGELIILRRQEDFYFLLKDNREKIE KILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEFVVDKGASQS FIERTNFDKNLPNEKVLPHKSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIERLK TYAAILFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD GFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPAICK GILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEARENQTTQKGQKNSRERMKRI EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNY WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKIIV AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREINN YHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEII GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITTLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDW	39 5

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 5 9】

PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKSKKLKSVKELLGITIMERSSEK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFLYLASHIYEKLGSPEDNEQKQLFVEQIKHIYLDDEII EQIS EFSKRVI LADANLDKVLSAYNKIIRDKPIREQAENI IILFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGS RAAKRKAF AA	

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 6 0】

NLS11を有するCas9のアミノ酸配列	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF IIRLEESTLVEEDKKIHERIPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYIILRKKLV KADRLIYLALAIMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDFKFLIQLVQTYNQ FENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENIAQLPCEKKNGLFGNLIAL LGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQ PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEEL LNREDLLRKQRTFDNGSIPHIHLGELIAILRRQEDFYFPLKDNREK KILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGA FIERM'TNFDKNLPNEKVLPHKSLLYEYFTVYNELTKVYVTEGMRK LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED ASLGTYHDLKLIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEER TYAILFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDF GFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSLHEHIANLAGSPA GILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKQKNSRER EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELD SDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTSDKNRGKSDNVPSEEVKKM WRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT AQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVR YHHAHDAYLNAVVGTA L I K K Y P K L E S E F V Y G D Y K V Y G K A T A K Y F F Y S N I M N F F K T E I T L A N G E I R K R P D F A T V R K V L S M P Q V N I V K K T E V Q T G G F S K E S I L P K R N S D K L I A R K K D W D

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 5 6 1】

PKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGSKKLSVKELGITIMERSSEFK NPIDLEAKGYEVKKDLIKLPKYSLELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFYLAHIYEKLGSPEDNEQKQLFVEQIKHLYDEIEQIS EFSKRVILADANLDKVLSAYNKHIRDKPIREQAENIIILFTLTNLGAPAA FKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLVETRIDLSQLGGDGGGS RAAKRKYFAV

* = PS連結、 $|m| = 2'$ 、 $-O-Me$ 又クレオチド

說明

配列

配列番号

HSDの5'UTR、配列番号204に対応するORF、Kozak配列、およびALBの3'UTRを有するCas9転写物

GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTT
CGTGTTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTTCGGATCCGCCACC
ATGGACAAGAAGTACAGCATCAGGACTGGACATCGGAACAA
ACAGCGTCGGATGGGCGAGTCATCACAGACGAATACAAGGT
CCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGA
CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCAGGAGCACTGCTGTTCTG
ACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGAGAAC

AGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAATCTGC
TACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCG
ACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTCTGGT
CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTTCGGA
AACATCGTTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGA
CAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGA
CAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACAC
ATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGACC
TGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCA
GCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCG
ATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCG
CAAGACTGAGCAAGAGCGAGAAGACTGGAAAACCTGATCGC
ACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAAC
CTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGA
GCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAG
CAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCA
CAGATCGGAGACCAGTACGACAGACCTGTTCTCTGGCAGCAA
AGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAG
AGTCAACACAGAAATCACAAAGGCAACCGCTGAGCGCAAGC
ATGATCAAGAGATACGACGAAACACCACCAGGACCTGACAC
TGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTA
CAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCA
GGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACA
AGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGA
AGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGA
AAGCAGAGAAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCCAGA
TCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGA
AGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATC
GAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGAC
CGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAG
AAAGAGCGAAGAAACAATCACACC GTGGA ACTTTCGAAGAA
GTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATCGAAA
GAATGACAAA ACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGT
CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCACAGTC
TACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAA
TGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAAGGC
AATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAACA
GTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAAT
GCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT
CAACGCAAGCCTGGGAAACATACCACGACCTGCTGAAGATC
ATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAAGAAAACGAAG
ACATCCTGGAAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTTCGA
AGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCA
CACCTGTTTCGACGACAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA
GAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGAT
CAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG
GACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAACTTCA
TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGGAAGA
CATCCAGAAGGACAGGT CAGCGGACAGGGAGACAGCCTG
CACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA

10

20

30

40

50

AGAAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGACGAACCT
GGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTC
ATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGAC
AGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGG
AATCAAGGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCG
GTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGT
ACTACCTGCGAGAACGGAAAGAGACATGTACGTGACCCAGGA
ACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCCAC
ATCGTCCCAGAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGACA
ACAAGGTCCTTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAGAG
CGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAG
AACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAGCTGATCACAC
AGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCGAGAGAGAGGAGG
ACTGAGCGAACTGGACAAGGCGAGGATTTCATCAAGAGACAG
CTGGTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTGCGACAGA
TCCTGGACAGCAGAATGAACACAAGGTACGACGAAAACGA
CAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGC
AAGCTGGTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACA
AGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACACGCGACACGACGC
ATACCTGAACGCGAGTCGTGCGAACAGCACTGATCAAGAAG
TACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTACA
AGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACA
GGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGC
AACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAA
ACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAACCGG
AGAAACAGGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAAGAGACTTC
GCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTCAACA
TCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAA
GGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATC
GCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGAT
TCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTCTGTCGC
AAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTC
AAGGAACCTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCT
TCGAAAAGAAACCCGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGGGATA
CAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAG
TACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAAACGGAAAGAAAGAGAAATGC
TGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAACTGGC
ACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGC
CACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCCGGAAGACAACGAAC
AGAAGCAGCTGTTTCGTGCAACAGCACAAAGCACTACCTGGA
CGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAGAGTTC
ATCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCAT
ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAAACAGGCAGA
AAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAACCTGGGAGCA
CCGGCAGCATTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGAA
AGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTTGACGCAACACT
GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAATC
GACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCCGA
AGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAG
CATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAG

10

20

30

40

50

ATCAATAGCTTATTTCATCTCTTTTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTG
AAAGCCAACACCCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAAT
CATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAAT
GGAAAGAACCTCGAG

1

ヒトにおいて一般的に高い発現を有するコドンを使用した、配列番号205に対応するCas9 ORFを含むCas9転写産物

GGGTCCCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTT
CGTGTTGTTGTCGTTGCAGGCCCTTATTCGGATCCATGCCCT
AAGAAAAAGCGGAAGGTGACGGGGATAAGAAGTACTCAA
TCGGGGCTGGATATCGGAACATAATTCCGTGGGTTGGGCAGT
GATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAG
GTCCTGGGGAAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATC
TCATCGGAGCCCTGCTGTTTGA CTCCGGCGAAACCGCAGA
AGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTACACC
CGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTT
CGAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAGCTTCTTCCACCG
CCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCAT
GAACGGCATCCTATCTTTGGAACATCGTCGACGAAGTGG
CGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAA
GAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTG
ATCTACTTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTTCCGCGGAC
ACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCCTGATAACTCCGA
CGTGGATAAAGCTTTTCAATTCAACTGGTGACAGACCTACAAC
CAACTGTTTCGAAGAAAACCCCAATCAATGCTAGCGGCGTCG
ATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTGCAAGTCGCG
GCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAA
AAGAACGGACTTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGG
GACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGA CCTGGCCGA
GGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGAC
GACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTTGGCGATCAGTACG
CGGATCTGTTCCCTTGCCGCTAAGAACCTTTTCGGACGCAAT
CTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACC
AAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACG
AGCATCACCAAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAG
ACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTTCGAC
CAGTCCAAGAATGGGTACGCAAGGTACATCGATGGAGGCG
CTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCAATCAAGCCAATCCT
GGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAAGTCTGCTGGTCAAGCTG
AACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACA
ACGGATCCATTCCCCACAGATCCATCTGGGTGAGCTGCA
CGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCTCTC
AAGGACAACCGGGAAGAAGATCGAGAAAATTTCTGACGTTCC
GCATCCCGTATTACGTGGGCCCCTGGCGCGCGGCAATTC
GCGCTTCGCGTGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATC
ACTCCTTGGAATTTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTT
CGGCACAAAGCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAA
GAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCTAAGCACAGCCTC
CTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACCTGACTAAAG
TGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCT

10

20

30

40

50

GTCCGGAGAACAGAAAGCAATTGTGATCTGCTGTTCA
AAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGG
ACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAAT
CAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACC
TATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCC
TTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGT
CCTGACCTTGACCCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAG
GAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGG
TCATGAAACAACCTCAAGCGCCGCGGTACACTGGTTGGGG
CCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAAA
CAGAGCGGTAATAACTATCCTGGATTTCCTCAAATCGGATG
GCTTCGCTAATCGTAACCTTCATGCAATTGATCCACGACGA
CAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAAGCACAAAGTG
TCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATC
TGGCCGGTTTCGCCGGCGATTAAAGAAAGGGAATTCTGCAAAC
TGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGGTTCATGGGACGG
CACAAACCGGAGAAATATCGTGATTGAAATGGCCCCGAGAAA
ACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAAACTCCCGCGAAAG
GATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCGAGC
CAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAAACACGCAGCTGC
AGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAAAATGGACG
GGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTG
TCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTTC
TGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAG
CGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAG
GAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCC
TGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCT
CACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAG
GCTGGATTTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCGAGA
TTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTGGACTCCCGCATGAA
CACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGGAAGTG
AAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCGGACTTTTC
GGAAGGACTTTTCAGTTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAA
CTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTTC
GGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTTGAATCGG
AGTTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAA
GATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACT
GCGAAATACTTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCA
AGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAG
GCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTG
TGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTTCGCAAAGTG
TCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGT
GCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAG
AGAAATAGCGACAAGCTCATTTGCACGCAAGAAAGACTGGG
ACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGATTTCGCCGACTGTCGC
ATACTCCGTCTCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAAGGGAAAG
AGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGGATTA
CCATCATGGAACGATCCTCGTTTCGAGAAGAACCCGATTGA
TTTCCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGAT
CTGATCATCAAACCTCCCCAAGTACTCACTGTTTCGAACTGG

10

20

30

40

50

AAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACT
CCAAAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCCTAGCAAGTACGTC
AACTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAAAAACTCAAAG
GGTCACCCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTTCGTGGA
GCAGCACAAAGCATTTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATC
TCCGAGTTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCC
TCGACAAAGTCTCTGTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAA
GCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTTC
ACCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACT
TCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAA
GGAAGTTCTGGACGCGACCCCTGATCCACCAAAGCATCACT
GGACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTGCGCAGCTGGGTG
GCGATTGATAGTCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAG
CCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAG
CTTATTCACTCTCTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAA
CACCCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGC
CTCTTTTTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAATGGAAAGAA
CCTCGAG

2

修飾 s g RNA 配列 (「N」は任意の天然または非天然ヌクレオチドであってもよい)

mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

3

30 / 30 / 39 ポリ A 配列

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

4

ヒト TTR (エクソン 1) を標的とする CR003335 gRNA
CUGCUCCUCCUCUGCCUUGC

5

ヒト TTR (エクソン 1) を標的とする CR003336 gRNA
CCUCCUCUGCCUUGCUGGAC

6

ヒト TTR (エクソン 1) を標的とする CR003337 gRNA
CCAGUCCAGCAAGGCAGAGG

7

ヒト TTR (エクソン 1) を標的とする CR003338 gRNA
AUACCAGUCCAGCAAGGCAG

8

ヒト TTR (エクソン 1) を標的とする CR003339 gRNA
ACACAAAUACCAGUCCAGCA

9

ヒト TTR (エクソン 1) を標的とする CR003340 gRNA
UGGACUGGUAUUUGUGUCUG

10

ヒト TTR (エクソン 1) を標的とする CR003341 gRNA

10

20

30

40

50

CUGGUAUUUGUGUCUGAGGC
11
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003342 gRNA
CUUCUCUACACCCAGGGCAC
12
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003343 gRNA
CAGAGGACACUUGGAUUCAC
13
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003344 gRNA
UUUGACCAUCAGAGGACACU
14
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003345 gRNA
UCUAGAACUUUGACCAUCAG
15
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003346 gRNA
AAAGUUCUAGAUGCUGUCCG
16
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003347 gRNA
CAUUGAUGGCAGGACUGCCU
17
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003348 gRNA
AGGCAGUCCUGCCAUCA AUG
18
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003349 gRNA
UGCACGGCCACA UUGAUGGC
19
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003350 gRNA
CACAUGCACGGCCACA UUGA
20
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003351 gRNA
AGCCUUUCUGAACACAUGCA
21
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003352 gRNA
GAAAGGCUGCUGAUGACACC
22
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003353 gRNA
AAAGGCUGCUGAUGACACCU
23
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003354 gRNA
ACCUGGGAGCCA UUGCCUC
24
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003355 gRNA
CCCAGAGGCAAAUGGCUC CC
25
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003356 gRNA
GCAACUUACCCAGAGGCAAA
26
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR003357 gRNA
UUCUUUGGCAACUUACCCAG
27

10

20

30

40

50

ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003358 gRNA
 AUGCAGCUCUCCAGACUCAC
 28
 ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003359 gRNA
 AGUGAGUCUGGAGAGCUGCA
 29
 ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003360 gRNA
 GUGAGUCUGGAGAGCUGCAU
 30
 ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003361 gRNA
 G CUGCAUGGGCUCACAACUG
 31
 ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003362 gRNA
 GCAUGGGCUCACAACUGAGG
 32
 ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003363 gRNA
 ACUGAGGAGGAUUUGUAGA
 33
 ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003364 gRNA
 CUGAGGAGGAUUUGUAGAA
 34
 ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003365 gRNA
 UGUAGAAGGGGAUAUACAAAG
 35
 ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003366 gRNA
 AA AUAGACACCAA AU CUUAC
 36
 ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003367 gRNA
 AGACACCAA AU CUUACUGGA
 37
 ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003368 gRNA
 AAGUGCCUUC CAGUAAGAUU
 38
 ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003369 gRNA
 CUCUGCAUGCUCAUGGAAUG
 39
 ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003370 gRNA
 CCUCUGCAUGCUCAUGGAAU
 40
 ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003371 gRNA
 ACCUCUGCAUGCUCAUGGAA
 41
 ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR003372 gRNA
 UACUCACCU CUGCAUGCUCA
 42
 ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003373 gRNA
 GUAUUACACAGCCAACGACUC
 43
 ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003374 gRNA
 GCGGCGGGGGCCGGAGUCGU

10

20

30

40

50

4 4
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003375 gRNA
AAUGGUGUAGCGGCGGGGGC

4 5
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003376 gRNA
CGGCAAUGGUGUAGCGGCGG

4 6
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003377 gRNA
GCGGCAAUGGUGUAGCGGCG

4 7
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003378 gRNA
GGCGGCAAUGGUGUAGCGGC

4 8
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003379 gRNA
GGGCGGCAAUGGUGUAGCGG

4 9
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003380 gRNA
GCAGGGCGGCAAUGGUGUAG

5 0
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003381 gRNA
GGGGCUCAGCAGGGCGGCAA

5 1
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003382 gRNA
GGAGUAGGGGCGCAGCAGGG

5 2
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003383 gRNA
AUAGGAGUAGGGGCGCAGCA

5 3
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003384 gRNA
AAUAGGAGUAGGGGCGCAGC

5 4
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003385 gRNA
CCCCUACUCCUAUCCACCA

5 5
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003386 gRNA
CCGUGGUGGAUAGGAGUAG

5 6
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003387 gRNA
GCCGUGGUGGAUAGGAGUA

5 7
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003388 gRNA
GACGACAGCCGUGGUGGAAU

5 8
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003389 gRNA
AUUGGUGACGACAGCCGUGG

5 9
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003390 gRNA
GGGAUUGGUGACGACAGCCG

6 0
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003391 gRNA

10

20

30

40

50

GGCUGUCGUCACCAAUCCCA
61
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR003392 gRNA
AGUCCCUCAUCCUUGGGAU
62
ヒトTTR（エクソン1）を標的とするCR005298 gRNA
UCCACUCAUUCUUGGCAGGA
63
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR005299 gRNA
AGCCGUGGUGGAAUAGGAGU
64
ヒトTTR（エクソン1）を標的とするCR005300 gRNA
UCACAGAAACACUCACCGUA
65
ヒトTTR（エクソン1）を標的とするCR005301 gRNA
GUCACAGAAACACUCACCGU
66
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR005302 gRNA
ACGUGUCUUCUCUACACCCA
67
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR005303 gRNA
UGAAUCCAAGUGUCCUCUGA
68
ヒトTTR（エクソン2）を標的とするCR005304 gRNA
GGCCGUGCAUGUGUUCAGAA
69
ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR005305 gRNA
UAUAGGAAAACAGUGAGUC
70
ヒトTTR（エクソン3）を標的とするCR005306 gRNA
AAAUUCUUACUGGAAGGCACU
71
ヒトTTR（エクソン4）を標的とするCR005307 gRNA
UGUCUGUCUUCUCUCAUAGG
72
カニクイザルTTRを標的とするCR000689 gRNA
ACACAAAUACCAGUCCAGCG
73
カニクイザルTTRを標的とするCR005364 gRNA
AAAGGCUGCUGAUGAGACCU
74
カニクイザルTTRを標的とするCR005365 gRNA
CAUUGACAGCAGGACUGCCU
75
カニクイザルTTRを標的とするCR005366 gRNA
AUACCAGUCCAGCGAGGCAG
76
カニクイザルTTRを標的とするCR005367 gRNA
CCAGUCCAGCGAGGCAGAGG
77

10

20

30

40

50

カニクイザルTTRを標的とするCR005368 gRNA
CCUCCUCUGCCUCGCGUGGAC
78

カニクイザルTTRを標的とするCR005369 gRNA
AAAGUUCUAGAUGCCGUGCCG
79

カニクイザルTTRを標的とするCR005370 gRNA
ACUUGUCUUCUCUAUACCCA
80

カニクイザルTTRを標的とするCR005371 gRNA
AAGUGACUUCCAGUAAGAUAU
81

カニクイザルTTRを標的とするCR005372 gRNA
AAAAGGCUGCUGAUGAGACC
82

未使用
83

未使用
84

未使用
85

未使用
86

ヒトTTRを標的とするG000480 sgRNA修飾配列
mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
87

ヒトTTRを標的とするG000481 sgRNA修飾配列
mU*mC*mU*AGAACUUUGACCAUCAGGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
88

ヒトTTRを標的とするG000482 sgRNA修飾配列
mU*mG*mU*AGAAGGGAUAUAACAAGGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
89

ヒトTTRを標的とするG000483 sgRNA修飾配列
mU*mC*mC*ACUCAUUCUUGGCAGGAGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

10

20

30

40

50

9 0

ヒトTTRを標的とするG000484 sgRNA修飾配列

mA*mG*mA*CAACCAAUCUUACUGGAGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

9 1

ヒトTTRを標的とするG000485 sgRNA修飾配列

mC*mC*mU*CCUCUGCCUUGCUGGACGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

10

9 2

ヒトTTRを標的とするG000486 sgRNA修飾配列

mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCAGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

9 3

ヒトTTRを標的とするG000487 sgRNA修飾配列

mU*mU*mC*UUUGGCAACUUACCCAGGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

20

9 4

ヒトTTRを標的とするG000488 sgRNA修飾配列

mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCUGUCCGGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

30

9 5

ヒトTTRを標的とするG000489 sgRNA修飾配列

mU*mU*mU*GACCAUCAGAGGACACUGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

9 6

ヒトTTRを標的とするG000490 sgRNA修飾配列

mA*mA*mA*UAGACACCAAUCUUACGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

40

9 7

ヒトTTRを標的とするG000491 sgRNA修飾配列

mA*mU*mA*CCAGUCCAGCAAGGCAGGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

9 8

ヒトTTRを標的とするG000492 sgRNA修飾配列

50

mC*mU*mU*CUCUACACCCAGGGCACGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
99

ヒトTTRを標的とするG000493 sgRNA修飾配列

mA*mA*mG*UGCCUUC CAGUAAGA UUGUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
100

10

ヒトTTRを標的とするG000494 sgRNA修飾配列

mG*mU*mG*AGUCUGGAGAGCUGCAUGUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
101

ヒトTTRを標的とするG000495 sgRNA修飾配列

mC*mA*mG*AGGACACUUGGAUUCACGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
102

20

ヒトTTRを標的とするG000496 sgRNA修飾配列

mG*mG*mC*CGUGCAUGUGUUCAGAAAGUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
103

ヒトTTRを標的とするG000497 sgRNA修飾配列

mC*mU*mG*CUCCUCCUCUGCCUUGCGUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
104

30

ヒトTTRを標的とするG000498 sgRNA修飾配列

mA*mG*mU*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
105

40

ヒトTTRを標的とするG000499 sgRNA修飾配列

mU*mG*mA*AUCCAAGUGUCCUCUGAGUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
106

ヒトTTRを標的とするG000500 sgRNA修飾配列

mC*mC*mA*GUCCAGCAAGGCAGAGGGUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAG

50

U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

1 0 7

ヒト T T R を標的とする G 0 0 0 5 0 1 s g R N A 修飾配列

m U * m C * m A * C A G A A A C A C U C A C C G U A G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

1 0 8

ヒト T T R を標的とする G 0 0 0 5 6 7 s g R N A 修飾配列

m G * m A * m A * A G G C U G C U G A U G A C A C C G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

1 0 9

ヒト T T R を標的とする G 0 0 0 5 6 8 s g R N A 修飾配列

m G * m G * m C * U G U C G U C A C C A A U C C C A G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

1 1 0

ヒト T T R を標的とする G 0 0 0 5 7 0 s g R N A 修飾配列

m C * m A * m U * U G A U G G C A G G A C U G C C U G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

1 1 1

ヒト T T R を標的とする G 0 0 0 5 7 1 s g R N A 修飾配列

m G * m U * m C * A C A G A A A C A C U C A C C G U G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

1 1 2

ヒト T T R を標的とする G 0 0 0 5 7 2 s g R N A 修飾配列

m C * m C * m C * C U A C U C C U A U U C C A C C A G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

1 1 3

カニクイザル T T R を標的とする G 0 0 0 5 0 2 s g R N A 修飾配列

m A * m C * m A * C A A A U A C C A G U C C A G C G G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

1 1 4

カニクイザル T T R を標的とする G 0 0 0 5 0 3 s g R N A 修飾配列

m A * m A * m A * A G G C U G C U G A U G A G A C C G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

10

20

30

40

50

1 1 5

カニクイザル T T R を標的とする G 0 0 0 5 0 4 s g R N A 修飾配列

m A * m A * m A * G G C U G C U G A U G A G A C C U G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

1 1 6

カニクイザル T T R を標的とする G 0 0 0 5 0 5 s g R N A 修飾配列

m C * m A * m U * U G A C A G C A G G A C U G C C U G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

10

1 1 7

カニクイザル T T R を標的とする G 0 0 0 5 0 6 s g R N A 修飾配列

m A * m U * m A * C C A G U C C A G C G A G G C A G G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

1 1 8

カニクイザル T T R を標的とする G 0 0 0 5 0 7 s g R N A 修飾配列

m C * m C * m A * G U C C A G C G A G G C A G A G G G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

20

1 1 9

カニクイザル T T R を標的とする G 0 0 0 5 0 8 s g R N A 修飾配列

m C * m C * m U * C C U C U G C C U C G C U G G A C G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

30

1 2 0

カニクイザル T T R を標的とする G 0 0 0 5 0 9 s g R N A 修飾配列

m A * m A * m A * G U U C U A G A U G C C G U C C G G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

1 2 1

カニクイザル T T R を標的とする G 0 0 0 5 1 0 s g R N A 修飾配列

m A * m C * m U * U G U C U U C U C U A U A C C C A G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

40

1 2 2

カニクイザル T T R を標的とする G 0 0 0 5 1 1 s g R N A 修飾配列

m A * m A * m G * U G A C U U C C A G U A A G A U U G U U U U A G A m G
m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G
U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m G m U m G m G m C
m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U

1 2 3

マウス T T R を標的とする G 0 0 0 2 8 2 s g R N A 修飾配列

50

mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

1 2 4

s gRNAを形成するためのガイド配列の3'末端に続く例示的なヌクレオチド配列

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCU
AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
UUUU

1 2 5

c rRNAを形成するためのガイド配列の3'末端に続く例示的なヌクレオチド配列

GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG

1 2 6

未使用

1 2 7 ~ 2 0 0

C a s 9 DNAコード配列 2

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGA
ACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCAACACAGACGAATACA
AGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA
CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTG
TTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGA
GAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAGAACAGAAT
CTGCTACCTGCAAGGAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAG
GTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAGCTTCC
TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTT
CGGAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCAGAAAAGTAC
CCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCA
CAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC
ACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGA
GACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAA
CCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTG
AGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGA
TCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCCGG
AAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCA
GCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC
TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGC
AAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACAGGACCTG
ACACTGCTGAAGGCACTGGTCAAGACAGCAGCTGCCGGAAA
AGTACAAGGAAATCTTCTTTCGACCAGAGCAAGAACGGATA
CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CAGAAGAACCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCT
GAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCAC
CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGAC
AGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAA

10

20

30

40

50

GATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGT
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGA
AGAAGTCGTGACAAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATC
GAAAGAATGACAAACTTTCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAA
AGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCAC
AGTCTACAACGAACCTGACAAAGGTTCAAGTACGTACAGAA
GGAATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAG
AGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGT
CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATC
GAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACA
GATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAAC
GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAG
AGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGC
TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAAC
TTCATGACAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGG
AAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAG
CCTGCACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCA
ATCAAGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTTCGACG
AACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAACAT
CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAACCAAGACAAACACAGAAG
GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAATCGAAG
AAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACA
CCCGGTTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTTCGACC
AGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTTCGA
CCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCTGTC AAGAAGAT
GAAGAAGTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATC
ACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAG
GAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAG
ACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTTCGA
CAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAGTACGACGAAA
ACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAA
GAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTT
TACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGACACG
ACGCATACCTGAACGCAGTCGTTCGGAAACAGCACTGATCAA
GAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTACGGAGAC
TACAAGGTCTACGACGTTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCG
AACAGGAAATCGGAAAGGC AACAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTG
GCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCCTGATCGAAACAA
ACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGA
CTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTC
AACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCA

10

20

30

40

50

G C A A G G A A A G C A T C C T G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C T
G A T C G C A A G A A A G A A G G A C T G G G A C C C G A A G A A G T A C G G A
G G A T T C G A C A G C C C G A C A G T C G C A T A C A G C G T C C T G G T C G
T C G C A A A G G T C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G
C G T C A A G G A A C T G C T G G G A A T C A C A A T C A T G G A A A G A A G C
A G C T T C G A A A A G A A C C C G A T C G A C T T C C T G G A A G C A A A G G
G A T A C A A G G A A G T C A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C
G A A G T A C A G C C T G T T C G A A C T G G A A A A C G G A A G A A A G A G A
A T G C T G G C A A G C G C A G G A G A A C T G C A G A A G G G A A A C G A A C
T G G C A C T G C C G A G C A A G T A C G T C A A C T T C C T G T A C C T G G C
A A G C C A C T A C G A A A A G C T G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C
G A A C A G A A G C A G C T G T T C G T C G A A C A G C A C A A G C A C T A C C
T G G A C G A A A T C A T C G A A C A G A T C A G C G A A T T C A G C A A G A G
A G T C A T C C T G G C A G A C G C A A A C C T G G A C A A G G T C C T G A G C
G C A T A C A A C A A G C A C A G A G A C A A A G C C G A T C A G A G A A C A G G
C A G A A A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C A C T G A C A A A C C T G G G
A G C A C C G G C A G C A T T C A A G T A C T T C G A C A C A A C A A T C G A C
A G A A A G A G A T A C A C A A G C A C A A A G G A A G T C C T G G A C G C A A
C A C T G A T C C A C C A G A G C A T C A C A G G A C T G T A C G A A A C A A G
A A T C G A C C T G A G C C A G C T G G G A G G A G A C G G A G G A G G A A G C
C C G A A G A A G A A G A G A A A G G T C T A G

201

C a s 9 DNAコード配列1

A T G G A T A A G A A G T A C T C A A T C G G G C T G G A T A T C G G A
A C T A A T T C C G T G G G T T G G G C A G T G A T C A C G G A T G A A T A C A
A A G T G C C G T C C A A G A A G T T C A A G G T C C T G G G G A A C A C C G A
T A G A C A C A G C A T C A A G A A A A T C T C A T C G G A G C C C T G C T G
T T T G A C T C C G G C G A A A C C G C A G A A G C G A C C C G G C T C A A A C
G T A C C G C G A G G C G A C G C T A C A C C C G G C G G A A G A A T C G C A T
C T G C T A T C T G C A A G A G A T C T T T T C G A A C G A A A T G G C A A A G
G T C G A C G A C A G C T T C T T C C A C C G C C T G G A A G A A T C T T T C C
T G G T G G A G G A G G A C A A G A A G C A T G A A C G G C A T C C T A T C T T
T G G A A A C A T C G T C G A C G A A G T G G C G T A C C A C G A A A A G T A C
C C G A C C A T C T A C C A T C T G C G G A A G A A G T T G G T T G A C T C A A
C T G A C A A G G C C G A C C T C A G A T T G A T C T A C T T G G C C C T C G C
C C A T A T G A T C A A A T T C C G C G G A C A C T T C C T G A T C G A A G G C
G A T C T G A A C C C T G A T A A C T C C G A C G T G G A T A A G C T T T T C A
T T C A A C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A A C T G T T C G A A G A A A A
C C C A A T C A A T G C T A G C G G C G T C G A T G C C A A G G C C A T C C T G
T C C G C C C G G C T G T C G A A G T C G C G G C G C C T C G A A A A C C T G A
T C G C A C A G C T G C C G G G A G A G A A A A G A A C G G A C T T T T C G G
C A A C T T G A T C G C T C T C T C A C T G G G A C T C A C T C C C A A T T T C
A A G T C C A A T T T T G A C C T G G C C G A G G A C G C G A A G C T G C A A C
T C T C A A A G G A C A C C T A C G A C G A C G A C T T G G A C A A T T T G C T
G G C A C A A A T T G G C G A T C A G T A C G C G G A T C T G T T C C T T G C C
G C T A A G A A C C T T T C G G A C G C A A T C T T G C T G T C C G A T A T C C
T G C G C G T G A A C A C C G A A A T A A C C A A A G C G C C G C T T A G C G C
C T C G A T G A T T A A G C G G T A C G A C G A G C A T C A C C A G G A T C T C
A C G C T G C T C A A A G C G C T C G T G A G A C A G C A A C T G C C T G A A A
A G T A C A A G G A G A T C T T C T T C G A C C A G T C C A A G A A T G G G T A

10

20

30

40

50

CGCAGGGGTACATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTTC
TATAAGTTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CCGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCT
CCGGAAACAGAGAACCTTTGACAACGGATCCATTCCCCAC
CAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGGCC
AGGAGGACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAACCGGGAAAA
GATCGAGAAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTG
GGCCCACTGGCGCGCGGCAATTTCGCGCTTCGCGTGGATGA
CTAGAAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAATTTTGA
GGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTTCGGCACAAAGCTTTCATC
GAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGA
AGGTGCTTCCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACT
TGTCTACAACGAACCTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAA
GGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAACAGAAAGA
AAGCAATTGTGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGT
GACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATC
GAGTGTTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGGGTGGAGGACA
GATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCCCTTGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCCTGACCTTGACCCCTTT
TCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTA
CGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTTCATGAAACAACCTCAAG
CGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGGCCGCTCTCCCGCAAGC
TGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACTAT
CCTGGATTTTCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAAC
TTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGG
AGGACATCCAAAAAGCACAAAGTGTCGGGACAGGGAGACTC
ACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGGTTTCGCCGGCG
ATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACTGTGAAGGTGGTTCGACG
AGCTGGTGAAAGGTCATGGGACGGGCACAAACCGGAGAATAT
CGTGATTGAAATGGCCCGAGAAACAGACTACCCAGAAAG
GGCCAGAAAAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAG
AAGGAATCAAGGAGCTGGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCA
CCCGGTGGAAAAACACGACGCTGCAGAACGAGAAGCTCTAC
CTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACC
AAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGA
CCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGATC
GATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGA
AGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCTGTGAAGAAGAT
GAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATT
ACCCAGAGAAAGTTTGAACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCG
GCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTTCATCAAACG
GCAGCTGGTTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCG
CAGATCTTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGA
ACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAAGGTGATTACCCTGAA
AAGCAAACCTTGTGTGCGGACTTTTCGGAAGGACTTTTCAGTTT
TACAAAGTGAGAGAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATG
ACGCATACCTCAACGCTGTGGTTCGGTACCGCCCTGATCAA
AAAGTACCCTAAACTTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGAC
TACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCG

10

20

30

40

50

AACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGAAATACTTCTTTTA
CTCAAACATCATGAAC TTTTCAAGACTGAAATTACGCTG
GCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTA
ACGGAGAAACGGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGA
CTTCGCAACTGTTCGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTC
AATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTT
CAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCT
CATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA
GGATTTCGATTTCGCCGACTGTTCGCATACTCCGTCCTCGTGG
TGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATC
CGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCC
TCGTTTCGAGAAGAACC CGATTGATTTCTCTCGAGGCGAAGG
GTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAAC TCCC
CAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGC
ATGCTGGCTTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAATGAGC
TGGCCTTGCCTAGCAAAGTACGTCAAAC TCTCTATCTTGC
TTCGCACTACGAAAAACTCAAAGGGTCAACCGGAAGATAAC
GAACAGAAGCAGCTTTTTCGTGGAGCAGCACAAAGCATTATC
TGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTTCAAAGCG
CGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTTCG
GCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGG
CCGAGAACATTATCCACTTGTTCACCCCTGACTAACCTGGG
AGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATACTACTATCGAT
CGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGA
CCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAG
GATCGATCTGTTCGAGCTGGGGTGGCGATGGCGGTGGATCT
CCGAAAAAGAAGAGAAAGGTGTAATGA

202

Cas9 アミノ酸配列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFS NEMAKVDDSFHRL EESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKN
LFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDL
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTL LKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF I KPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVL PKHSLLYE
YFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTI LDFLKSDGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPA I KKGILQTVKVVD ELVKVMGRHKP
ENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY

10

20

30

40

50

DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVV
KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGELSELDKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKAT AKY
FFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKK
LKS VKELLGITIMERSSSF EKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII
KLPKYSLF ELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEK LKGS PEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEF
SKRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENI IHLFTLT
NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLY
ETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV

203

Cas9 mRNAオープンリーディングフレーム (ORF) 2

AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGA
ACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGA AUACA
AGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGA
CAGACACAGCAUCAAGAAGAACCU GAUCGGAGCACUGCUG
UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACUGAAGA
GAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAU
CUGC UACCU G CAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAG
GUCGACGACAGCUUCUUC CACAGACUGGAAGAAAGCUUCC
UGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUU
CGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUAC
CCGACA AU CUAC CACCU GAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCA
CAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAU CUACCU GGCACUGGC
ACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUC CUGAU CGAAGGA
GACCUGAAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCA
UCCAGCUGGUCCAGACAUAACAAC CAGCUGUUCGAAGAAAA
CCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG
AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAAAACCU GA
UCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGG
AAACCUGAUUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUC
AAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAAGACGCAAAGCUGCAGC
UGAGCAAGGACACAUAACGACGACGACCUGGACAACCUGCU
GGCACAGAUUCGGAGACCAGUACG CAGACCUGUUC CUGGCA
GCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUC C
UGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGC
AAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACAC CAC CAGGACCUG
ACACUGCUGAAGGCACUGGU CAGACAGCAGCUGCCGGAAA
AGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAU A
CGCAGGAUA CAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUC
UACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAA
CAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCU
GAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAAGCAUCCCGCAC
CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAGAGAC
AGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAA
GAUCGAAAAGAUC CUGACA UUCAGAAUCCCGUACUACGUC

10

20

30

40

50

GGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAUAACACCGUGGAACUUCGA
AGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUC
GAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAA
AGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCAC
AGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAA
GGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAAACAGAAAG
AGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGU
CACAGUCAAGCAGCUGAAGGGAAGACUACUUCAAGAAAGAU
GAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUACAGCGGAGUCGAAGACA
GAUUCAACGCAAGCCUGGGGAACAUAACACGACCUGCUGAA
GAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAC
GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGU
UCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUA
CGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAG
AGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGC
UGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAC
CCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAAACAGAAAC
UUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGG
AAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAAGCGGACAGGGAGACAG
CCUGCACGAACACAUCGCAAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA
AUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACG
AACUGGUCAAGGUCAUGGGGAAGACACAAGCCGGAAACAAC
CGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAACACAGACAACACAGAAAG
GGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAG
AAGGAUACAAGGAACUGGGGAAGCCAGAUAUCUGAAGGAACA
CCCGGUUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUAC
CUGUACUACCUGCAGAACGGGAAGAGACAUGUACGUCGACC
AGGAACUGGACAUAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGA
CCACAUCGUCCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUC
GACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAU
GAAGAAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAAGCUGAUC
ACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAGGCGAGAGAGAG
GAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCGAGGAUUCAUCAAGAG
ACAGCUGGUUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGCA
CAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAA
ACGACAAGCUGAUCAAGAGAAAGUCAAAGGUCAUCACACUGAA
GAGCAAGCUGGUCAAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUC
UACAAGGUCAAGAGAAAUCAACAACUACCACACGACACG
ACGCAUACCUGAACGCAAGUCGUCGGAAACAGCACUGAUCAA
GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCAACGGAGAC
UACAAGGUCAACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAAGAGCG
AACAGGAAAUUCGGAAGGGCAACAGCAAAAGUACUUCUUCUA
CAGCAACAUAUGAACUUCUUCUCAAAGACAGAAAUACACUG
GCAAAACGGAGAAAUCAAGAAAGAGACCUGAUCGAAACAA
ACGGAGAAACAGGAGAAAUUCGUCUGGGACAAGGGGAAGAGA
CUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCGAGGUC
AACAUUCGUCAAGAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCA
GCAAGGAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCU

10

20

30

40

50

GAUCGCAAGAAAGAAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGA
GGAUUCGACAGCCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUUCG
UCGCAAAGGUUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG
CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUACACAUAUGGAAAGAAGC
AGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAAGCAAAGG
GAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCC
GAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGA
AUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAAC
UGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGC
AAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCCGGAAGACAAC
GAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACC
UGGACGAAAUAUCAUGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAG
AGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC
GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG
CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAAACCCUGGG
AGCACCCGGCAGCAUUCAAAGUACUUCGACACAACAUAUCGAC
AGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAA
CACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAG
AAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC
CCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCUAG

204

Cas9 mRNA ORF1

AUGGAUAAGAAGUACUCAAUUCGGGCGUGGAUAUUCGGA
ACUAAAUUCCGUGGGGUUGGGCAGUGAUCACGGAUGAAUACA
AAGUGCCGUCCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGGAACACCGA
UAGACACAGCAUCAAGAAAAAUUCUAUCGGAGCCCUGCUG
UUUGACUCCGGCGAAACCGCAGAAAGCGACCCGGCUCAAAC
GUACCGCGGAGGCGACGCUACACCCGGCGGAAGAAUUCGCAU
CUGCUAUCUGCAAGAGAUUCUUUUCGAACGAAAUGGCAAAG
GUCGACGACAGCUUCUUCACCGCCUGGAAGAAUCUUUCC
UGGUGGAGGAGGACAAGAAGCAUGAACGGCAUCCUAUCUU
UGGAACAUCGUCGACGAAGUGGCGUACCACGAAAAGUAC
CCGACCAUCUACCAUCUGCGGAAGAAGUUGGUUGACUCAA
CUGACAAGGCCGACCUCAGAUUGAUUCUUGGCCCUUCGC
CCAUAUGAUCAA AUUCCGCGGACACUUCUGAUUCGAAGGC
GAUCUGAACCUGAUAAACUCCGACGUGGAUAAGCUUUUCA
UUCAACUGGUGCAGACCUACAACCAACUGUUCGAAGAAAA
CCCAAUCAAUUGCUGAGCGGCGUCGAUGCCAAGGCCAUCCUG
UCCGCCCGGCGUGUCGAAGUCGCGGCGCCUCGAAAACCUGA
UCGACACAGCUGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACUUUUCGG
CAACUUGAUUCGCUUCUCACUGGGACUACUCCCAAUUUC
AAGUCCAAAUUUUGACCUGGCCGAGGACGCGAAGCUGCAAC
UCUCAAAAGGACACCUACGACGACGACUUGGACA AUUUGCU
GGCACAAA AUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUGUUC CUUGCC
GCUAAGAACC UUUCGGACGCAAUUCUUGCUGUCCGAUAUCC
UGC GCGUGAACACCGAAAUAACCAAAGCGCCGCUUAGCGC
CUCGAUGAUUAAGCGGUACGACGAGCAUACCAAGGAUCUC
ACGCUUCUCAAAAGCGCUCGUGAGACAGCAACUGCCUGAAA
AGUACAAGGAGAUUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAAUGGGUA
CGCAGGGUACAUCGAUGGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUC

U A U A A G U U C A U C A A G C C A A U C C U G G A A A A G A U G G A C G G A A
C C G A A G A A C U G C U G G U C A A G C U G A A C A G G G A G G A U C U G C U
C C G G A A A C A G A G A A C C U U U G A C A A C G G A U C C A U U C C C C A C
C A G A U C C A U C U G G G U G A G C U G C A C G C C A U C U U G C G G C G C C
A G G A G G A C U U U U A C C C A U U C C U C A A G G A C A A C C G G G A A A A
G A U C G A G A A A A U U C U G A C G U U C C G C A U C C C G U A U U A C G U G
G G C C C A C U G G C G C G C G G C A A U U C G C G C U U C G C G U G G A U G A
C U A G A A A A U C A G A G G A A A C C A U C A C U C C U U G G A A U U U C G A
G G A A G U U G U G G A U A A G G G A G C U U C G G C A C A A A G C U U C A U C
G A A C G A A U G A C C A A C U U C G A C A A G A A U C U C C C A A A C G A G A
A G G U G C U U C C U A A G C A C A G C C U C C U U U A C G A A U A C U U C A C
U G U C U A C A A C G A A C U G A C U A A A G U G A A A U A C G U U A C U G A A
G G A A U G A G G A A G C C G G C C U U U C U G U C C G G A G A A C A G A A G A
A A G C A A U U G U C G A U C U G C U G U U C A A G A C C A A C C G C A A G G U
G A C C G U C A A G C A G C U U A A A G A G G A C U A C U U C A A G A A G A U C
G A G U G U U U C G A C U C A G U G G A A A U C A G C G G G G U G G A G G A C A
G A U U C A A C G C U U C G C U G G G A A C C U A U C A U G A U C U C C U G A A
G A U C A U C A A G G A C A A G G A C U U C C U U G A C A A C G A G G A G A A C
G A G G A C A U C C U G G A A G A U A U C G U C C U G A C C U U G A C C C U U U
U C G A G G A U C G C G A G A U G A U C G A G G A G A G G C U U A A G A C C U A
C G C U C A U C U C U U C G A C G A U A A G G U C A U G A A A C A A C U C A A G
C G C C G C C G G U A C A C U G G U U G G G C C G C C U C U C C C G C A A G C
U G A U C A A C G G U A U U C G C G A U A A A C A G A G C G G U A A A A C U A U
C C U G G A U U U C C U C A A A U C G G A U G G C U U C G C U A A U C G U A A C
U U C A U G C A A U U G A U C C A C G A C G A C A G C C U G A C C U U U A A G G
A G G A C A U C C A A A A A G C A C A A G U G U C C G G A C A G G G A G A C U C
A C U C C A U G A A C A C A U C G C G A A U C U G G C C G G U U C G C C G G C G
A U U A A G A A G G G A A U U C U G C A A A C U G U G A A G G U G G U C G A C G
A G C U G G U G A A G G U C A U G G G A C G G C A C A A A C C G G A G A A U A U
C G U G A U U G A A A U G G C C C G A G A A A A C C A G A C U A C C C A G A A G
G G C C A G A A A A A C U C C C G C G A A A G G A U G A A G C G G A U C G A A G
A A G G A A U C A A G G A G C U G G G C A G C C A G A U C C U G A A A G A G C A
C C C G G U G G A A A A C A C G C A G C U G C A G A A C G A G A A G C U C U A C
C U G U A C U A U U U G C A A A A U G G A C G G G A C A U G U A C G U G G A C C
A A G A G C U G G A C A U C A A U C G G U U G U C U G A U U A C G A C G U G G A
C C A C A U C G U U C C A C A G U C C U U U C U G A A G G A U G A C U C G A U C
G A U A A C A A G G U G U U G A C U C G C A G C G A C A A G A A C A G A G G G A
A G U C A G A U A A U G U G C C A U C G G A G G A G G U C G U G A A G A A G A U
G A A G A A U U A C U G G C G G C A G C U C C U G A A U G C G A A G C U G A U U
A C C C A G A G A A A G U U U G A C A A U C U C A C U A A A G C C G A G C G C G
G C G G A C U C U C A G A G C U G G A U A A G G C U G G A U U C A U C A A A C G
G C A G C U G G U C G A G A C U C G G C A G A U U A C C A A G C A C G U G G C G
C A G A U C U U G G A C U C C C G C A U G A A C A C U A A A U A C G A C G A G A
A C G A U A A G C U C A U C C G G G A A G U G A A G G U G A U U A C C C U G A A
A A G C A A A C U U G U G U C G G A C U U U C G G A A G G A C U U U C A G U U U
U A C A A A G U G A G A G A A A U C A A C A A C U A C C A U C A C G C G C A U G
A C G C A U A C C U C A A C G C U G U G G U C G G U A C C G C C C U G A U C A A
A A A G U A C C C U A A A C U U G A A U C G G A G U U U G U G U A C G G A G A C
U A C A A G G U C U A C G A C G U G A G G A A G A U G A U A G C C A A G U C C G
A A C A G G A A A U C G G G A A A G C A A C U G C G A A A U A C U U C U U U A

10

20

30

40

50

CUCAAACAUCAUGAACUUUUUCAAGACUGAAAUAACGCUG
GCCAAUGGAGAAAUUCAGGAAGAGGCCACUGAUCGAAACUA
ACGGAGAAACGGGCGAAAUCGUGUGGGACAAGGGCAGGGGA
CUUCGCAACUGUUCGCAAAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGUC
AAUAUUGUGAAGAAAACCGAAGUGCAAACCGGCGGAUUUU
CAAAGGAUUCGAUCCUCCCAAAGAGAAAUAGCGACAAGCU
CAUUGCACGCAAGAAAGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGA
GGAUUCGAUUCGCCGACUGUCGCAUACUCCGUCCUCGUGG
UGGCCAAGGUGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCUCAAAUC
CGUCAAAAGAGCUGCUGGGGAUUACCAUCAUGGAACGAUCC
UCGUUCGAGAAGAACC CGAUUGAUUUCCUCGAGGCGAAAGG
GUUACAAGGAGGUGAAGAAGGAUCUGAUCAUCAAACUCCC
CAAGUACUCACUGUUCGAACUGGAAAAUGGUCGGAAGCGC
AUGCUGGCUUCGGCCGGAGAACUCCAAAAAGGAAAUGAGC
UGGCCUUGCCUAGCAAGUACGUCAAACUUCUCUAUCUUGC
UUCGCACUACGAAAAACUCAAAAGGGUACCCGGAAGAUAAAC
GAACAGAAGCAGCUUUUCGUGGAGCAGCACAAAGCAUUAUC
UGGAUGAAAUCAUCGAACAAAUUCUCCGAGUUUUCAAAGCG
CGUGAUCCUCGCCGACGCCAACCUCGACAAAGUCCUGUCG
GCCUACAUAUAGCAUAGAGAUAAAGCCGAUCAGAGAACAGG
CCGAGAACAUUAUCCACUUGUUCACCCUGACUAACCUGGG
AGCCCCAGCCGCCUUCAAGUACUUCGAUACUACUAUCGAU
CGCAAAAGAUACACGUCCACCAAGGAAGUUCUGGACGCGA
CCUGAUCCACCAAAGCAUCACUGGACUCUACGAAACUAG
GAUCGAUCUGUCGCAGCUGGGUGGCGAUGGCGGUGGAUCU
CCGAAAAAGAAGAGAAAGGUGUAAUGA

205

Cas 9 ニッカーゼ (D10A) アミノ酸配列

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFS NEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNG
LFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKD TYDDDL D
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF I KPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDN
REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVL PKHSLLYE
YFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTI LDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPA I KKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKP
ENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY
DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVV

10

20

30

40

50

KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAY
FFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWD PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEK GKSKK
LKS VKEL LGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII
KLPKYS LFEL ENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEK LKGS PEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEF
SKRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLT
NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLY
ETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV

10

206

Cas9ニッカーゼ (D10A) mRNA ORF

AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGGCAAUCGGA
ACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACA
AGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGA
CAGACACAGCAUCAAGAAGAACCU GAUCGGAGCACUGCUG
UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACUGAAGA
GAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAU
CUGC UACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAG
GUCGACGACAGCUUCUUCACAGACUGGAAGAAAGCUUCC
UGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUU
CGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUAC
CCGACA AU CUACCACCU GAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCA
CAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAU CUACCUGGCACUGGC
ACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUC CUGAU CGAAGGA
GACCUGAACC CGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCA
UCCAGCUGGUCCAGACAUAACAAC CAGCUGUUCGAAGAAA
CCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGC AAUCCUG
AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAAAACCUGA
UCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGG
AAACCUGAUUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCCGAACUUC
AAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAAGACGCAAAGCUGCAGC
UGAGCAAGGACACAUAACGACGACGAC CUGGACAACCUGCU
GGCACAGAUUCGGAGACCAGUACG CAGACCUGUUC CUGGCA
GCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCC
UGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCCGCUGAGCGC
AAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUG
ACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAA
AGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAU
CGCAGGAUAACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUC
UACAAGUUCAUAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAA
CAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCU
GAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCAC
CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAAGAC
AGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAA
GAUCGAAAAGAUC CUGACAUAUCAGAAUCCCGUACUACGUC
GGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGA

20

30

40

50

CAAGAAAGAGCGAAGAAACAUAACACCGUGGAACUUCGA
AGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUC
GAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAA
AGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCAC
AGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAA
GGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAAGA
AGGCAAUUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAACAGAAAGGU
CACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAAGAUC
GAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUACAGCGGAGUCGAAGACA
GAUUCAACGCAAGCCUGGGAAACAUAACACGACCUGCUGAA
GAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAAC
GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGU
UCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUA
CGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAG
AGAAGAAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGC
UGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACA AU
CCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAAACAGAAAC
UUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUAUCAAGG
AAGACAUCCAGAAGGCCACAGGUACAGCGGACAGGGAGACAG
CCUGCACGAACACAUCGCAAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA
AUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACG
AACUGGUCAAGGUCAUGGGAAAGACACAAGCCGGAAACA AU
CGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACACAGACAACACAGAAAG
GGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUUGAAAG
AAGGAUAUAAGGAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGAACA
CCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUAC
CUGUACUACCUGCAGAACGGAAAGAGACAUGUACGUCGACC
AGGAACUGGACAUAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGA
CCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUC
GACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAAGUCGUCAAGAAGAU
GAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUC
ACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAGGCAGAGAGAG
GAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUAAGAG
ACAGCUGGUUCGAAACAAGACAGAUACAAGACGUCGCA
CAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAA
ACGACAAGCUGAUCAGAGAAAGUCAAGGUCAUACACUGAA
GAGCAAGCUGGUACAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUC
UACAAGGUACAGAGAAAUCAACAACUACCAACACGACACG
ACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA
GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAAUUCGUCAACGGAGAC
UACAAGGUCAACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCG
AACAGGAAAUUCGGAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUA
CAGCAACAUAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUG
GCAAACGGAGAAAUCAAGAAAGAGACC GCUGAUCGAAACAA
ACGGAGAAACAGGAGAAAUUCGUUCUGGGACAAGGGAAGAGA
CUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUC
AACAUUCGUCAAGAAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUA
GCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCU
GAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAAGUACGGA

10

20

30

40

50

GGAUUCGACAGCCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCG
UCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG
CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGC
AGCUUCGAAAAGAACC CGAUCGACUCCUGGAAGCAAAGG
GAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCC
GAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGA
AUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAAC
UGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGC
AAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAAC
GAACAGAAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACC
UGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCAGCAAGAG
AGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC
GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG
CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGG
AGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAUAUCGAC
AGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAA
CACUGAUCCACCAGAGCAUACACAGGACUGUACGAAACAAG
AAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC
CCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCUAG

207

dCas9 (D10A H840A) アミノ酸配列

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFV LG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAIL SARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKNG
LFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKD TYDDDL D
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF IKPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVL PKHSLLYE
YFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTI LDFLKSDGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPA IKKGILQTVKVVD ELVKVMGRHKP
ENIV IEMARENQT TQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY
DVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVV
KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLT KAERGGLSELDKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKY
FFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWD PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKK

L K S V K E L L G I T I M E R S S F E K N P I D F L E A K G Y K E V K K D L I I
K L P K Y S L F E L E N G R K R M L A S A G E L Q K G N E L A L P S K Y V N F L
Y L A S H Y E K L K G S P E D N E Q K Q L F V E Q H K H Y L D E I I E Q I S E F
S K R V I L A D A N L D K V L S A Y N K H R D K P I R E Q A E N I I H L F T L T
N L G A P A A F K Y F D T T I D R K R Y T S T K E V L D A T L I H Q S I T G L Y
E T R I D L S Q L G G D G G G S P K K K R K V

208

dC a s 9 (D10A H840A) mRNA ORF

A U G G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G C A A U C G G A
A C A A A C A G C G U C G G A U G G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A
A G G U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G G A A A C A C A G A
C A G A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G
U U C G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A
G A A C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A U
C U G C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G
G U C G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C
U G G U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A U C U U
C G G A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C
C C G A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A
C A G A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C
A C A C A U G A U C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A
G A C C U G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A
U C C A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U U C G A A G A A A A
C C C G A U C A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G
A G C G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A
U C G C A C A G C U G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G
A A A C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C
A A G A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C
U G A G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U
G G C A C A G A U C G G A G A C C A G U A C G C A G A C C U G U U C C U G G C A
G C A A A G A A C C U G A G C G A C G C A A U C C U G C U G A G C G A C A U C C
U G A G A G U C A A C A C A G A A A U C A C A A A G G C A C C G C U G A G C G C
A A G C A U G A U C A A G A G A U A C G A C G A A C A C C A C C A G G A C C U G
A C A C U G C U G A A G G C A C U G G U C A G A C A G C A G C U G C C G G A A A
A G U A C A A G G A A A U C U U C U U C G A C C A G A G C A A G A A C G G A U A
C G C A G G A U A C A U C G A C G G A G G A G C A A G C C A G G A A G A A U U C
U A C A A G U U C A U C A A G C C G A U C C U G G A A A A G A U G G A C G G A A
C A G A A G A A C U G C U G G U C A A G C U G A A C A G A G A A G A C C U G C U
G A G A A A G C A G A G A A C A U U C G A C A A C G G A A G C A U C C C G C A C
C A G A U C C A C C U G G G A G A A C U G C A C G C A A U C C U G A G A A G A C
A G G A A G A C U U C U A C C C G U U C C U G A A G G A C A A C A G A G A A A A
G A U C G A A A A G A U C C U G A C A U U C A G A A U C C C G U A C U A C G U C
G G A C C G C U G G C A A G A G G A A A C A G C A G A U U C G C A U G G A U G A
C A A G A A A G A G C G A A G A A A C A A U C A C A C C G U G G A A C U U C G A
A G A A G U C G U C G A C A A G G G A G C A A G C G C A C A G A G C U U C A U C
G A A A G A A U G A C A A A C U U C G A C A A G A A C C U G C C G A A C G A A A
A G G U C C U G C C G A A G C A C A G C C U G C U G U A C G A A U A C U U C A C
A G U C U A C A A C G A A C U G A C A A A G G U C A A G U A C G U C A C A G A A
G G A A U G A G A A A G C C G G C A U U C C U G A G C G G A G A A C A G A A G A
A G G C A A U C G U C G A C C U G C U G U U C A A G A C A A A C A G A A A G G U

10

20

30

40

50

CACAGUCAAGCAGCUGAAGGGAAGACUACUUCAAGAAAGAU
GAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUACAGCGGAGUCGAAGACA
GAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUAACACGACCUGCUGAA
GAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAAC
GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGU
UCGAAGACAGAGAAAUGAUUCGAAGAAAGACUGAAGACAUA
CGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAG
AGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGC
UGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACA
CCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAAACAGAAAC
UUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUAUCAAGG
AAGACAUCCAGAAGGCACAGGUACAGCGGACAGGGAGACAG
CCUGCACGAACACAUCGCAAAACCUGGCAGGAAGCCCCGCA
AUCAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACG
AACUGGUCAAGGUCAUGGGGAAGACACAAGCCGGAAACA
CGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG
GGACAGAAGAAACAGCAGAGAAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAG
AAGGAUCAAAGGAACUGGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACA
CCCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUAC
CUGUACUACCUGCAGAACGGAAAGAGACAUGUACGUCGACC
AGGAACUGGACAUAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGA
CGCAAUCGUCCCCGACAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUC
GACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGUCCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAU
GAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAAGCUGAUC
ACACAGAGAAAAGUUCGACAACCUGACAAGGCAGAGAGAG
GAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAG
ACAGCUGGUUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGCA
CAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAGGUACGACGAAA
ACGACAAGCUGAUCAAGAGAAAGUCAAGGUCAUACACUGAA
GAGCAAGCUGGUACAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUC
UACAAGGUUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCGCACACG
ACGCAUACCUGAACGACGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA
GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUUCUACGGAGAC
UACAAGGUUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAAGAGCG
AACAGGAAAUUCGGAAGGCAACAGCAAAAGUACUUCUUCUA
CAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAAGACAGAAAUCACACUG
GCAAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCUGCUGAUCGAAACAA
ACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGA
CUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCGAGGUC
AACAUUCGUCAAAGAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUA
GCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCU
GAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGGACCCGAAGAAAGUACGGA
GGAUUCGACAGCCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUUCG
UCGCAAAAGGUUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAAGCUGAAGAG
CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUACAAUCAUGGAAAGAAAGC
AGCUUCGAAAAGAAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAAGG
GAUACAAGGAAGUCAAGAAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCC
GAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAAGAAAGAGA
AUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAAGGGAAACGAAC

10

20

30

40

50

U G G C A C U G C C G A G C A A G U A C G U C A A C U U C C U G U A C C U G G C
A A G C C A C U A C G A A A A G C U G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C
G A A C A G A A G C A G C U G U U C G U C G A A C A G C A C A A G C A C U A C C
U G G A C G A A A U C A U C G A A C A G A U C A G C G A A U U C A G C A A G A G
A G U C A U C C U G G C A G A C G C A A A C C U G G A C A A G G U C C U G A G C
G C A U A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A U C A G A G A A C A G G
C A G A A A A C A U C A U C C A C C U G U U C A C A C U G A C A A A C C U G G G
A G C A C C G G C A G C A U U C A A G U A C U U C G A C A C A A C A A U C G A C
A G A A A G A G A U A C A C A A G C A C A A A G G A A G U C C U G G A C G C A A
C A C U G A U C C A C C A G A G C A U C A C A G G A C U G U A C G A A A C A A G
A A U C G A C C U G A G C C A G C U G G G A G G A G A C G G A G G A G G A A A G C
C C G A A G A A G A A G A G A A A G G U C U A G

209

C a s 9 ベアコード配列

G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G A C A U C G G A A C A
A A C A G C G U C G G A U G G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A A G G
U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G G A A A C A C A G A C A G
A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G U U C
G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A G A A
C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A U C U G
C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G G U C
G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C U G G
U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A U C U U C G G
A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C C C G
A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A C A G
A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C A C A
C A U G A U C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A G A C
C U G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A U C C
A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U U C G A A G A A A A C C C
G A U C A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G A G C
G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A U C G
C A C A G C U G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G A A A
C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C A A G
A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C U G A
G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U G G C
A C A G A U C G G A G A C C A G U A C G C A G A C C U G U U C C U G G C A G C A
A A G A A C C U G A G C G A C G C A A U C C U G C U G A G C G A C A U C C U G A
G A G U C A A C A C A G A A A U C A C A A A G G C A C C G C U G A G C G C A A G
C A U G A U C A A G A G A U A C G A C G A A C A C C A C C A G G A C C U G A C A
C U G C U G A A G G C A C U G G U C A G A C A G C A G C U G C C G G A A A A G U
A C A A G G A A A U C U U C U U C G A C C A G A G C A A G A A C G G A U A C G C
A G G A U A C A U C G A C G G A G G A G C A A G C C A G G A A G A A U U C U A C
A A G U U C A U C A A G C C G A U C C U G G A A A A G A U G G A C G G A A C A G
A A G A A C U G C U G G U C A A G C U G A A C A G A G A A G A C C U G C U G A G
A A A G C A G A G A A C A U U C G A C A A C G G A A G C A U C C C G C A C C A G
A U C C A C C U G G G A G A A C U G C A C G C A A U C C U G A G A A G A C A G G
A A G A C U U C U A C C C G U U C C U G A A G G A C A A C A G A G A A A A G A U
C G A A A A G A U C C U G A C A U U C A G A A U C C C G U A C U A C G U C G G A
C C G C U G G C A A G A G G A A A C A G C A G A U U C G C A U G G A U G A C A A
G A A A G A G C G A A G A A A C A A U C A C A C C G U G G A A C U U C G A A G A

10

20

30

40

50

AGUCGUCGACAAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA
AGAAUGACAAACUUCGACAAAGAACCGCCGAACGAAAAGG
UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAUAUCUUCACAGU
CUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGA
AUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAAAGG
CAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAGGUACAC
AGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAGAAGAUUCGAA
UGC UUCGACAGCGUCGAAAUACAGCGGAGUCGAAGACAGAU
UCAACGCAAGCCUGGGAAACAUACCACGACCUGCUGAAGAU
CAUCAAGGACAAAGGACUUCUGGACAAACGAAGAAAACGAA
GACAUCCUGGAAGACAUCGUCUGACACUGACACUGUUCG
AAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUAACGC
ACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGA
AGAAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGA
UCAACGGAAUACAGAGACAAGCAGAGCGGAAGACAAUCCU
GGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUUCGCAAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACA UUCAAGGAAG
ACAUCCAGAAAGGCACAGGUCAAGCGGACAGGGAGACAGCCU
GCACGAACACAUCGCAAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAUUC
AAGAAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU
CAUCGAAAUUGGCAAGAGAAACCAAGACAAACACAGAAAGGGA
CAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAAG
GAAUCAAGGAAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCC
GGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUG
UACUACCUGCAGAACGGAAAGAGACAUGUACGUCGACCAGG
AACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCA
CAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGAC
AACAAAGGUCCUGACAAGAAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAAGUCGUCAAGAAAGAUCAA
GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAAGCUGAUACA
CAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAG
GACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUAAGAGACA
GCUGGUCGAAACAAGACAGAUACAACAGCACGUCGCACAG
AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAAACG
ACAAGCUGAUACAGAGAAAGUCAAGGUCAUACACUGAAGAG
CAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUAC
AAGGUCAAGAGAAAUCAAACAACUACCACACGACACGACG
CAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAAGAA
GUACCCGAAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUAC
AAGGUCAACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAAGAGCGAAC
AGGAAAUUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAG
CAACAUCAUGAACUUCUUC AAGACAGAAAUCAACACUGGCA
AACGGAGAAAUACAGAAAGAGACC GCUGAUUCGAAACAAACG
GAGAAACAGGAGAAAUUCGUCUGGGACAAGGGAAAGAGACUU
CGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAAC
AUCGUCAAGAAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCA
AGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU
CGCAAGAAAGAAAGGACUGGGACCCGAAGAAAGUACGGAGGA
UUCGACAGCCC GACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUUCGUCG

10

20

30

40

50

C A A A G G U C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C U G A A G A G C G U
C A A G G A A C U G C U G G G A A U C A C A A U C A U G G A A A G A A G C A G C
U U C G A A A A G A A C C C G A U C G A C U U C C U G G A A G C A A A G G G A U
A C A A G G A A G U C A A G A A G G A C C U G A U C A U C A A G C U G C C G A A
G U A C A G C C U G U U C G A A C U G G A A A A C G G A A G A A A G A G A A U G
C U G G C A A G C G C A G G A G A A C U G C A G A A G G G A A A C G A A C U G G
C A C U G C C G A G C A A G U A C G U C A A C U U C C U G U A C C U G G C A A G
C C A C U A C G A A A A G C U G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C G A A
C A G A A G C A G C U G U U C G U C G A A C A G C A C A A G C A C U A C C U G G
A C G A A A U C A U C G A A C A G A U C A G C G A A U U C A G C A A G A G A G U
C A U C C U G G C A G A C G C A A A C C U G G A C A A G G U C C U G A G C G C A
U A C A A C A A G C A C A G A G A C A A A G C C G A U C A G A G A A C A G G C A G
A A A A C A U C A U C C A C C U G U U C A C A C U G A C A A A C C U G G G A G C
A C C G G C A G C A U U C A A G U A C U U C G A C A C A A C A A U C G A C A G A
A A G A G A U A C A C A A G C A C A A A G G A A G U C C U G G A C G C A A C A C
U G A U C C A C C A G A G C A U C A C A G G A C U G U A C G A A A C A A G A A U
C G A C C U G A G C C A G C U G G G A G G A G A C G G A G G A G G A A G C C C G
A A G A A G A A G A G A A A G G U C

210

C a s 9 ニ ッ カ ー ゼ ベ ア コ ー ド 配 列

G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G C A A U C G G A A C A
A A C A G C G U C G G A U G G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A A G G
U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G G A A A C A C A G A C A G
A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G U U C
G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A G A A
C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A A G A A A G A A C A G A A U C U G
C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G G U C
G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C U G G
U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A U C U U C G G
A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C C C G
A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A A G C U G G U C G A C A G C A C A G
A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C A C A
C A U G A U C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A G A C
C U G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A U C C
A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U U C G A A G A A A A C C C
G A U C A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G A G C
G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A U C G
C A C A G C U G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G A A A
C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C A A G
A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C U G A
G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U G G C
A C A G A U C G G A G A C C A G U A C G C A G A C C U G U U C C U G G C A G C A
A A G A A C C U G A G C G A C G C A A U C C U G C U G A G C G A C A U C C U G A
G A G U C A A C A C A G A A A U C A C A A A G G C A C C G C U G A G C G C A A G
C A U G A U C A A G A G A U A C G A C G A A C A C C A C C A G G A C C U G A C A
C U G C U G A A G G C A C U G G U C A G A C A G C A G C U G C C G G A A A A G U
A C A A G G A A A U C U U C U U C G A C C A G A G C A A G A A C G G A U A C G C
A G G A U A C A U C G A C G G A G G A G C A A G C C A G G A A G A A U U C U A C
A A G U U C A U C A A G C C G A U C C U G G A A A A G A U G G A C G G A A C A G
A A G A A C U G C U G G U C A A G C U G A A C A G A G A A G A C C U G C U G A G

10

20

30

40

50

AAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAAGCAUCCCGCACCCAG
AUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAAGACAGG
AAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU
CGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCCGA
CCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAUAACACCCGUGGAACUUCGAAGA
AGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA
AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGG
UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAUAUACUUCACAGU
CUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUACACAGAAGGA
AUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGG
CAAUCGUCGACCUGCUGUUCAGAGACAAACAGAAAGGUAC
AGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAGAAAGAUUCGAA
UGCUCGACAGCGUCGAAAUACAGCGGAGUCGAAGACAGAU
UCAACGCAAGCCUGGGAACAUAACACGACCUGCUGAAGAU
CAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAA
GACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCG
AAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUAACGC
ACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGA
AGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGA
UCAACGGAAUACAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAUAUCU
GGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUAUCAAAGGAAG
ACAUCCAGAAAGGCACAGGUCAAGCGGACAGGGAGACAGCCU
GCACGAACACAUCGCAAAACCCUGGCAGGAAGCCCGGCAUUC
AAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU
CAUCGAAAUGGCAAGAGAAACCAAGACAACACAGAAAGGGA
CAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUUCGAAGAAAG
GAAUCAAGGAAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGAAACACC
GGUCGAAAACACACAGCUGCAGAAACGAAAAGCUGUACCU
UACUACCUGCAGAACGGAAAGAGACAUGUACGUUCGACCAGG
AACUGGACAUAACAAGACUGAGCGACUACGACGUUCGACCA
CAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGAC
AACAAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAAGUUCGUCAAGAAGAUCAA
GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAGCUGAUACA
CAGAGAAAGUUCGACAACCCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAG
GACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUAUCAAGAGACA
GCUGGUUCGAAACAAGACAGAUACAAGACACGUCGCACAG
AUCCUGGACAGCAGAAUGAACAACAAGUACGACGAAAACG
ACAAGCUGAUACAGAGAAAGUCAAGGUCAUACACUGAAGAG
CAAGCUGGUACAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUAC
AAGGUACAGAGAAAUCAACAACUACCACACGACACGACG
CAUACCUGAAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAAGAA
GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUUACGGAGACUAC
AAGGUUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAGAGCGAAC
AGGAAAUUCGGAAGGCAACAGCAAAAGUACUUCUUCUACAG
CAACAUCAUGAACUUCUUCAGAGACAGAAAUACACACUGGCA
AACGGAGAAAUACAGAAAGAGACCGCUGAUUCGAAACAACG

10

20

30

40

50

G A G A A A C A G G A G A A A U C G U C U G G G A C A A G G G A A G A G A C U U
C G C A A C A G U C A G A A A G G U C C U G A G C A U G C C G C A G G U C A A C
A U C G U C A A G A A G A C A G A A G U C C A G A C A G G A G G A U U C A G C A
A G G A A A G C A U C C U G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C U G A U
C G C A A G A A A G A A G G A C U G G G A C C C G A A G A A G U A C G G A G G A
U U C G A C A G C C C G A C A G U C G C A U A C A G C G U C C U G G U C G U C G
C A A A G G U C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C U G A A G A G C G U
C A A G G A A C U G C U G G G A A U C A C A A U C A U G G A A A G A A G C A G C
U U C G A A A A G A A C C C G A U C G A C U U C C U G G A A G C A A A G G G A U
A C A A G G A A G U C A A G A A G G A C C U G A U C A U C A A G C U G C C G A A
G U A C A G C C U G U U C G A A C U G G A A A A C G G A A G A A A G A G A A U G
C U G G C A A G C G C A G G A G A A C U G C A G A A G G G A A A C G A A C U G G
C A C U G C C G A G C A A G U A C G U C A A C U U C C U G U A C C U G G C A A G
C C A C U A C G A A A A G C U G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C G A A
C A G A A G C A G C U G U U C G U C G A A C A G C A C A A G C A C U A C C U G G
A C G A A A U C A U C G A A C A G A U C A G C G A A U U C A G C A A G A G A G U
C A U C C U G G C A G A C G C A A A C C U G G A C A A G G U C C U G A G C G C A
U A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A U C A G A G A A C A G G C A G
A A A A C A U C A U C C A C C U G U U C A C A C U G A C A A A C C U G G G A G C
A C C G G C A G C A U U C A A G U A C U U C G A C A C A A C A A U C G A C A G A
A A G A G A U A C A C A A G C A C A A A G G A A G U C C U G G A C G C A A C A C
U G A U C C A C C A G A G C A U C A C A G G A C U G U A C G A A A C A A G A A U
C G A C C U G A G C C A G C U G G G A G G A G A C G G A G G A G G A A G C C C G
A A G A A G A A G A G A A A G G U C

2 1 1

d C a s 9 ベアコード配列

G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G C A A U C G G A A C A
A A C A G C G U C G G A U G G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A A G G
U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G G A A A C A C A G A C A G
A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G U U C
G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A G A A
C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A U C U G
C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G G U C
G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C U G G
U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A U C U U C G G
A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C C C G
A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A C A G
A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C A C A
C A U G A U C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A G A C
C U G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A U C C
A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U U C G A A G A A A A C C C
G A U C A A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G A G C
G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A U C G
C A C A G C U G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G A A A
C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C A A G
A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C U G A
G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U G G C
A C A G A U C G G A G A C C A G U A C G C A G A C C U G U U C C U G G C A G C A
A A G A A C C U G A G C G A C G C A A U C C U G C U G A G C G A C A U C C U G A
G A G U C A A C A C A G A A A U C A C A A A G G C A C C G C U G A G C G C A A G

10

20

30

40

50

CAUGAUC AAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACA
CUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGU
ACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGC
AGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC
AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAACAG
AAGAACUGCUGGUC AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAG
AAAGCAGAGAAACA UUCGACAACGGAAAGCAUCCCGCACACAG
AUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGG
AAGACUUCUACCCG UUCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU
CGAAAAGAUCCUGACA UUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGA
CCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACA AUCAACACCGUGGAACUUCGAAGA
AGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA
AGAAUGACAAAACUUCGACAAGAACCCUGCCGAACGAAAAGG
UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGU
CUACAACGAACUGACA AAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGA
AUGAGAAAGCCGGCAUUC CUGAGCGGAGAACAGAAAGAGG
CAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCAAC
AGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAAGAUUCGAA
UGC UUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAU
UCAACGCAAGCCUGGGAAACAUAACCACGACCUGCUGAAGAU
CAUCAAGGACAAGGACUUC CUGGACAACGAAGAAAACGAA
GACAUCCUGGAAGACAUCG UCCUGACACUGACACUGUUCG
AAGACAGAGAAAUGAUUCGAAGAAAGACUGAAGACAUAACGC
ACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGA
AGAAAGAUACACAGGAUGGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGA
UCAACGGAAUUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCU
GGACUUC CUGAAGAGCGACGGAAUUCGCAAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACA UUCAAGGGAAG
ACAUCCAGAAAGGCACAGGUCAAGCGGACAGGGAGACAGCCU
GCACGAACACAUUCGCAAAAC CUGGCAGGAAGCCCGGCAUUC
AAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU
CAUCGAAA AUGGCAAGAGAAAAC CAGACAACACAGAAAGGGA
CAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUUCGAAGAAAG
GAAUCAAGGAAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGAAACACCC
GGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUG
UACUACCUGCAGAACGGAAAGAGACAUGUACGUCGACCAAGG
AACUGGACAUAACAAGACUGAGCGACUACGACGUCGACGC
AAUCGUCCCGCAGAGCUUC CUGAAGGACGACAGCAUCGAC
AACAAAGGUCCUGACAAGAAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAAGUCGUCAAGAAAGAUCAA
GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAAGCUGAUACACA
CAGAGAAAGUUCGACAACCUGACA AAGGCAGAGAGAGGAG
GACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACA
GCUGGUCGAAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG
AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACA AAGUACGACGAAAACG
ACAAGCUGAUCAAGAGAAAGUCAAGGUCAUACACACUGAAGAG
CAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUAC
AAGGUCAAGAGAAAUCAACAACUAACCACCAACGCACACGACG

10

20

30

40

50

CAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUC AAGAA
 GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUAC
 AAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAAC
 AGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAG
 CAACAUCAUGAACUUCUUC AAGACAGAAAUACACACUGGCA
 AACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCCGUGAUCGAAACAAACG
 GAGAAACAGGAGAAAUUCGUCUGGGACAAGGGGAAGAGACUU
 CGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAAC
 AUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGGAUUCAGCA
 AGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU
 CGCAAGAAAGAAGGACUGGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGA
 UUCGACAGCCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCG
 CAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGU
 CAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGC
 UUCGAAAAGAACC CGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAU
 ACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAA
 GUACAGCCUGUUCGAACUGGAAACGGAAAGAAAGAGAAUG
 CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAAGGGAAACGAACUGG
 CACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUC CUGUACCUGGCAAG
 CCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAA
 CAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGG
 ACGAAAUCAUCGAACAGAU CAGCGAAUUCAGCAAGAGAGU
 CAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA
 UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCGAG
 AAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGC
 ACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACA AU CGACAGA
 AAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACAC
 UGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAU
 CGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCG
 AAGAAGAAGAGAAAGGUC

10

20

30

212

Cas9のアミノ酸配列 (NLSなし)

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFV LG
 NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
 NRICYLQEIFS NEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHERH
 PIFGNI VDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
 ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLF
 EENPINASGVDAKAIL SARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNG
 LFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLD
 NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
 LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK
 NGYAGYIDGGASQEEFYKF I KPILEKMDGTEELLVKLNRE
 DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
 REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
 NFEEVVDKGASAQSFIERM TNFDKNLPNEKVLPKHSLLYE
 YFTVYNE LTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
 RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHD
 LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREMIEERL
 KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
 KTI LDFLKS DGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ

40

50

G D S L H E H I A N L A G S P A I K K G I L Q T V K V V D E L V K V M G R H K P
E N I V I E M A R E N Q T T Q K G Q K N S R E R M K R I E E G I K E L G S Q I L
K E H P V E N T Q L Q N E K L Y L Y Y L Q N G R D M Y V D Q E L D I N R L S D Y
D V D H I V P Q S F L K D D S I D N K V L T R S D K N R G K S D N V P S E E V V
K K M K N Y W R Q L L N A K L I T Q R K F D N L T K A E R G G L S E L D K A G F
I K R Q L V E T R Q I T K H V A Q I L D S R M N T K Y D E N D K L I R E V K V I
T L K S K L V S D F R K D F Q F Y K V R E I N N Y H H A H D A Y L N A V V G T A
L I K K Y P K L E S E F V Y G D Y K V Y D V R K M I A K S E Q E I G K A T A K Y
F F Y S N I M N F F K T E I T L A N G E I R K R P L I E T N G E T G E I V W D K
G R D F A T V R K V L S M P Q V N I V K K T E V Q T G G F S K E S I L P K R N S
D K L I A R K K D W D P K K Y G G F D S P T V A Y S V L V V A K V E K G K S K K
L K S V K E L L G I T I M E R S S F E K N P I D F L E A K G Y K E V K K D L I I
K L P K Y S L F E L E N G R K R M L A S A G E L Q K G N E L A L P S K Y V N F L
Y L A S H Y E K L K G S P E D N E Q K Q L F V E Q H K H Y L D E I I E Q I S E F
S K R V I L A D A N L D K V L S A Y N K H R D K P I R E Q A E N I I H L F T L T
N L G A P A A F K Y F D T T I D R K R Y T S T K E V L D A T L I H Q S I T G L Y
E T R I D L S Q L G G D

2 1 3

開始コドンおよび終止コドンを含む、表3に列挙される最小ウリジンコドンを使用
した、配列番号13をコードするCas9 mRNA ORF

A U G G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G A C A U C G G A
A C A A A C A G C G U C G G A U G G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A
A G G U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G G A A A C A C A G A
C A G A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G
U U C G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A
G A A C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A U
C U G C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G
G U C G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C
U G G U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A U C U U
C G G A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C
C C G A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A
C A G A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C
A C A C A U G A U C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A
G A C C U G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A
U C C A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U U C G A A G A A A A
C C C G A U C A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G
A G C G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A
U C G C A C A G C U G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G
A A A C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C
A A G A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C
U G A G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U
G G C A C A G A U C G G A G A C C A G U A C G C A G A C C U G U U C C U G G C A
G C A A A G A A C C U G A G C G A C G C A A U C C U G C U G A G C G A C A U C C
U G A G A G U C A A C A C A G A A A U C A C A A A G G C A C C G C U G A G C G C
A A G C A U G A U C A A G A G A U A C G A C G A A C A C C A C C A G G A C C U G
A C A C U G C U G A A G G C A C U G G U C A G A C A G C A G C U G C C G G A A A
A G U A C A A G G A A A U C U U C U U C G A C C A G A G C A A G A A C G G A U A
C G C A G G A U A C A U C G A C G G A G G A G C A A G C C A G G A A G A A U U C
U A C A A G U U C A U C A A G C C G A U C C U G G A A A A G A U G G A C G G A A
C A G A A G A A C U G C U G G U C A A G C U G A A C A G A G A A G A C C U G C U

10

20

30

40

50

G A G A A A G C A G A G A A C A U U C G A C A A C G G A A G C A U C C C G C A C
C A G A U C C A C C U G G G A G A A C U G C A C G C A A U C C U G A G A A G A C
A G G A A G A C U U C U A C C C G U U C C U G A A G G A C A A C A G A G A A A A
G A U C G A A A A G A U C C U G A C A U U C A G A A U C C C G U A C U A C G U C
G G A C C G C U G G C A A G A G G A A A C A G C A G A U U C G C A U G G A U G A
C A A G A A A G A G C G A A G A A A C A A U C A C A C C G U G G A A C U U C G A
A G A A G U C G U C G A C A A G G G A G C A A G C G C A C A G A G C U U C A U C
G A A A G A A U G A C A A A C U U C G A C A A G A A C C U G C C G A A C G A A A
A G G U C C U G C C G A A G C A C A G C C U G C U G U A C G A A U A C U U C A C
A G U C U A C A A C G A A C U G A C A A A G G U C A A G U A C G U C A C A G A A
G G A A U G A G A A A G C C G G C A U U C C U G A G C G G A G A A C A G A A G A
A G G C A A U C G U C G A C C U G C U G U U C A A G A C A A A C A G A A A G G U
C A C A G U C A A G C A G C U G A A G G A A G A C U A C U U C A A G A A G A U C
G A A U G C U U C G A C A G C G U C G A A A U C A G C G G A G U C G A A G A C A
G A U U C A A C G C A A G C C U G G G A A C A U A C C A C G A C C U G C U G A A
G A U C A U C A A G G A C A A G G A C U U C C U G G A C A A C G A A G A A A A C
G A A G A C A U C C U G G A A G A C A U C G U C C U G A C A C U G A C A C U G U
U C G A A G A C A G A G A A A U G A U C G A A G A A A G A C U G A A G A C A U A
C G C A C A C C U G U U C G A C G A C A A G G U C A U G A A G C A G C U G A A G
A G A A G A A G A U A C A C A G G A U G G G G A A G A C U G A G C A G A A A G C
U G A U C A A C G G A A U C A G A G A C A A G C A G A G C G G A A A G A C A A U
C C U G G A C U U C C U G A A G A G C G A C G G A U U C G C A A A C A G A A A C
U U C A U G C A G C U G A U C C A C G A C G A C A G C C U G A C A U U C A A G G
A A G A C A U C C A G A A G G C A C A G G U C A G C G G A C A G G G A G A C A G
C C U G C A C G A A C A C A U C G C A A A C C U G G C A G G A A G C C C G G C A
A U C A A G A A G G G A A U C C U G C A G A C A G U C A A G G U C G U C G A C G
A A C U G G U C A A G G U C A U G G G A A G A C A C A A G C C G G A A A A C A U
C G U C A U C G A A A U G G C A A G A G A A A A C C A G A C A A C A C A G A A G
G G A C A G A A G A A C A G C A G A G A A A G A A U G A A G A G A A U C G A A G
A A G G A A U C A A G G A A C U G G G A A G C C A G A U C C U G A A G G A A C A
C C C G G U C G A A A A C A C A C A G C U G C A G A A C G A A A A G C U G U A C
C U G U A C U A C C U G C A G A A C G G A A G A G A C A U G U A C G U C G A C C
A G G A A C U G G A C A U C A A C A G A C U G A G C G A C U A C G A C G U C G A
C C A C A U C G U C C C G C A G A G C U U C C U G A A G G A C G A C A G C A U C
G A C A A C A A G G U C C U G A C A A G A A G C G A C A A G A A C A G A G G A A
A G A G C G A C A A C G U C C C G A G C G A A G A A G U C G U C A A G A A G A U
G A A G A A C U A C U G G A G A C A G C U G C U G A A C G C A A A G C U G A U C
A C A C A G A G A A A G U U C G A C A A C C U G A C A A A G G C A G A G A G A G
G A G G A C U G A G C G A A C U G G A C A A G G C A G G A U U C A U C A A G A G
A C A G C U G G U C G A A A C A A G A C A G A U C A C A A A G C A C G U C G C A
C A G A U C C U G G A C A G C A G A A U G A A C A C A A A G U A C G A C G A A A
A C G A C A A G C U G A U C A G A G A A G U C A A G G U C A U C A C A C U G A A
G A G C A A G C U G G U C A G C G A C U U C A G A A A G G A C U U C C A G U U C
U A C A A G G U C A G A G A A A U C A A C A A C U A C C A C C A C G C A C A C G
A C G C A U A C C U G A A C G C A G U C G U C G G A A C A G C A C U G A U C A A
G A A G U A C C C G A A G C U G G A A A G C G A A U U C G U C U A C G G A G A C
U A C A A G G U C U A C G A C G U C A G A A A G A U G A U C G C A A A G A G C G
A A C A G G A A A U C G G A A A G G C A A C A G C A A A G U A C U U C U U C U A
C A G C A A C A U C A U G A A C U U C U U C A A G A C A G A A A U C A C A C U G
G C A A A C G G A G A A A U C A G A A A G A G A C C G C U G A U C G A A A C A A

10

20

30

40

50

A C G G A G A A A C A G G A G A A A U C G U C U G G G A C A A G G G A A G A G A
 C U U C G C A A C A G U C A G A A A G G U C C U G A G C A U G C C G C A G G U C
 A A C A U C G U C A A G A A G A C A G A A G U C C A G A C A G G A G G A U U C A
 G C A A G G A A A G C A U C C U G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C U
 G A U C G C A A G A A A G A A G G A C U G G G A C C C G A A G A A G U A C G G A
 G G A U U C G A C A G C C C G A C A G U C G C A U A C A G C G U C C U G G U C G
 U C G C A A A G G U C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C U G A A G A G
 C G U C A A G G A A C U G C U G G G A A U C A C A A U C A U G G A A A G A A G C
 A G C U U C G A A A A G A A C C C G A U C G A C U U C C U G G A A G C A A A G G
 G A U A C A A G G A A G U C A A G A A G G A C C U G A U C A U C A A G C U G C C
 G A A G U A C A G C C U G U U C G A A C U G G A A A A C G G A A G A A A G A G A
 A U G C U G G C A A G C G C A G G A G A A C U G C A G A A G G G A A A C G A A C
 U G G C A C U G C C G A G C A A G U A C G U C A A C U U C C U G U A C C U G G C
 A A G C C A C U A C G A A A A G C U G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C
 G A A C A G A A G C A G C U G U U C G U C G A A C A G C A C A A G C A C U A C C
 U G G A C G A A A U C A U C G A A C A G A U C A G C G A A U U C A G C A A G A G
 A G U C A U C C U G G C A G A C G C A A A C C U G G A C A A G G U C C U G A G C
 G C A U A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A U C A G A G A A C A G G
 C A G A A A A C A U C A U C C A C C U G U U C A C A C U G A C A A A C C U G G G
 A G C A C C G G C A G C A U U C A A G U A C U U C G A C A C A A C A A U C G A C
 A G A A A G A G A U A C A C A A G C A C A A A G G A A G U C C U G G A C G C A A
 C A C U G A U C C A C C A G A G C A U C A C A G G A C U G U A C G A A A C A A G
 A A U C G A C C U G A G C C A G C U G G G A G G A G A C U A G

10

20

2 1 4

表3に列挙されるような最小ウリジンコドンを使用した、配列番号13をコードする
 C a s 9 ニッカーゼコード配列（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード
 ド配列に含めるのに好適である）

G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G A C A U C G G A A C A
 A A C A G C G U C G G A U G G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A A G G
 U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G G A A A C A C A G A C A G
 A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G U U C
 G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A G A A
 C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A U C U G
 C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G G U C
 G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C U G G
 U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A U C U U C G G
 A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C C C G
 A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A C A G
 A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C A C A
 C A U G A U C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A G A C
 C U G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A U C C
 A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U U C G A A G A A A C C C
 G A U C A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G A G C
 G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A U C G
 C A C A G C U G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G A A A
 C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C A A G
 A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C U G A
 G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U G G C
 A C A G A U C G G A G A C C A G U A C G C A G A C C U G U U C C U G G C A G C A
 A A G A A C C U G A G C G A C G C A A U C C U G C U G A G C G A C A U C C U G A

30

40

50

GAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGGCACCGCUGAGCGCAAG
CAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACA
CUGCUGAAGGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGU
ACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGC
AGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC
AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAACAG
AAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAG
AAAGCAGAGAAACAUUCGACAAACGGAAAGCAUCCCGCACCCAG
AUCCACCUGGGAGAAACUGCACGCAAUCCUGAGAAAGACAGG
AAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU
CGAAAAGAUAUCCUGACAUAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGA
CCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAUAACACCUGGGAACUUCGAAGA
AGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA
AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCCUGCCGAACGAAAAGG
UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAUAUACUUCACAGU
CUACAACGAACUGACAAGAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGA
AUGAGAAAGCCGGCAUUCUUGAGCGGAGAACAGAAAGAGG
CAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUACAC
AGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUUCGAA
UGC UUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAU
UCAACGCAAGCCUGGGAACAUAACCACGACCUGCUGAAGAU
CAUCAAGGACAAGGACUUCUUGGACAACGAAGAAAACGAA
GACAUCCUGGAAGACAUCGUCUCCUGACACUGACACUGUUCG
AAGACAGAGAAAUGAUUCGAAGAAAGACUGAAGACAUAACGC
ACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGA
AGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGA
UCAACGGAAUUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAUAUCCU
GGACUUCUUGAAGAGCGACGGGAUUCGCAAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUAUCAAGGAAG
ACAUCCAGAAAGGCACAGGUCAAGCGGACAGGGAGACAGCCU
GCACGAACACAUCGCAAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUUC
AAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU
CAUCGAAAUGGCAAGAGAAACACAGACAACACAGAAGGGA
CAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUUCGAAGAAAG
GAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCC
GGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCCUG
UACUACCUGCAGAACGGAAAGAGACAUGUACGUCGACCAGG
AACUGGACAUAACAAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCA
CAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGAC
AACAAAGGUCCUGACAAGAAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAAGUUCGUCAAGAAAGAUCAA
GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAAGCUGAUACA
CAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAGGAGAGAGAGGAG
GACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACA
GCUGGUUCGAAAACAAGACAGAUACAACAAGCACGUCGCACAG
AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAAACG
ACAAGCUGAUUCAGAGAAAGUCAAGGUCAUACACUGAAGAG
CAAGCUGGUUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUAC

10

20

30

40

50

AAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACACGACACGACG
CAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUAAGAA
GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUAC
AAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAAC
AGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAG
CAACAUCAUGAACUUCUUCACAGACAGAAAUCACACUGGCA
AACGGAGAAAUCAGAAAGAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACG
GAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGGAAGAGACUU
CGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCGAGGUCAAC
AUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCA
AGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU
CGCAAGAAAGAAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGA
UUCGACAGCCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCG
CAAAGGUCGAAAAGGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGU
CAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGC
UUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGGAU
ACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAA
GUACAGCCUGUUCGAACUGGGAACACGGGAAGAAAGAGAAUG
CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGGAAACGAACUGG
CACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAG
CCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAA
CAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGG
ACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCAGCAAGAGAGU
CAUCCUGGCAGACGCAAACUGGACAAGGUCCUGAGCGCA
UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAG
AAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGC
ACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAUCGACAGA
AAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACAC
UGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAU
CGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC

10

20

30

215

Cas9ニッカーゼのアミノ酸配列 (NLSなし)

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRL EESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKN
LFGNLIALLSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDDL
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF I KPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
REKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYE
YFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREMI EERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTI LDFLKS DGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ

40

50

G D S L H E H I A N L A G S P A I K K G I L Q T V K V V D E L V K V M G R H K P
E N I V I E M A R E N Q T T Q K G Q K N S R E R M K R I E E G I K E L G S Q I L
K E H P V E N T Q L Q N E K L Y L Y Y L Q N G R D M Y V D Q E L D I N R L S D Y
D V D H I V P Q S F L K D D S I D N K V L T R S D K N R G K S D N V P S E E V V
K K M K N Y W R Q L L N A K L I T Q R K F D N L T K A E R G G L S E L D K A G F
I K R Q L V E T R Q I T K H V A Q I L D S R M N T K Y D E N D K L I R E V K V I
T L K S K L V S D F R K D F Q F Y K V R E I N N Y H H A H D A Y L N A V V G T A
L I K K Y P K L E S E F V Y G D Y K V Y D V R K M I A K S E Q E I G K A T A K Y
F F Y S N I M N F F K T E I T L A N G E I R K R P L I E T N G E T G E I V W D K
G R D F A T V R K V L S M P Q V N I V K K T E V Q T G G F S K E S I L P K R N S
D K L I A R K K D W D P K K Y G G F D S P T V A Y S V L V V A K V E K G K S K K
L K S V K E L L G I T I M E R S S F E K N P I D F L E A K G Y K E V K K D L I I
K L P K Y S L F E L E N G R K R M L A S A G E L Q K G N E L A L P S K Y V N F L
Y L A S H Y E K L K G S P E D N E Q K Q L F V E Q H K H Y L D E I I E Q I S E F
S K R V I L A D A N L D K V L S A Y N K H R D K P I R E Q A E N I I H L F T L T
N L G A P A A F K Y F D T T I D R K R Y T S T K E V L D A T L I H Q S I T G L Y
E T R I D L S Q L G G D

216

開始コドンおよび終止コドンを有する、表3に列挙される最小ウリジンコドンを使用
した、配列番号16をコードするCas9ニッカーゼmRNA ORF

A U G G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G C A A U C G G A
A C A A A C A G C G U C G G A U G G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A
A G G U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G G A A A C A C A G A
C A G A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G
U U C G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A
G A A C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A U
C U G C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G
G U C G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C
U G G U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A U C U U
C G G A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C
C C G A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A
C A G A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C
A C A C A U G A U C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A
G A C C U G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A
U C C A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U U C G A A G A A A A
C C C G A U C A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G
A G C G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A
U C G C A C A G C U G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G
A A A C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C
A A G A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C
U G A G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U
G G C A C A G A U C G G A G A C C A G U A C G C A G A C C U G U U C C U G G C A
G C A A A G A A C C U G A G C G A C G C A A U C C U G C U G A G C G A C A U C C
U G A G A G U C A A C A C A G A A A U C A C A A A G G C A C C G C U G A G C G C
A A G C A U G A U C A A G A G A U A C G A C G A A C A C C A C C A G G A C C U G
A C A C U G C U G A A G G C A C U G G U C A G A C A G C A G C U G C C G G A A A
A G U A C A A G G A A A U C U U C U U C G A C C A G A G C A A G A A C G G A U A
C G C A G G A U A C A U C G A C G G A G G A G C A A G C C A G G A A G A A U U C
U A C A A G U U C A U C A A G C C G A U C C U G G A A A A G A U G G A C G G A A
C A G A A G A A C U G C U G G U C A A G C U G A A C A G A G A A G A C C U G C U

10

20

30

40

50

G A G A A A G C A G A G A A C A U U C G A C A A C G G A A G C A U C C C G C A C
C A G A U C C A C C U G G G A G A A C U G C A C G C A A U C C U G A G A A G A C
A G G A A G A C U U C U A C C C G U U C C U G A A G G A C A A C A G A G A A A A
G A U C G A A A A G A U C C U G A C A U U C A G A A U C C C G U A C U A C G U C
G G A C C G C U G G C A A G A G G A A A C A G C A G A U U C G C A U G G A U G A
C A A G A A A G A G C G A A G A A A C A A U C A C A C C G U G G A A C U U C G A
A G A A G U C G U C G A C A A G G G A G C A A G C G C A C A G A G C U U C A U C
G A A A G A A U G A C A A A C U U C G A C A A G A A C C U G C C G A A C G A A A
A G G U C C U G C C G A A G C A C A G C C U G C U G U A C G A A U A C U U C A C
A G U C U A C A A C G A A C U G A C A A A G G U C A A G U A C G U C A C A G A A
G G A A U G A G A A A G C C G G C A U U C C U G A G C G G A G A A C A G A A G A
A G G C A A U C G U C G A C C U G C U G U U C A A G A C A A A C A G A A A G G U
C A C A G U C A A G C A G C U G A A G G A A G A C U A C U U C A A G A A G A U C
G A A U G C U U C G A C A G C G U C G A A A U C A G C G G A G U C G A A G A C A
G A U U C A A C G C A A G C C U G G G A A C A U A C C A C G A C C U G C U G A A
G A U C A U C A A G G A C A A G G A C U U C C U G G A C A A C G A A G A A A A C
G A A G A C A U C C U G G A A G A C A U C G U C C U G A C A C U G A C A C U G U
U C G A A G A C A G A G A A A U G A U C G A A G A A A G A C U G A A G A C A U A
C G C A C A C C U G U U C G A C G A C A A G G U C A U G A A G C A G C U G A A G
A G A A G A A G A U A C A C A G G A U G G G G A A G A C U G A G C A G A A A G C
U G A U C A A C G G A A U C A G A G A C A A G C A G A G C G G A A A G A C A A U
C C U G G A C U U C C U G A A G A G C G A C G G A U U C G C A A A C A G A A A C
U U C A U G C A G C U G A U C C A C G A C G A C A G C C U G A C A U U C A A G G
A A G A C A U C C A G A A G G C A C A G G U C A G C G G A C A G G G A G A C A G
C C U G C A C G A A C A C A U C G C A A A C C U G G C A G G A A G C C C G G C A
A U C A A G A A G G G A A U C C U G C A G A C A G U C A A G G U C G U C G A C G
A A C U G G U C A A G G U C A U G G G A A G A C A C A A G C C G G A A A A C A U
C G U C A U C G A A A U G G C A A G A G A A A A C C A G A C A A C A C A G A A G
G G A C A G A A G A A C A G C A G A G A A A G A A U G A A G A G A A U C G A A G
A A G G A A U C A A G G A A C U G G G A A G C C A G A U C C U G A A G G A A C A
C C C G G U C G A A A A C A C A C A G C U G C A G A A C G A A A A G C U G U A C
C U G U A C U A C C U G C A G A A C G G A A G A G A C A U G U A C G U C G A C C
A G G A A C U G G A C A U C A A C A G A C U G A G C G A C U A C G A C G U C G A
C C A C A U C G U C C C G C A G A G C U U C C U G A A G G A C G A C A G C A U C
G A C A A C A A G G U C C U G A C A A G A A G C G A C A A G A A C A G A G G A A
A G A G C G A C A A C G U C C C G A G C G A A G A A G U C G U C A A G A A G A U
G A A G A A C U A C U G G A G A C A G C U G C U G A A C G C A A A G C U G A U C
A C A C A G A G A A A G U U C G A C A A C C U G A C A A A G G C A G A G A G A G
G A G G A C U G A G C G A A C U G G A C A A G G C A G G A U U C A U C A A G A G
A C A G C U G G U C G A A A C A A G A C A G A U C A C A A A G C A C G U C G C A
C A G A U C C U G G A C A G C A G A A U G A A C A C A A A G U A C G A C G A A A
A C G A C A A G C U G A U C A G A G A A G U C A A G G U C A U C A C A C U G A A
G A G C A A G C U G G U C A G C G A C U U C A G A A A G G A C U U C C A G U U C
U A C A A G G U C A G A G A A A U C A A C A A C U A C C A C C A C G C A C A C G
A C G C A U A C C U G A A C G C A G U C G U C G G A A C A G C A C U G A U C A A
G A A G U A C C C G A A G C U G G A A A G C G A A U U C G U C U A C G G A G A C
U A C A A G G U C U A C G A C G U C A G A A A G A U G A U C G C A A A G A G C G
A A C A G G A A A U C G G A A A G G C A A C A G C A A A G U A C U U C U U C U A
C A G C A A C A U C A U G A A C U U C U U C A A G A C A G A A A U C A C A C U G
G C A A A C G G A G A A A U C A G A A A G A G A C C G C U G A U C G A A A C A A

10

20

30

40

50

A C G G A G A A A C A G G A G A A A U C G U C U G G G A C A A G G G A A G A G A
 C U U C G C A A C A G U C A G A A A G G U C C U G A G C A U G C C G C A G G U C
 A A C A U C G U C A A G A A G A C A G A A G U C C A G A C A G G A G G A U U C A
 G C A A G G A A A G C A U C C U G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C U
 G A U C G C A A G A A A G A A G G A C U G G G A C C C G A A G A A G U A C G G A
 G G A U U C G A C A G C C C G A C A G U C G C A U A C A G C G U C C U G G U C G
 U C G C A A A G G U C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C U G A A G A G
 C G U C A A G G A A C U G C U G G G A A U C A C A A U C A U G G A A A G A A G C
 A G C U U C G A A A A G A A C C C G A U C G A C U U C C U G G A A G C A A A G G
 G A U A C A A G G A A G U C A A G A A G G A C C U G A U C A U C A A G C U G C C
 G A A G U A C A G C C U G U U C G A A C U G G A A A A C G G A A G A A A G A G A
 A U G C U G G C A A G C G C A G G A G A A C U G C A G A A G G G A A A C G A A C
 U G G C A C U G C C G A G C A A G U A C G U C A A C U U C C U G U A C C U G G C
 A A G C C A C U A C G A A A A G C U G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C
 G A A C A G A A G C A G C U G U U C G U C G A A C A G C A C A A G C A C U A C C
 U G G A C G A A A U C A U C G A A C A G A U C A G C G A A U U C A G C A A G A G
 A G U C A U C C U G G C A G A C G C A A A C C U G G A C A A G G U C C U G A G C
 G C A U A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A U C A G A G A A C A G G
 C A G A A A A C A U C A U C C A C C U G U U C A C A C U G A C A A A C C U G G G
 A G C A C C G G C A G C A U U C A A G U A C U U C G A C A C A A C A A U C G A C
 A G A A A G A G A U A C A C A A G C A C A A A G G A A G U C C U G G A C G C A A
 C A C U G A U C C A C C A G A G C A U C A C A G G A C U G U A C G A A A C A A G
 A A U C G A C C U G A G C C A G C U G G G A G G A G A C U A G

10

20

2 1 7

表3に列挙される最小ウリジンコドンを使用した、配列番号16をコードするCase 9 ニッカーゼコード配列（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G C A A U C G G A A C A
 A A C A G C G U C G G A U G G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A A G G
 U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G G A A A C A C A G A C A G
 A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G U U C
 G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A G A A
 C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A U C U G
 C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G G U C
 G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C U G G
 U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A U C U U C G G
 A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C C C G
 A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A C A G
 A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C A C A
 C A U G A U C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A G A C
 C U G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A U C C
 A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U U C G A A G A A A C C C
 G A U C A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G A G C
 G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A U C G
 C A C A G C U G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G A A A
 C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C A A G
 A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C U G A
 G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U G G C
 A C A G A U C G G A G A C C A G U A C G C A G A C C U G U U C C U G G C A G C A
 A A G A A C C U G A G C G A C G C A A U C C U G C U G A G C G A C A U C C U G A

30

40

50

GAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGGCACCGCUGAGCGCAAG
CAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACA
CUGCUGAAGGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGU
ACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGC
AGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC
AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAACAG
AAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAG
AAAGCAGAGAAACAUUCGACAAACGGAAAGCAUCCCGCACCCAG
AUCCACCUGGGAGAAACUGCACGCAAUCCUGAGAAAGACAGG
AAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU
CGAAAAGAUAUCCUGACAUAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGA
CCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAUAACACCUGGAAACUUCGAAGA
AGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA
AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCCUGCCGAACGAAAAGG
UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAUAUACUUCACAGU
CUACAACGAACUGACAAGAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGA
AUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAAGAGG
CAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUACAC
AGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUUCGAA
UGC UUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAU
UCAACGCAAGCCUGGGAACAUAACCACGACCUGCUGAAGAU
CAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAA
GACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCG
AAGACAGAGAAAUGAUUCGAAGAAAGACUGAAGACAUAACGC
ACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGA
AGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGA
UCAACGGAAUUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAUAUCCU
GGACUUCUGAAGAGCGACGGGAUUCGCAAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUAUCAAGGAAG
ACAUCCAGAAAGGCACAGGUCAAGCGGACAGGGAGACAGCCU
GCACGAACACAUCGCAAAACCCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUUC
AAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU
CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACACAGACAACACAGAAGGGA
CAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUUCGAAGAAAG
GAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCC
GGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCCUG
UACUACCUGCAGAACGGAAAGAGACAUGUACGUCGACCAGG
AACUGGACAUAACAAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCA
CAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGAC
AACAAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGGAAGA
GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAAGUUCGUCAAGAAAGAUCAA
GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAAGCUGAUACACA
CAGAGAAAGUUCGACAACCCUGACAAGGCGAGAGAGAGGAG
GACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACA
GCUGGUUCGAAAACAAGACAGAUACAACAAGCACGUCGCACAG
AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAAACG
ACAAGCUGAUUCAGAGAAAGUCAAGGUCAUACACUGAAGAG
CAAGCUGGUUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUAC

10

20

30

40

50

AAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACACGACACGACG
CAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAA
GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUAC
AAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAAC
AGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAG
CAACAUCAUGAACUUCUUCUACAAGACAGAAAUCACACUGGCA
AACGGAGAAAUCAGAAAGAGAGACCGCUGAUCGAAACAACG
GAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUU
CGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCGAGGUCAAC
AUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCA
AGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU
CGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGA
UUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCG
CAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGU
CAAGGAACUGCUGGGAUUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGC
UUCGAAAAGAACC CGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAU
ACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAA
GUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGGAAGAAAGAGAAUG
CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAAGGGAAACGAACUGG
CACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUC CUGUACCUGGCAAG
CCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAA
CAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGG
ACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCAGCAAAGAGAGU
CAUCCUGGCAGACGCAAAC CUGGACAAGGUCCUGAGCGCA
UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAG
AAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGC
ACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAUCGACAGA
AAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACAC
UGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAU
CGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC

10

20

30

218

dCas9のアミノ酸配列 (NLSなし)

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRL EESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAIL SARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKNG
LFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLD
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF I KPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
REKIEKILTFRIPIYVVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERM TNFDKNLPNEKVLPKHSLLYE
YFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTI LDFLKS DGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ

40

50

G D S L H E H I A N L A G S P A I K K G I L Q T V K V V D E L V K V M G R H K P
E N I V I E M A R E N Q T T Q K G Q K N S R E R M K R I E E G I K E L G S Q I L
K E H P V E N T Q L Q N E K L Y L Y Y L Q N G R D M Y V D Q E L D I N R L S D Y
D V D A I V P Q S F L K D D S I D N K V L T R S D K N R G K S D N V P S E E V V
K K M K N Y W R Q L L N A K L I T Q R K F D N L T K A E R G G L S E L D K A G F
I K R Q L V E T R Q I T K H V A Q I L D S R M N T K Y D E N D K L I R E V K V I
T L K S K L V S D F R K D F Q F Y K V R E I N N Y H H A H D A Y L N A V V G T A
L I K K Y P K L E S E F V Y G D Y K V Y D V R K M I A K S E Q E I G K A T A K Y
F F Y S N I M N F F K T E I T L A N G E I R K R P L I E T N G E T G E I V W D K
G R D F A T V R K V L S M P Q V N I V K K T E V Q T G G F S K E S I L P K R N S
D K L I A R K K D W D P K K Y G G F D S P T V A Y S V L V V A K V E K G K S K K
L K S V K E L L G I T I M E R S S F E K N P I D F L E A K G Y K E V K K D L I I
K L P K Y S L F E L E N G R K R M L A S A G E L Q K G N E L A L P S K Y V N F L
Y L A S H Y E K L K G S P E D N E Q K Q L F V E Q H K H Y L D E I I E Q I S E F
S K R V I L A D A N L D K V L S A Y N K H R D K P I R E Q A E N I I H L F T L T
N L G A P A A F K Y F D T T I D R K R Y T S T K E V L D A T L I H Q S I T G L Y
E T R I D L S Q L G G D

219

開始コドンおよび終止コドンを有する、表3に列挙される最小ウリジンコドンを使用
した、配列番号19をコードするdC a s 9 mRNA ORF

A U G G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G C A A U C G G A
A C A A A C A G C G U C G G A U G G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A
A G G U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G G A A A C A C A G A
C A G A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G
U U C G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A
G A A C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A U
C U G C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G
G U C G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C
U G G U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A U C U U
C G G A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C
C C G A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A
C A G A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C
A C A C A U G A U C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A
G A C C U G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A
U C C A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U U C G A A G A A A A
C C C G A U C A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G
A G C G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A
U C G C A C A G C U G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G
A A A C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C
A A G A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C
U G A G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U
G G C A C A G A U C G G A G A C C A G U A C G C A G A C C U G U U C C U G G C A
G C A A A G A A C C U G A G C G A C G C A A U C C U G C U G A G C G A C A U C C
U G A G A G U C A A C A C A G A A A U C A C A A A G G C A C C G C U G A G C G C
A A G C A U G A U C A A G A G A U A C G A C G A A C A C C A C C A G G A C C U G
A C A C U G C U G A A G G C A C U G G U C A G A C A G C A G C U G C C G G A A A
A G U A C A A G G A A A U C U U C U U C G A C C A G A G C A A G A A C G G A U A
C G C A G G A U A C A U C G A C G G A G G A G C A A G C C A G G A A G A A U U C
U A C A A G U U C A U C A A G C C G A U C C U G G A A A A G A U G G A C G G A A
C A G A A G A A C U G C U G G U C A A G C U G A A C A G A G A A G A C C U G C U

10

20

30

40

50

G A G A A A G C A G A G A A C A U U C G A C A A C G G A A G C A U C C C G C A C
C A G A U C C A C C U G G G A G A A C U G C A C G C A A U C C U G A G A A G A C
A G G A A G A C U U C U A C C C G U U C C U G A A G G A C A A C A G A G A A A A
G A U C G A A A A G A U C C U G A C A U U C A G A A U C C C G U A C U A C G U C
G G A C C G C U G G C A A G A G G A A A C A G C A G A U U C G C A U G G A U G A
C A A G A A A G A G C G A A G A A A C A A U C A C A C C G U G G A A C U U C G A
A G A A G U C G U C G A C A A G G G A G C A A G C G C A C A G A G C U U C A U C
G A A A G A A U G A C A A A C U U C G A C A A G A A C C U G C C G A A C G A A A
A G G U C C U G C C G A A G C A C A G C C U G C U G U A C G A A U A C U U C A C
A G U C U A C A A C G A A C U G A C A A A G G U C A A G U A C G U C A C A G A A
G G A A U G A G A A A G C C G G C A U U C C U G A G C G G A G A A C A G A A G A
A G G C A A U C G U C G A C C U G C U G U U C A A G A C A A A C A G A A A G G U
C A C A G U C A A G C A G C U G A A G G A A G A C U A C U U C A A G A A G A U C
G A A U G C U U C G A C A G C G U C G A A A U C A G C G G A G U C G A A G A C A
G A U U C A A C G C A A G C C U G G G A A C A U A C C A C G A C C U G C U G A A
G A U C A U C A A G G A C A A G G A C U U C C U G G A C A A C G A A G A A A A C
G A A G A C A U C C U G G A A G A C A U C G U C C U G A C A C U G A C A C U G U
U C G A A G A C A G A G A A A U G A U C G A A G A A A G A C U G A A G A C A U A
C G C A C A C C U G U U C G A C G A C A A G G U C A U G A A G C A G C U G A A G
A G A A G A A G A U A C A C A G G A U G G G G A A G A C U G A G C A G A A A G C
U G A U C A A C G G A A U C A G A G A C A A G C A G A G C G G A A A G A C A A U
C C U G G A C U U C C U G A A G A G C G A C G G A U U C G C A A A C A G A A A C
U U C A U G C A G C U G A U C C A C G A C G A C A G C C U G A C A U U C A A G G
A A G A C A U C C A G A A G G C A C A G G U C A G C G G A C A G G G A G A C A G
C C U G C A C G A A C A C A U C G C A A A C C U G G C A G G A A G C C C G G C A
A U C A A G A A G G G A A U C C U G C A G A C A G U C A A G G U C G U C G A C G
A A C U G G U C A A G G U C A U G G G A A G A C A C A A G C C G G A A A A C A U
C G U C A U C G A A A U G G C A A G A G A A A A C C A G A C A A C A C A G A A G
G G A C A G A A G A A C A G C A G A G A A A G A A U G A A G A G A A U C G A A G
A A G G A A U C A A G G A A C U G G G A A G C C A G A U C C U G A A G G A A C A
C C C G G U C G A A A A C A C A C A G C U G C A G A A C G A A A A G C U G U A C
C U G U A C U A C C U G C A G A A C G G A A G A G A C A U G U A C G U C G A C C
A G G A A C U G G A C A U C A A C A G A C U G A G C G A C U A C G A C G U C G A
C G C A A U C G U C C C G C A G A G C U U C C U G A A G G A C G A C A G C A U C
G A C A A C A A G G U C C U G A C A A G A A G C G A C A A G A A C A G A G G A A
A G A G C G A C A A C G U C C C G A G C G A A G A A G U C G U C A A G A A G A U
G A A G A A C U A C U G G A G A C A G C U G C U G A A C G C A A A G C U G A U C
A C A C A G A G A A A G U U C G A C A A C C U G A C A A A G G C A G A G A G A G
G A G G A C U G A G C G A A C U G G A C A A G G C A G G A U U C A U C A A G A G
A C A G C U G G U C G A A A C A A G A C A G A U C A C A A A G C A C G U C G C A
C A G A U C C U G G A C A G C A G A A U G A A C A C A A A G U A C G A C G A A A
A C G A C A A G C U G A U C A G A G A A G U C A A G G U C A U C A C A C U G A A
G A G C A A G C U G G U C A G C G A C U U C A G A A A G G A C U U C C A G U U C
U A C A A G G U C A G A G A A A U C A A C A A C U A C C A C C A C G C A C A C G
A C G C A U A C C U G A A C G C A G U C G U C G G A A C A G C A C U G A U C A A
G A A G U A C C C G A A G C U G G A A A G C G A A U U C G U C U A C G G A G A C
U A C A A G G U C U A C G A C G U C A G A A A G A U G A U C G C A A A G A G C G
A A C A G G A A A U C G G A A A G G C A A C A G C A A A G U A C U U C U U C U A
C A G C A A C A U C A U G A A C U U C U U C A A G A C A G A A A U C A C A C U G
G C A A A C G G A G A A A U C A G A A A G A G A C C G C U G A U C G A A A C A A

10

20

30

40

50

A C G G A G A A A C A G G A G A A A U C G U C U G G G A C A A G G G A A G A G A
 C U U C G C A A C A G U C A G A A A G G U C C U G A G C A U G C C G C A G G U C
 A A C A U C G U C A A G A A G A C A G A A G U C C A G A C A G G A G G A U U C A
 G C A A G G A A A G C A U C C U G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C U
 G A U C G C A A G A A A G A A G G A C U G G G A C C C G A A G A A G U A C G G A
 G G A U U C G A C A G C C C G A C A G U C G C A U A C A G C G U C C U G G U C G
 U C G C A A A G G U C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C U G A A G A G
 C G U C A A G G A A C U G C U G G G A A U C A C A A U C A U G G A A A G A A G C
 A G C U U C G A A A A G A A C C C G A U C G A C U U C C U G G A A G C A A A G G
 G A U A C A A G G A A G U C A A G A A G G A C C U G A U C A U C A A G C U G C C
 G A A G U A C A G C C U G U U C G A A C U G G A A A A C G G A A G A A A G A G A
 A U G C U G G C A A G C G C A G G A G A A C U G C A G A A G G G A A A C G A A C
 U G G C A C U G C C G A G C A A G U A C G U C A A C U U C C U G U A C C U G G C
 A A G C C A C U A C G A A A A G C U G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C
 G A A C A G A A G C A G C U G U U C G U C G A A C A G C A C A A G C A C U A C C
 U G G A C G A A A U C A U C G A A C A G A U C A G C G A A U U C A G C A A G A G
 A G U C A U C C U G G C A G A C G C A A A C C U G G A C A A G G U C C U G A G C
 G C A U A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A U C A G A G A A C A G G
 C A G A A A A C A U C A U C C A C C U G U U C A C A C U G A C A A A C C U G G G
 A G C A C C G G C A G C A U U C A A G U A C U U C G A C A C A A C A A U C G A C
 A G A A A G A G A U A C A C A A G C A C A A A G G A A G U C C U G G A C G C A A
 C A C U G A U C C A C C A G A G C A U C A C A G G A C U G U A C G A A A C A A G
 A A U C G A C C U G A G C C A G C U G G G A G G A G A C U A G

2 2 0

表3に列挙されるような最小ウリジンコドンを使用した、配列番号19をコードするd C a s 9ニッカーゼコード配列（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G C A A U C G G A A C A
 A A C A G C G U C G G A U G G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A A G G
 U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G G A A A C A C A G A C A G
 A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G U U C
 G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A G A A
 C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A U C U G
 C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G G U C
 G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C U G G
 U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A U C U U C G G
 A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C C C G
 A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A C A G
 A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C A C A
 C A U G A U C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A G A C
 C U G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A U C C
 A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U U C G A A G A A A A C C C
 G A U C A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G A G C
 G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A U C G
 C A C A G C U G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G A A A
 C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C A A G
 A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C U G A
 G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U G G C
 A C A G A U C G G A G A C C A G U A C G C A G A C C U G U U C C U G G C A G C A
 A A G A A C C U G A G C G A C G C A A U C C U G C U G A G C G A C A U C C U G A

10

20

30

40

50

GAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGGCACCGCUGAGCGCAAG
CAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACA
CUGCUGAAGGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGU
ACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGC
AGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC
AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAACAG
AAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAG
AAAGCAGAGAAACAUUCGACAAACGGAAAGCAUCCCGCACACAG
AUCCACCUGGGAGAAACUGCACGCAAUCCUGAGAAAGACAGG
AAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU
CGAAAAGAUCCUGACAUAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGA
CCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAUAACACCUGGAAACUUCGAAGA
AGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA
AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCCUGCCGAACGAAAAGG
UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAUAUCUUCACAGU
CUACAACGAACUGACAAGAGGUCAAGUACGUCACAGAAAGGA
AUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAAGAGG
CAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUACAC
AGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAAGAUUCGAA
UGCUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAU
UCAACGCAAGCCUGGGAACAUAACCACGACCUGCUGAAGAU
CAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAA
GACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCG
AAGACAGAGAAAUGAUUCGAAGAAAGACUGAAGACAUAACGC
ACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGA
AGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGA
UCAACGGAAUUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAUAUCU
GGACUUCUGAAGAGCGACGGGAUUCGCAAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUAUCAAGGAAG
ACAUCCAGAAAGGCACAGGUCAAGCGGACAGGGAGACAGCCU
GCACGAACACAUCGCAAAACCCUGGCAGGAAGCCCGGCAUUC
AAGAAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU
CAUCGAAAUGGCAAGAGAAACACAGACAACACAGAAAGGGA
CAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUUCGAAGAAAG
GAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCC
GGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUUG
UACUACCUGCAGAACGGAAAGAGACAUGUACGUCGACCAGG
AACUGGACAUAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACGC
AAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGAC
AACAAAGGUCCUGACAAGAAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAAGUUCGUCAAGAAAGAUCAA
GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAAGCUGAUACACA
CAGAGAAAGUUCGACAACCCUGACAAGGAGAGAGAGGAG
GACUGAGCGAACUGGACAAGGACAGGAUUCAUCAAGAGACA
GCUGGUUCGAAAACAAGACAGAUACAAAGCACGUCGCACAG
AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAAACG
ACAAGCUGAUUCAGAGAAAGUCAAGGUCAUACACUGAAGAG
CAAGCUGGUUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUAC

10

20

30

40

50

AAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACACGACACGACG
CAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAA
GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUAC
AAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAAC
AGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAG
CAACAUCAUGAACUUCUUCACAGACAGAAAUCACACUGGCA
AACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAACG
GAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUU
CGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCGAGGUCAAC
AUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCA
AGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU
CGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGA
UUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCG
CAAAGGUCGAAAAGGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGU
CAAGGAACUGCUGGGAAUCACAUAUCAUGGAAAGAAGCAGC
UUCGAAAAGAACC CGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGGAU
ACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAA
GUACAGCCUGUUCGAACUGGGAACCGGAAGAAAGAGAAUG
CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGGAAACGAACUGG
CACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAG
CCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAA
CAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGG
ACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCAGCAAGAGAGU
CAUCCUGGCAGACGCAAACUGGACAAGGUCCUGAGCGCA
UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAG
AAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGC
ACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAUCGACAGA
AAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACAC
UGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAU
CGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC

10

20

30

2 2 1

2つの核局在化シグナルをC末端アミノ酸として有するCas9のアミノ酸配列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFV L G
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFS NEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAIL SARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKN G
LFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLD
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF I KPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYE
YFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTI LDFLKS DGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ

40

50

G D S L H E H I A N L A G S P A I K K G I L Q T V K V V D E L V K V M G R H K P
E N I V I E M A R E N Q T T Q K G Q K N S R E R M K R I E E G I K E L G S Q I L
K E H P V E N T Q L Q N E K L Y L Y Y L Q N G R D M Y V D Q E L D I N R L S D Y
D V D H I V P Q S F L K D D S I D N K V L T R S D K N R G K S D N V P S E E V V
K K M K N Y W R Q L L N A K L I T Q R K F D N L T K A E R G G L S E L D K A G F
I K R Q L V E T R Q I T K H V A Q I L D S R M N T K Y D E N D K L I R E V K V I
T L K S K L V S D F R K D F Q F Y K V R E I N N Y H H A H D A Y L N A V V G T A
L I K K Y P K L E S E F V Y G D Y K V Y D V R K M I A K S E Q E I G K A T A K Y
F F Y S N I M N F F K T E I T L A N G E I R K R P L I E T N G E T G E I V W D K
G R D F A T V R K V L S M P Q V N I V K K T E V Q T G G F S K E S I L P K R N S
D K L I A R K K D W D P K K Y G G F D S P T V A Y S V L V V A K V E K G K S K K
L K S V K E L L G I T I M E R S S F E K N P I D F L E A K G Y K E V K K D L I I
K L P K Y S L F E L E N G R K R M L A S A G E L Q K G N E L A L P S K Y V N F L
Y L A S H Y E K L K G S P E D N E Q K Q L F V E Q H K H Y L D E I I E Q I S E F
S K R V I L A D A N L D K V L S A Y N K H R D K P I R E Q A E N I I H L F T L T
N L G A P A A F K Y F D T T I D R K R Y T S T K E V L D A T L I H Q S I T G L Y
E T R I D L S Q L G G D G S G S P K K K R K V D G S P K K K R K V D S G

2 2 2

開始コドンおよび終止コドンを有する、表3に列挙される最小ウリジンコドンを使用
した、配列番号22をコードするCas9 mRNA ORF

A U G G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G A C A U C G G A
A C A A A C A G C G U C G G A U G G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A
A G G U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G G A A A C A C A G A
C A G A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G
U U C G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A
G A A C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A U
C U G C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G
G U C G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C
U G G U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A U C U U
C G G A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C
C C G A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A
C A G A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C
A C A C A U G A U C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A
G A C C U G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A
U C C A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U U C G A A G A A A A
C C C G A U C A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G
A G C G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A
U C G C A C A G C U G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G
A A A C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C
A A G A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C
U G A G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U
G G C A C A G A U C G G A G A C C A G U A C G C A G A C C U G U U C C U G G C A
G C A A A G A A C C U G A G C G A C G C A A U C C U G C U G A G C G A C A U C C
U G A G A G U C A A C A C A G A A A U C A C A A A G G C A C C G C U G A G C G C
A A G C A U G A U C A A G A G A U A C G A C G A A C A C C A C C A G G A C C U G
A C A C U G C U G A A G G C A C U G G U C A G A C A G C A G C U G C C G G A A A
A G U A C A A G G A A A U C U U C U U C G A C C A G A G C A A G A A C G G A U A
C G C A G G A U A C A U C G A C G G A G G A G C A A G C C A G G A A G A A U U C
U A C A A G U U C A U C A A G C C G A U C C U G G A A A A G A U G G A C G G A A
C A G A A G A A C U G C U G G U C A A G C U G A A C A G A G A A G A C C U G C U

10

20

30

40

50

G A G A A A G C A G A G A A C A U U C G A C A A C G G A A G C A U C C C G C A C
C A G A U C C A C C U G G G A G A A C U G C A C G C A A U C C U G A G A A G A C
A G G A A G A C U U C U A C C C G U U C C U G A A G G A C A A C A G A G A A A A
G A U C G A A A A G A U C C U G A C A U U C A G A A U C C C G U A C U A C G U C
G G A C C G C U G G C A A G A G G A A A C A G C A G A U U C G C A U G G A U G A
C A A G A A A G A G C G A A G A A A C A A U C A C A C C G U G G A A C U U C G A
A G A A G U C G U C G A C A A G G G A G C A A G C G C A C A G A G C U U C A U C
G A A A G A A U G A C A A A C U U C G A C A A G A A C C U G C C G A A C G A A A
A G G U C C U G C C G A A G C A C A G C C U G C U G U A C G A A U A C U U C A C
A G U C U A C A A C G A A C U G A C A A A G G U C A A G U A C G U C A C A G A A
G G A A U G A G A A A G C C G G C A U U C C U G A G C G G A G A A C A G A A G A
A G G C A A U C G U C G A C C U G C U G U U C A A G A C A A A C A G A A A G G U
C A C A G U C A A G C A G C U G A A G G A A G A C U A C U U C A A G A A G A U C
G A A U G C U U C G A C A G C G U C G A A A U C A G C G G A G U C G A A G A C A
G A U U C A A C G C A A G C C U G G G A A C A U A C C A C G A C C U G C U G A A
G A U C A U C A A G G A C A A G G A C U U C C U G G A C A A C G A A G A A A A C
G A A G A C A U C C U G G A A G A C A U C G U C C U G A C A C U G A C A C U G U
U C G A A G A C A G A G A A A U G A U C G A A G A A A G A C U G A A G A C A U A
C G C A C A C C U G U U C G A C G A C A A G G U C A U G A A G C A G C U G A A G
A G A A G A A G A U A C A C A G G A U G G G G A A G A C U G A G C A G A A A G C
U G A U C A A C G G A A U C A G A G A C A A G C A G A G C G G A A A G A C A A U
C C U G G A C U U C C U G A A G A G C G A C G G A U U C G C A A A C A G A A A C
U U C A U G C A G C U G A U C C A C G A C G A C A G C C U G A C A U U C A A G G
A A G A C A U C C A G A A G G C A C A G G U C A G C G G A C A G G G A G A C A G
C C U G C A C G A A C A C A U C G C A A A C C U G G C A G G A A G C C C G G C A
A U C A A G A A G G G A A U C C U G C A G A C A G U C A A G G U C G U C G A C G
A A C U G G U C A A G G U C A U G G G A A G A C A C A A G C C G G A A A A C A U
C G U C A U C G A A A U G G C A A G A G A A A A C C A G A C A A C A C A G A A G
G G A C A G A A G A A C A G C A G A G A A A G A A U G A A G A G A A U C G A A G
A A G G A A U C A A G G A A C U G G G A A G C C A G A U C C U G A A G G A A C A
C C C G G U C G A A A A C A C A C A G C U G C A G A A C G A A A A G C U G U A C
C U G U A C U A C C U G C A G A A C G G A A G A G A C A U G U A C G U C G A C C
A G G A A C U G G A C A U C A A C A G A C U G A G C G A C U A C G A C G U C G A
C C A C A U C G U C C C G C A G A G C U U C C U G A A G G A C G A C A G C A U C
G A C A A C A A G G U C C U G A C A A G A A G C G A C A A G A A C A G A G G A A
A G A G C G A C A A C G U C C C G A G C G A A G A A G U C G U C A A G A A G A U
G A A G A A C U A C U G G A G A C A G C U G C U G A A C G C A A A G C U G A U C
A C A C A G A G A A A G U U C G A C A A C C U G A C A A A G G C A G A G A G A G
G A G G A C U G A G C G A A C U G G A C A A G G C A G G A U U C A U C A A G A G
A C A G C U G G U C G A A A C A A G A C A G A U C A C A A A G C A C G U C G C A
C A G A U C C U G G A C A G C A G A A U G A A C A C A A A G U A C G A C G A A A
A C G A C A A G C U G A U C A G A G A A G U C A A G G U C A U C A C A C U G A A
G A G C A A G C U G G U C A G C G A C U U C A G A A A G G A C U U C C A G U U C
U A C A A G G U C A G A G A A A U C A A C A A C U A C C A C C A C G C A C A C G
A C G C A U A C C U G A A C G C A G U C G U C G G A A C A G C A C U G A U C A A
G A A G U A C C C G A A G C U G G A A A G C G A A U U C G U C U A C G G A G A C
U A C A A G G U C U A C G A C G U C A G A A A G A U G A U C G C A A A G A G C G
A A C A G G A A A U C G G A A A G G C A A C A G C A A A G U A C U U C U U C U A
C A G C A A C A U C A U G A A C U U C U U C A A G A C A G A A A U C A C A C U G
G C A A A C G G A G A A A U C A G A A A G A G A C C G C U G A U C G A A A C A A

10

20

30

40

50

A C G G A G A A A C A G G A G A A A U C G U C U G G G A C A A G G G A A G A G A
 C U U C G C A A C A G U C A G A A A G G U C C U G A G C A U G C C G C A G G U C
 A A C A U C G U C A A G A A G A C A G A A G U C C A G A C A G G A G G A U U C A
 G C A A G G A A A G C A U C C U G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C U
 G A U C G C A A G A A A G A A G G A C U G G G A C C C G A A G A A G U A C G G A
 G G A U U C G A C A G C C C G A C A G U C G C A U A C A G C G U C C U G G U C G
 U C G C A A A G G U C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C U G A A G A G
 C G U C A A G G A A C U G C U G G G A A U C A C A A U C A U G G A A A G A A G C
 A G C U U C G A A A A G A A C C C G A U C G A C U U C C U G G A A G C A A A G G
 G A U A C A A G G A A G U C A A G A A G G A C C U G A U C A U C A A G C U G C C
 G A A G U A C A G C C U G U U C G A A C U G G A A A A C G G A A G A A A G A G A
 A U G C U G G C A A G C G C A G G A G A A C U G C A G A A G G G A A A C G A A C
 U G G C A C U G C C G A G C A A G U A C G U C A A C U U C C U G U A C C U G G C
 A A G C C A C U A C G A A A A G C U G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C
 G A A C A G A A G C A G C U G U U C G U C G A A C A G C A C A A G C A C U A C C
 U G G A C G A A A U C A U C G A A C A G A U C A G C G A A U U C A G C A A G A G
 A G U C A U C C U G G C A G A C G C A A A C C U G G A C A A G G U C C U G A G C
 G C A U A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A U C A G A G A A C A G G
 C A G A A A A C A U C A U C C A C C U G U U C A C A C U G A C A A A C C U G G G
 A G C A C C G G C A G C A U U C A A G U A C U U C G A C A C A A C A A U C G A C
 A G A A A G A G A U A C A C A A G C A C A A A G G A A G U C C U G G A C G C A A
 C A C U G A U C C A C C A G A G C A U C A C A G G A C U G U A C G A A A C A A G
 A A U C G A C C U G A G C C A G C U G G G A G G A G A C G G A A G C G G A A G C
 C C G A A G A A G A A G A G A A A G G U C G A C G G A A G C C C G A A G A A G A
 A G A G A A A G G U C G A C A G C G G A U A G

2 2 3

表3に列挙されるような最小ウリジンコドンを使用した、配列番号23をコードする
 C a s 9 ニッカーゼコード配列（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード
 配列に含めるのに好適である）

G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G A C A U C G G A A C A
 A A C A G C G U C G G A U G G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A A G G
 U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G G A A A C A C A G A C A G
 A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G U U C
 G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A G A A
 C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A U C U G
 C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G G U C
 G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C U G G
 U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A U C U U C G G
 A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C C C G
 A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A C A G
 A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C A C A
 C A U G A U C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A G A C
 C U G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A U C C
 A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U U C G A A G A A A A C C C
 G A U C A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G A G C
 G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A U C G
 C A C A G C U G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G A A A
 C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C A A G
 A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C U G A
 G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U G G C

10

20

30

40

50

ACAGAUUCGGAGACCAGUACGACAGACCUGUUC CUGGCAGCA
AAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGA
GAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAAG
CAUGAUCAAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACA
CUGCUGAAGGCA CUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGU
ACAAGGGA AAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGC
AGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC
AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAACAG
AAGAACUGCUGGUC AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAG
AAAGCAGAGAAACA UUCGACAACGGAAAGCAUCCCGCACCCAG
AUCCACCUGGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAAGACAGG
AAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU
CGAAAAGAUCCUGACA UUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGA
CCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACA AUCAACCCGUGGAACUUCGAAGA
AGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA
AGAAUGACAAAACUUCGACAAGAACCCUGCCGAACGAAAAGG
UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGA AUACUUCACAGU
CUACAACGAACUGACA AAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGA
AUGAGAAAGCCGGCAUUC CUGAGCGGAGAACAGAAAGAGG
CAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACA AACAGAAAGGUCA C
AGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAAGAU CGAA
UGC UUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAU
UCAACGCAAGCCUGGGAAACAUAACCAACGACCUGCUGAAGAU
CAUCAAGGACAAGGACUUC CUGGACAACGAAGAAAACGAA
GACAUCCUGGAAGACAUCGUC CUGACACUGACACUGUUCG
AAGACAGAGAAAUGAU CGAAGAAAGACUGAAGACAUAACGC
ACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAA
AGAAAGAUACACAGGAUGGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGA
UCAACGGAAUUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACA AUCCU
GGACUUC CUGAAGAGCGACGGAAUUCGCAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACA UUCAAGGAAG
ACAUCCAGAAAGGCACAGGUCAAGCGGACAGGGAGACAGCCU
GCACGAACACAUCGCAAAC CUGGCAAGGAAGCCCGGCAAU C
AAGAAGGGGA AUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU
CAUCGAAAUGGCAAGAGAAAAC CAGACAACACAGAAAGGGA
CAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAU CGAAGAAAG
GAAUCAAGGAACUGGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCC
GGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCCUG
UACUACCUGCAGAACGGAAAGAGACAUGUACGUCGACCCAGG
AACUGGACAUAACAAGACUGAGCGACUAACGACGUCGACCA
CAUCGUCCCGCAGAGCUUC CUGAAGGACGACAGCAUCGAC
AACAAAGGUCCUGACAAGAAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAAGUCGUCAAGAAAGAU GAA
GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUACA
CAGAGAAAGUUCGACAAC CUGACA AAAGGCAGAGAGAGGAG
GACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACA
GCUGGUCGAAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGCACAG
AUCCUGGACAGCAGAAUGAACAACAAGUACGACGAAAACG

10

20

30

40

50

A C A A G C U G A U C A G A G A A G U C A A G G U C A U C A C A C U G A A G A G
 C A A G C U G G U C A G C G A C U U C A G A A A G G A C U U C C A G U U C U A C
 A A G G U C A G A G A A A U C A A C A A C U A C C A C C A C G C A C A C G A C G
 C A U A C C U G A A C G C A G U C G U C G G A A C A G C A C U G A U C A A G A A
 G U A C C C G A A G C U G G A A A G C G A A U U C G U C U A C G G A G A C U A C
 A A G G U C U A C G A C G U C A G A A A G A U G A U C G C A A A G A G C G A A C
 A G G A A A U C G G A A A G G C A A C A G C A A A G U A C U U C U U C U A C A G
 C A A C A U C A U G A A C U U C U U C A A G A C A G A A A U C A C A C U G G C A
 A A C G G A G A A A U C A G A A A G A G A C C G C U G A U C G A A A C A A A C G
 G A G A A A C A G G A G A A A U C G U C U G G G A C A A G G G A A G A G A C U U
 C G C A A C A G U C A G A A A G G U C C U G A G C A U G C C G C A G G U C A A C
 A U C G U C A A G A A G A C A G A A G U C C A G A C A G G A G G A U U C A G C A
 A G G A A A G C A U C C U G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C U G A U
 C G C A A G A A A G A A G G A C U G G G A C C C G A A G A A G U A C G G A G G A
 U U C G A C A G C C C G A C A G U C G C A U A C A G C G U C C U G G U C G U C G
 C A A A G G U C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C U G A A G A G C G U
 C A A G G A A C U G C U G G G A A U C A C A A U C A U G G A A A G A A G C A G C
 U U C G A A A A G A A C C C G A U C G A C U U C C U G G A A G C A A A G G G A U
 A C A A G G A A G U C A A G A A G G A C C U G A U C A U C A A G C U G C C G A A
 G U A C A G C C U G U U C G A A C U G G A A A A C G G A A G A A A G A G A A U G
 C U G G C A A G C G C A G G A G A A C U G C A G A A G G G A A A C G A A C U G G
 C A C U G C C G A G C A A G U A C G U C A A C U U C C U G U A C C U G G C A A G
 C C A C U A C G A A A A G C U G A A G G G A A A G C C C G G A A G A C A A C G A A
 C A G A A G C A G C U G U U C G U C G A A C A G C A C A A G C A C U A C C U G G
 A C G A A A U C A U C G A A C A G A U C A G C G A A U U C A G C A A G A G A G U
 C A U C C U G G C A G A C G C A A A C C U G G A C A A G G U C C U G A G C G C A
 U A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A U C A G A G A A C A G G C A G
 A A A A C A U C A U C C A C C U G U U C A C A C U G A C A A A C C U G G G A G C
 A C C G G C A G C A U U C A A G U A C U U C G A C A C A A C A A U C G A C A G A
 A A G A G A U A C A C A A G C A C A A A G G A A G U C C U G G A C G C A A C A C
 U G A U C C A C C A G A G C A U C A C A G G A C U G U A C G A A A C A A G A A U
 C G A C C U G A G C C A G C U G G G A G G A G A C G G A A G C G G A A G C C C G
 A A G A A G A A G A G A A A G G U C G A C G G A A G C C C G A A G A A G A A G A
 G A A A G G U C G A C A G C G G A

2 2 4

2つの核局在化シグナルをC末端アミノ酸として有するCas9ニッカーゼのアミノ酸配列

M D K K Y S I G L A I G T N S V G W A V I T D E Y K V P S K K F K V L G
 N T D R H S I K K N L I G A L L F D S G E T A E A T R L K R T A R R R Y T R R K
 N R I C Y L Q E I F S N E M A K V D D S F F H R L E E S F L V E E D K K H E R H
 P I F G N I V D E V A Y H E K Y P T I Y H L R K K L V D S T D K A D L R L I Y L
 A L A H M I K F R G H F L I E G D L N P D N S D V D K L F I Q L V Q T Y N Q L F
 E E N P I N A S G V D A K A I L S A R L S K S R R L E N L I A Q L P G E K K N G
 L F G N L I A L S L G L T P N F K S N F D L A E D A K L Q L S K D T Y D D D L D
 N L L A Q I G D Q Y A D L F L A A K N L S D A I L L S D I L R V N T E I T K A P
 L S A S M I K R Y D E H H Q D L T L L K A L V R Q Q L P E K Y K E I F F D Q S K
 N G Y A G Y I D G G A S Q E E F Y K F I K P I L E K M D G T E E L L V K L N R E
 D L L R K Q R T F D N G S I P H Q I H L G E L H A I L R R Q E D F Y P F L K D N
 R E K I E K I L T F R I P Y Y V G P L A R G N S R F A W M T R K S E E T I T P W
 N F E E V V D K G A S A Q S F I E R M T N F D K N L P N E K V L P K H S L L Y E

YFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
 RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFRNASLGTYHD
 LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERL
 KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
 KTIILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
 GDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKP
 ENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
 KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY
 DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTNRSDKNRGKSDNVPSEEVV
 KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGF
 IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
 TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
 LIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMKIAKSEQEIGKATAKY
 FFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
 GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
 DKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKK
 LKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLII
 KLPKYSLFEL ENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL
 YLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIIEQISEF
 SKRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLT
 NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLY
 ETRIDLSQLGGDGS GSPKKKRKV DGS PKKKRKV DSG

225

開始コドンおよび終止コドンを有する、表3に列挙される最小ウリジンコドンを使用した、配列番号25をコードするCas9ニッカーゼmRNA ORF

AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGGCAAUCGGA
 ACAAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACA
 AGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGA
 CAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG
 UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACUGAAGA
 GAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAU
 CUGCUAACUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAG
 GUCGACGACAGCUUCUUCACAGACUGGAAGAAAGCUUCC
 UGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUU
 CGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUAC
 CCGACAUAUCUACCAACUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCA
 CAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGC
 ACACAUGAUAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAAGGA
 GACCUGAACC CGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCA
 UCCAGCUGGUCCAGACAUAACAACAGCUGUUCGAAGAAAA
 CCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG
 AGCGCAAAGACUGAGCAAAGAGCAGAAAGACUGGAAAACUGA
 UCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGG
 AAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUC
 AAGAGCAAACUUCGACCUGGCAGAAAGACGCAAAGCUGCAGC
 UGAGCAAAGGACACAUAACGACGACGACCUGGACAACCUGCU
 GGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCUGGCA
 GCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUC
 UGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGC
 AAGCAUGAUAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUG

10

20

30

40

50

ACACUGCUGAAGGCCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAA
AGUACAAGGAAAUUCUUCUUCGACCCAGAGCAAGAACGGAUUA
CGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUC
UACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAA
CAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCU
GAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAAACGGAAGCAUCCCGCAC
CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGAC
AGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAA
GAUCGAAAAGAUCUGACAUAUCAGAAUCCCGUACUACGUC
GGACCCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAUAACACCCGUGGAACUUCGA
AGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUC
GAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAA
AGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUAUUCAC
AGUCUACAACGAACUGACAAGAGGUCAAGUACGUCACAGAA
GGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAAGA
AGGCAAUUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAACAGAAAGGU
CACAGUCAAGCAGCUGAAGGGAAGACUACUUCAGGAAGAUC
GAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUACAGCGGAGUCGAAGACA
GAUUCAACGCAAGCCUGGGAAACAUAACACGACCUGCUGAA
GAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAAC
GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGU
UCGAAGACAGAGAAAUUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUA
CGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAG
AGAAGAAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGC
UGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAUA
CCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAAC
UUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUAUCAAAG
AAGACAUCCAGAAAGGCACAGGUCAAGCGGACAGGGAGACAG
CCUGCACGAACACAUCGCAAAACCCUGGCAGGAAGCCCGGCA
AUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACG
AACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUA
CGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG
GGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUUGAAG
AAGGAUAUAAGGAACUGGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACA
CCCGGUUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUAC
CUGUACUACCUGCAGAACGGAAAGAGACAUGUACGUCGACC
AGGAACUGGACAUAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGA
CCACAUCGUCCCCGACAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUC
GACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGUCCCCGAGCGAAGAAAGUCGUCAAGAAAGAU
GAAGAAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUC
ACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAGGCAGAGAGAGAG
GAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAG
ACAGCUGGUUCGAAACAAGACAGAUACAAGGCACGUCGCA
CAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAA
ACGACAAGCUGAUCAAGAGAAAGUCAAGGUCAUACACUGAA
GAGCAAAGCUGGUCAAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUC
UACAAGGUCAGAGAAAUAACAACUACCAACCAACGACACG
ACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAAACAGCACUGAUCAA

10

20

30

40

50

GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGAC
 UACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAGAGAGCG
 AACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUA
 CAGCAAACAUCAUGAACUUCUUCAAAGACAGAAAUCACACUG
 GCAAACGGAGAGAAAUACAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAA
 ACGGAGAGAAACAGGAGAGAAAUUCGUCUGGGACAAGGGGAAGAGA
 CUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGC CGCAGGUC
 AACAUUCGUCAAGAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCA
 GCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCU
 GAUCGCAAGAAAGAAAGGACUGGGACCCGAAGAAAGUACGGA
 GGAUUCGACAGCCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUUCG
 UCGCAAAGGUUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAG
 CGUCAAGGAACUGCUGGGAAUACAAUCAUGGAAAGAAAGC
 AGCUUCGAAAAGAAACCCGAUCGACUUCUUGGAAAGCAAAGG
 GAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCC
 GAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAAGAAAGAGA
 AUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAAGGGAAACGAAC
 UGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUUGUACCUGGC
 AAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCCGGAAGACAAC
 GAACAGAAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACC
 UGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCAGCAAGAG
 AGUCAUCCUGGCAGACGCAAAACUUGGACAAGGUCCUGAGC
 GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAAACAGG
 CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAAACCUGGG
 AGCACCCGGCAGCAUUCAAAGUACUUCGACACAACAUAUCGAC
 AGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAA
 CACUGAUCCACCAGAGCAUACACAGGACUGUACGAAACAAG
 AAUCGACCUGAGCCAGCUGGGGAGGAGACGGAAAGCGGAAGC
 CCGAAGAAAGAAAGAGAAAGGUUCGACGGAAGCCCCGAAGAGA
 AGAGAAAGGUUCGACAGCGGAUAG

10

20

30

226

表3に列挙される最小ウリジンコドンを使用した、配列番号25をコードするCas9ニッカーゼコード配列（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUUCGGAAACA
 AACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGG
 UCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAG
 ACACAGCAUCAAGAAGAAACCUGAUUCGGAGCACUGCUGUUC
 GACAGCGGAGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACUGAAGAGAA
 CAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAAGAAACAGAAUUCUG
 CUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUUC
 GACGACAGCUUCUUCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGG
 UCGAAGAAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGG
 AAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCG
 ACAAUUCUACCACCUGAGAAAGAAAGCUGGUUCGACAGCACAG
 ACAAGGCAGACCUGAGACUGAUUCUACCUGGCACUGGCACA
 CAUGAUCAAAGUUCAGAGGACACUUCUUGAUCGAAGGAGAC
 CUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCC
 AGCUGGUCCAGACAUAACAACAGCUGUUCGAAGAAAACCC
 GAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAAGGCAAUCCUGAGC

40

50

G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A U C G
C A C A G C U G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G A A A
C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C A A G
A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C U G A
G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U G G C
A C A G A U C G G A G A C C A G U A C G C A G A C C U G U U C C U G G C A G C A
A A G A A C C U G A G C G A C G C A A U C C U G C U G A G C G A C A U C C U G A
G A G U C A A C A C A G A A A U C A C A A A G G C A C C G C U G A G C G C A A G
C A U G A U C A A G A G A U A C G A C G A A C A C C A C C A G G A C C U G A C A
C U G C U G A A A G G C A C U G G U C A G A C A G C A G C U G C C G G A A A A G U
A C A A G G A A A U C U U C U U C G A C C A G A G C A A G A A C G G A U A C G C
A G G A U A C A U C G A C G G A G G A G C A A G C C A G G A A G A A U U C U A C
A A G U U C A U C A A G C C G A U C C U G G A A A A G A U G G A C G G A A C A G
A A G A A C U G C U G G U C A A G C U G A A C A G A G A A G A C C U G C U G A G
A A A G C A G A G A A C A U U C G A C A A C G G A A G C A U C C C G C A C C A G
A U C C A C C U G G G A G A A C U G C A C G C A A U C C U G A G A A G A C A G G
A A G A C U U C U A C C C G U U C C U G A A G G A C A A C A G A G A A A A G A U
C G A A A A G A U C C U G A C A U U C A G A A U C C C G U A C U A C G U C G G A
C C G C U G G C A A G A G G A A A C A G C A G A U U C G C A U G G A U G A C A A
G A A A G A G C G A A G A A A C A A U C A C A C C G U G G A A C U U C G A A G A
A G U C G U C G A C A A G G G A G C A A G C G C A C A G A G C U U C A U C G A A
A G A A U G A C A A A C U U C G A C A A G A A C C U G C C G A A C G A A A A G G
U C C U G C C G A A G C A C A G C C U G C U G U A C G A A U A C U U C A C A G U
C U A C A A C G A A C U G A C A A A G G U C A A G U A C G U C A C A G A A G G A
A U G A G A A A G C C G G C A U U C C U G A G C G G A G A A C A G A A G A A G G
C A A U C G U C G A C C U G C U G U U C A A G A C A A A C A G A A A G G U C A C
A G U C A A G C A G C U G A A G G A A G A C U A C U U C A A G A A G A U C G A A
U G C U U C G A C A G C G U C G A A A U C A G C G G A G U C G A A G A C A G A U
U C A A C G C A A G C C U G G G A A C A U A C C A C G A C C U G C U G A A G A U
C A U C A A G G A C A A G G A C U U C C U G G A C A A C G A A G A A A A C G A A
G A C A U C C U G G A A G A C A U C G U C C U G A C A C U G A C A C U G U U C G
A A G A C A G A G A A A U G A U C G A A G A A A G A C U G A A G A C A U A C G C
A C A C C U G U U C G A C G A C A A G G U C A U G A A G C A G C U G A A G A G A
A G A A G A U A C A C A G G A U G G G G A A G A C U G A G C A G A A A G C U G A
U C A A C G G A A U C A G A G A C A A G C A G A G C G G A A A G A C A A U C C U
G G A C U U C C U G A A G A G C G A C G G A U U C G C A A A C A G A A A C U U C
A U G C A G C U G A U C C A C G A C G A C A G C C U G A C A U U C A A G G A A G
A C A U C C A G A A G G C A C A G G U C A G C G G A C A G G G A G A C A G C C U
G C A C G A A C A C A U C G C A A A C C U G G C A G G A A G C C C G G C A A U C
A A G A A G G G A A U C C U G C A G A C A G U C A A G G U C G U C G A C G A A C
U G G U C A A G G U C A U G G G A A G A C A C A A G C C G G A A A A C A U C G U
C A U C G A A A U G G C A A G A G A A A A C C A G A C A A C A C A G A A G G G A
C A G A A G A A C A G C A G A G A A A G A A U G A A G A G A A U C G A A G A A G
G A A U C A A G G A A C U G G G A A G C C A G A U C C U G A A G G A A C A C C C
G G U C G A A A A C A C A C A G C U G C A G A A C G A A A A G C U G U A C C U G
U A C U A C C U G C A G A A C G G A A G A G A C A U G U A C G U C G A C C A G G
A A C U G G A C A U C A A C A G A C U G A G C G A C U A C G A C G U C G A C C A
C A U C G U C C C G C A G A G C U U C C U G A A G G A C G A C A G C A U C G A C
A A C A A G G U C C U G A C A A G A A G C G A C A A G A A C A G A G G A A A G A
G C G A C A A C G U C C C G A G C G A A G A A G U C G U C A A G A A G A U G A A

10

20

30

40

50

GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACA
CAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAG
GACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACA
GCUGGUUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGCACAG
AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAAACG
ACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAG
CAAGCUGGUUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUAC
AAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACACGACACGACG
CAUACCUGAACGCGAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAA
GUACCCGGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUAC
AAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAAC
AGGAAAUUCGGAAAGGCACAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAG
CAACAUCAUGAACUUCUUCAAAGACAGAAAUCAACACUGGCA
AACGGAGAAAUCAAGAAAGAGACCUGCUGAUCGAAACAACG
GAGAAACAGGAGAAAUUCGUCUGGGACAAGGGGAAGAGACUU
CGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCGAGGUCAAC
AUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCA
AGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU
CGCAAGAAAGAAGGACUGGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGA
UUCGACAGCCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCG
CAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGU
CAAGGAACUGCUGGGAUUCACAUAUGGAAGAAGCAGC
UUCGAAAAGAACC CGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAU
ACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAA
GUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUG
CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGG
CACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAG
CCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCCGGAAGACAACGAA
CAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGG
ACGAAAUAUCAAGAACAGAUCAAGCGAAUUCAGCAAGAGAGU
CAUCCUGGCAGACGCAAACUGGACAAGGUCCUGAGCGCA
UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAG
AAAACAUAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGC
ACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAUAUCGACAGA
AAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACAC
UGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAU
CGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAAGCCCG
AAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCCGAAGAAGAA
GAAAGGUCGACAGCGGA

227

2つの核局在化シグナルをC末端アミノ酸として有するdCas9のアミノ酸配列

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFS NEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKNNG
LFGNLIALLSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDDL D
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK

NGYAGYIDGGASQEEFYKF I K P I L E K M D G T E E L L V K L N R E
 D L L R K Q R T F D N G S I P H Q I H L G E L H A I L R R Q E D F Y P F L K D N
 R E K I E K I L T F R I P Y Y V G P L A R G N S R F A W M T R K S E E T I T P W
 N F E E V V D K G A S A Q S F I E R M T N F D K N L P N E K V L P K H S L L Y E
 Y F T V Y N E L T K V K Y V T E G M R K P A F L S G E Q K K A I V D L L F K T N
 R K V T V K Q L K E D Y F K K I E C F D S V E I S G V E D R F N A S L G T Y H D
 L L K I I K D K D F L D N E E N E D I L E D I V L T L T L F E D R E M I E E R L
 K T Y A H L F D D K V M K Q L K R R R Y T G W G R L S R K L I N G I R D K Q S G
 K T I L D F L K S D G F A N R N F M Q L I H D D S L T F K E D I Q K A Q V S G Q
 G D S L H E H I A N L A G S P A I K K G I L Q T V K V V D E L V K V M G R H K P
 E N I V I E M A R E N Q T T Q K G Q K N S R E R M K R I E E G I K E L G S Q I L
 K E H P V E N T Q L Q N E K L Y L Y L Q N G R D M Y V D Q E L D I N R L S D Y
 D V D A I V P Q S F L K D D S I D N K V L T R S D K N R G K S D N V P S E E V V
 K K M K N Y W R Q L L N A K L I T Q R K F D N L T K A E R G G L S E L D K A G F
 I K R Q L V E T R Q I T K H V A Q I L D S R M N T K Y D E N D K L I R E V K V I
 T L K S K L V S D F R K D F Q F Y K V R E I N N Y H H A H D A Y L N A V V G T A
 L I K K Y P K L E S E F V Y G D Y K V Y D V R K M I A K S E Q E I G K A T A K Y
 F F Y S N I M N F F K T E I T L A N G E I R K R P L I E T N G E T G E I V W D K
 G R D F A T V R K V L S M P Q V N I V K K T E V Q T G G F S K E S I L P K R N S
 D K L I A R K K D W D P K K Y G G F D S P T V A Y S V L V V A K V E K G K S K K
 L K S V K E L L G I T I M E R S S F E K N P I D F L E A K G Y K E V K K D L I I
 K L P K Y S L F E L E N G R K R M L A S A G E L Q K G N E L A L P S K Y V N F L
 Y L A S H Y E K L K G S P E D N E Q K Q L F V E Q H K H Y L D E I I E Q I S E F
 S K R V I L A D A N L D K V L S A Y N K H R D K P I R E Q A E N I I H L F T L T
 N L G A P A A F K Y F D T T I D R K R Y T S T K E V L D A T L I H Q S I T G L Y
 E T R I D L S Q L G G D G S G S P K K K R K V D G S P K K K R K V D S G

2 2 8

開始コドンおよび終止コドンを有する、表3に列挙される最小ウリジンコドンを使用した、配列番号28をコードするdCas9 mRNA ORF

A U G G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G C A A U C G G A
 A C A A A C A G C G U C G G A U G G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A
 A G G U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G G A A A C A C A G A
 C A G A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G
 U U C G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A
 G A A C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A U
 C U G C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G
 G U C G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C
 U G G U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A U C U U
 C G G A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C
 C C G A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A
 C A G A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C
 A C A C A U G A U C A A G U U C A G A G G A C A C U U C C U G A U C G A A G G A
 G A C C U G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G U C G A C A A G C U G U U C A
 U C C A G C U G G U C C A G A C A U A C A A C C A G C U G U U C G A A G A A A A
 C C C G A U C A A C G C A A G C G G A G U C G A C G C A A A G G C A A U C C U G
 A G C G C A A G A C U G A G C A A G A G C A G A A G A C U G G A A A A C C U G A
 U C G C A C A G C U G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C U G U U C G G
 A A A C C U G A U C G C A C U G A G C C U G G G A C U G A C A C C G A A C U U C
 A A G A G C A A C U U C G A C C U G G C A G A A G A C G C A A A G C U G C A G C
 U G A G C A A G G A C A C A U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C U G C U

10

20

30

40

50

GGCACAGAUCCGGAGACCAGUACGACGACCCUGUUCUGGCA
GCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCC
UGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGC
AAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAAACACCACAGGACCUG
ACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAA
AGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAU
CGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUC
UACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAA
CAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCU
GAGAAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAAGCAUCCCGCAC
CAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGAC
AGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAA
GAUCGAAAAGAUCCUGACAUAUCAGAAUCCCGUACUACGUC
GGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAUAUCACACCGUGGAACUUCGA
AGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUC
GAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAA
AGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUAUCUAC
AGUCUACAACGAACUGACAAGAGGUCAAGUACGUCACAGAA
GGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAAGA
AGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGU
CACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAAGAU
GAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUACAGCGGAGUCGAAGACA
GAUUCAACGCAAGCCUGGGAAACAUAACACGACCUGCUGAA
GAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAAC
GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGU
UCGAAGACAGAGAAAUGAUUCGAAGAAAGACUGAAGACAUA
CGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAG
AGAAGAAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGC
UGAUCAACGGAAUACAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACA
CCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAAACAGAAAC
UUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUAUCAAGG
AAGACAUCCAGAAGGCACAGGUACAGCGGACAGGGAGACAG
CCUGCACGAACACAUCGCAAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA
AUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACG
AACUGGUCAAGGUCAUGGGAAAGACACAAGCCGGAAACA
CGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAAACCAGACAACACAGAA
GGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAU
AAGGAUAACAGGAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGAACA
CCCGGUUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUAC
CUGUACUACCUGCAGAACGGAAAGAGACAUGUACGUCGACC
AGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGA
CGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUC
GACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAAGUCGUCAAGAAAGAU
GAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUC
ACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAGGCAGAGAGAG
GAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAG
ACAGCUGGUUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGCA
CAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAGUACGACGAAA

10

20

30

40

50

A C G A C A A G C U G A U C A G A G A A G U C A A G G U C A U C A C A C U G A A
 G A G C A A G C U G G U C A G C G A C U U C A G A A A G G A C U U C C A G U U C
 U A C A A G G U C A G A G A A A U C A A C A A C U A C C A C C A C G C A C A C G
 A C G C A U A C C U G A A C G C A G U C G U C G G A A C A G C A C U G A U C A A
 G A A G U A C C C G A A G C U G G A A A G C G A A U U C G U C U A C G G A G A C
 U A C A A G G U C U A C G A C G U C A G A A A G A U G A U C G C A A A G A G C G
 A A C A G G A A A U C G G A A A G G C A A C A G C A A A G U A C U U C U U C U A
 C A G C A A C A U C A U G A A C U U C U U C A A G A C A G A A A U C A C A C U G
 G C A A A C G G A G A A A U C A G A A A G A G A C C G C U G A U C G A A A C A A
 A C G G A G A A A C A G G A G A A A U C G U C U G G G A C A A G G G A A G A G A
 C U U C G C A A C A G U C A G A A A G G U C C U G A G C A U G C C G C A G G U C
 A A C A U C G U C A A G A A G A C A G A A G U C C A G A C A G G A G G A U U C A
 G C A A G G A A A G C A U C C U G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C U
 G A U C G C A A G A A A G A A G G A C U G G G A C C C G A A G A A G U A C G G A
 G G A U U C G A C A G C C C G A C A G U C G C A U A C A G C G U C C U G G U C G
 U C G C A A A G G U C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C U G A A G A G
 C G U C A A G G A A C U G C U G G G A A U C A C A A U C A U G G A A A G A A G C
 A G C U U C G A A A A G A A C C C G A U C G A C U U C C U G G A A G C A A A G G
 G A U A C A A G G A A G U C A A G A A G G A C C U G A U C A U C A A G C U G C C
 G A A G U A C A G C C U G U U C G A A C U G G A A A A C G G A A G A A A G A G A
 A U G C U G G C A A G C G C A G G A G A A C U G C A G A A G G G A A A C G A A C
 U G G C A C U G C C G A G C A A G U A C G U C A A C U U C C U G U A C C U G G C
 A A G C C A C U A C G A A A A G C U G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C
 G A A C A G A A G C A G C U G U U C G U C G A A C A G C A C A A G C A C U A C C
 U G G A C G A A A U C A U C G A A C A G A U C A G C G A A U U C A G C A A G A G
 A G U C A U C C U G G C A G A C G C A A A C C U G G A C A A G G U C C U G A G C
 G C A U A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A U C A G A G A A C A G G
 C A G A A A A C A U C A U C C A C C U G U U C A C A C U G A C A A A C C U G G G
 A G C A C C G G C A G C A U U C A A G U A C U U C G A C A C A A C A A U C G A C
 A G A A A G A G A U A C A C A A G C A C A A A G G A A G U C C U G G A C G C A A
 C A C U G A U C C A C C A G A G C A U C A C A G G A C U G U A C G A A A C A A G
 A A U C G A C C U G A G C C A G C U G G G A G G A G A C G G A A G C G G A A G C
 C C G A A G A A G A A G A G A A A G G U C G A C G G A A G C C C G A A G A A G A
 A G A G A A A G G U C G A C A G C G G A U A G

2 2 9

表3に列挙されるような最小ウリジンコドンを使用した、配列番号28をコードするd C a s 9コード配列（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

G A C A A G A A G U A C A G C A U C G G A C U G G C A A U C G G A A C A
 A A C A G C G U C G G A U G G G C A G U C A U C A C A G A C G A A U A C A A G G
 U C C C G A G C A A G A A G U U C A A G G U C C U G G G A A A C A C A G A C A G
 A C A C A G C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G A G C A C U G C U G U U C
 G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C U G A A G A G A A
 C A G C A A G A A G A A G A U A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A U C U G
 C U A C C U G C A G G A A A U C U U C A G C A A C G A A A U G G C A A A G G U C
 G A C G A C A G C U U C U U C C A C A G A C U G G A A G A A A G C U U C C U G G
 U C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A U C U U C G G
 A A A C A U C G U C G A C G A A G U C G C A U A C C A C G A A A A G U A C C C G
 A C A A U C U A C C A C C U G A G A A A G A A G C U G G U C G A C A G C A C A G
 A C A A G G C A G A C C U G A G A C U G A U C U A C C U G G C A C U G G C A C A

10

20

30

40

50

CAUGAUC AAGUUCAGAGGACACUUC CUGAUCGAAGGAGAC
CUGAACC CGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCC
AGCUGGUCCAGACAUAACAAC CAGCUGUUCGAAGAAAACCC
GAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCCAAUCCUGAGC
GCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAAAAC CUGAUCG
CACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAA
CCUGAUCGCAACUGAGCCUGGGACUGACACC GAACUUCAAG
AGCAACUUCGACCUGGCAGAAAGACGCAAAGCUGCAGCUGA
GCAAGGACACAUAACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGC
ACAGAUCGGAGACCAGUACG CAGACCUGUUC CUGGCAGCA
AAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUC CUGA
GAGUCAACACAGAAAUCAACAAGGCCACCGCUGAGCGCAAG
CAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACA
CUGCUGAAGGCA CUGGU CAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGU
ACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGC
AGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUAC
AAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAACAG
AAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAAGACCUGCUGAG
AAAGCAGAGAAACA UUCGACAACGGAAAGCAUCCCGCACCCAG
AUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAAGACAGG
AAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU
CGAAAAGAUCCUGACA UUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGA
CCGCUGGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACA AUCAACCCGUGGAACUUCGAAGA
AGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA
AGAAUGACAAAACUUCGACAAGAAACCUGCCGAACGAAAAGG
UCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGA AUACUUCACAGU
CUACAACGAACUGACA AAAGGUCAAGUACGUCACAGAAAGGA
AUGAGAAAGCCGGCAUUC CUGAGCGGAGAAACAGAAAGGAGG
CAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACA AACAGAAAGGUCAAC
AGUCAAGCAGCUGAAGGAAAGACUACUUCAAGAAAGAU CGAA
UGC UUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAU
UCAACGCAAGCCUGGGAAACAUAACCACGACCUGCUGAAGAU
CAUCAAGGACAAGGACUUC CUGGACAACGAAGAAAACGAA
GACAUCCUGGAAGACAUCGUC CUGACACUGACACUGUUCG
AAGACAGAGAAAU GAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUAACGC
ACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGA
AGAAAGAUACACAGGAUGGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGA
UCAACGGAAU CAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACA AUCCU
GGACUUC CUGAAGAGCGACGGAAUUCGCAAACAGAAACUUC
AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACA UUCAAGGGAAG
ACAUCCAGAAAGGCACAGGU CAGCGGACAGGGAGACAGCCU
GCACGAACACAUCGCAAAC CUGGCAGGAAGCCCGGCAAU C
AAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGU CUGCAGC GAAC
UGGUCAAGGUCAUGGGAAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGU
CAUCGAAAUGGCAAGAGGAAAAC CAGACAACACAGAAAGGGA
CAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGGAAG
GAAUCAAGGAAACUGGGAAAGCCAGAUCCUGAAGGGAACACCC
GGUCGAAAACACACAGCUGCAGAAACGAAAAGCUGUAC CUG
UACUACCUGCAGAACGGAAAGAGACAUGUACGUCGACCAGG

10

20

30

40

50

AACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACGC
AAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGAC
AACAAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
GCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAA
GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACA
CAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAG
GACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACA
GCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAG
AUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACG
ACAAGCUGAUACAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAG
CAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CAGUUCUAC
AAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACACGACACGACG
CAUACCUGAACGCGAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAA
GUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUAC
AAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUUCGCAAAGAGCGAAC
AGGAAAUUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAG
CAACAUCAUGAACUUCUUC AAGACAGAAAUCAACACUGGCA
AACGGAGAAAUCAAGAAAGAGACC GCUGAUCGAAACAACG
GAGAAACAGGAGAAAUUCGUCUGGGACAAGGGAAAGAGACUU
CGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAAC
AUCGUCAAGAAGACAGAAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCA
AGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAU
CGCAAGAAAGAAGGACUGGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGA
UUCGACAGCCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCG
CAAAGGUUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGU
CAAGGAACUGCUGGGAAUCACAUAUGGAAAGAAGCAGC
UUCGAAAAGAACC CGAUCGACUUC CUGGAAGCAAAGGGAU
ACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAA
GUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAACGGAAGAAAGAGAAUG
CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAAGGGAAACGAACUGG
CACUGCCGAGCAAGUACGUC AACUUC CUGUACCUGGCAAG
CCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAAGCCC GGAAGACAACGAA
CAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGG
ACGAAAUAUCAUGAACAGAUCAAGCGAAUUCAGCAAGAGAGU
CAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA
UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAAACAGGCAG
AAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGC
ACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAUAUCGACAGA
AAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACAC
UGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAU
CGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAAGCCCG
AAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCC GAAAGAAAGA
GAAAGGUCGACAGCGGA

230

T7プロモーター

TAATACGACTCACTATA

231

ヒトベクターグロビン 5' UTR

ACATTTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAAC
CTCAAACAGACACC

10

20

30

40

50

232

ヒトベータ-グロビン 3' UTR

GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTT
CCTTTGTTCCCTAAGTCCAACCTACTAAACTGGGGGATATT
ATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAA
CATTTATTTTTCATTGC

233

ヒトアルファ-グロビン 5' UTR

CATAAACCCCTGGCGCGCTCGCGGGCCCGGCACTCTTC
TGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCACC

10

234

ヒトアルファ-グロビン 3' UTR

GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTTGG
GCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCCTTCCTGCACCCGTACC
CCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC

235

Xenopus laevis ベータ-グロビン 5' UTR

AAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCC

236

Xenopus laevis ベータ-グロビン 3' UTR

ACCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGC
TACATAATACCAACTTACACTTTACAAAATGTTGTCCCCC
AAAATGTAGCCATTCGTATCTGCTCCTAATAAAAAGAAAG
TTTCTTTCACATTCT

20

237

ウシ成長ホルモン 5' UTR

CAGGGTCCTGTGGACAGCTCACCCAGCT

238

ウシ成長ホルモン 3' UTR

TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCC
TTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCC
TAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCA

30

239

Mus musculus ヘモグロビンアルファ、成人鎖1 (Hb α -a1)、3' UTR

GCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCCTTCTGGCCATGCCC
TTCTTCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAAT
AAAGCCTGAGTAGGAAG

240

HSD17B4 5' UTR

TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGT
GTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTC

40

241

TTRを標的とするG282ガイドRNA

mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

242

HSDの5' UTR、配列番号4に対応するORF、Kozak配列、およびALB

50

の3' UTRを有するCas9転写産物

GGGTCCCCGCAAGTCGGCGCTCCAGCGGCTCTGCTTGTT
CGTGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACC
ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA
ACAGCGTTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGT
CCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGA
CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCG
ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAAC
AGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAATCTGC
TACCTGCAGGAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTTCG
ACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTCTGGT
CGAAGAAGACAAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGA
AACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGA
CAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGA
CAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACAC
ATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGACC
TGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCA
GCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCG
ATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGCG
CAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGC
ACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAAC
CTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGA
GCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAG
CAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCA
CAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAA
AGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAG
AGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGC
ATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCGGACCTGACAC
TGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTA
CAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCA
GGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTTCTACA
AGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGA
AGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGA
AAGCAGAGAAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCCAGA
TCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGA
AGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATC
GAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGAC
CGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAG
AAAGAGCGAAGAAACAATCACACCCTGGAACTTCGAAGAA
GTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAA
GAATGACAAAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGT
CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTC
TACAACGAACCTGACAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAA
TGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAGAGGC
AATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCA
GTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAAT
GCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT
CAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATC
ATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAAG
ACATCCTGGAAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTTCGA

10

20

30

40

50

AGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCA
CACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAA
GAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGAT
CAACGGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG
GACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAACTTCA
TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGA
CATCCAGAAGGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTG
CACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA
AGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGACGAACT
GGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTC
ATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGAC
AGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGG
AATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCG
GTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGT
ACTACCTGCGAGAACGGAAAGAGACATGTACGTGACCCAGGA
ACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCCAC
ATCGTCCCGCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGACA
ACAAGGTCTCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAG
CGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCTGTCAGAAGATGAAG
AACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACAC
AGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAGGAGG
ACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAG
CTGGTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTGCGACAGA
TCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAGGTACGACGAAAACGA
CAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTTCATCACACTGAAGAGC
AAGCTGGTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACA
AGGTTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGC
ATACCTGAACGCGAGTCGTGCGAACAGCACTGATCAAGAAG
TACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACA
AGGTCTACGACGTGAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACA
GGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGC
AACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAA
ACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAAACAAACGG
AGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGACTTC
GCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTCAACA
TCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAA
GGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATC
GCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGAT
TCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTCTGTCGC
AAAGGTTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTC
AAGGAACTGCTGGGAATCACCAATCATGGAAAGAAGCAGCT
TCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTCTGGAAAGCAAAGGGATA
CAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAG
TACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAGAATGC
TGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAACTGGC
ACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGC
CACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAAC
AGAAGCAGCTGTTCTGTGCAACAGCACAAAGCACTACCTGGA
CGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCT
ATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCTCTGAGCGCAT

10

20

30

40

50

ACAAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAA
AAACATCATCCACCTGTTACACTGACAAACCTGGGAGCA
CCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAA
AGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACT
GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATC
GACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGA
AGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAG
CATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAG
ATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTCTTTTTCGTTGGTGT
AAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAAT
CATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAAT
GGAAAGAACCTCGAG

243

HSDの5'UTR、配列番号4に対応するORF、およびALBの3'UTRを有するCas9転写産物

GGGTCCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTT
CGTGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCATGGAC
AAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAACAGCG
TCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAG
CAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAACACAGACAGACACAGC
ATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCG
GAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAG
AAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTG
CAGGAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTTCGACGACA
GCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTTCGAAGA
AGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATC
GTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCT
ACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTTCGACAGCACAGACAAGGC
AGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATC
AAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACC
CGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGT
CCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAAC
GCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGAC
TGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCT
GCCGGGAGAAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATC
GCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACT
TCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGA
CACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATC
GGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCCTGGCAGCAAAGAACC
TGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAA
CACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATC
AAGAGATACGACGAACACCAACAGGACCTGACACTGCTGA
AGGCACCTGGTTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGA
AATCTTCTTTCGACCAAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATAC
ATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCA
TCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGAACT
GCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAG
AGAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCAAGATCCACC
TGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTT
CTACCCGTTCTCTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAG

10

20

30

40

50

ATCCTGACATTTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGG
CAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAG
CGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTC
GACAAGGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGA
CAAACCTTCGACAAGAACCTGCCGGAACGAAAAGGTCCTGCC
GAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAAC
GAACTGACAAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAA
AGCCGGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGGCAATCGT
CGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAG
CAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTTCG
ACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGC
AAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAG
GACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCC
TGGAAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGTTTCGAAGACAG
AGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTG
TTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGAT
ACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGG
AATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTC
CTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAACTTCATGCAGC
TGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGGAAGACATCCA
GAAGGCACAGGT CAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAA
CACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGG
GAATCCTGCGACAGTC AAGGTTCGTGACGAACTGGTCAA
GGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAA
ATGGCAAGAGAAAAC CAGACAACACAGAAGGGACAGAAGA
ACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAA
GGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAA
AACACACAGCTGCGAAGACGAAAAGCTGTACCTGTACTACC
TGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACCTGGA
CATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTC
CCGCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGG
TCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAA
CGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAAGCTAC
TGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACACAGAGAA
AGTTTCGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAG
CGAACTGGACAAGGCAGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTC
GAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCAACAGATCCTGG
ACAGCAGAATGAACACAAGGTACGACGAAAACGACAAGCT
GATCAGAGAAAGTCAAGGTTCATCACACTGAAGAGCAAGCTG
GTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCA
GAGAAATCAACAACCTACCACCAACGCACACGACGCATACCT
GAACGCGAGTCGTGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCG
AAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCT
ACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAAT
CGGAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATC
ATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAG
AAATCAGAAAGAGACCCTGATCGAAACAACGGAGAAAC
AGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAAGAGACTTCGCAACA
GTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTCAACATCGTCA
AGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAG

10

20

30

40

50

CATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGA
AAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACA
GCCCCGACAGTGCATACAGCGTCCCTGGTCGTGCAAAAGGT
CGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAA
CTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGCTTTCGAAA
AGAACC CGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGA
AGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGC
CTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAA
GCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAACTGGCACTGCC
GAGCAAAGTACGTCAACTTCTCTGTACCTGGCAAAGCCACTAC
GAAAAGCTGAAGGGAAAGCCCCGGAAGACAACGAACAGAAGC
AGCTGTTTCGTGCAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAAT
CATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAAGAGAGTCATCCTG
GCAGACGCAAAACCTGGACAAGGTCCCTGAGCGCATACAACA
AGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACAT
CATCCACCTGTTTCACACTGACAAAACCTGGGAGCACCCGGCA
GCATTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGAT
ACACAAGCACAAAGGAAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCA
CCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAATCGACCTG
AGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCCGAAGAAGA
AGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTC
AGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAAT
AGCTTATTTCATCTCTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAGCC
AACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTT
GCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAG
AACCTCGAG

2 4 4

未使用

2 4 5 ~ 2 4 9

スプライス接合部を除去したCas9 ORF、12.75%のU含有量

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGA
ACAAACAGCGTCGGATGGGACAGTCATCACAGACGAATACA
AGGTCCCAGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCCTGGGAAACACAGA
CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTG
TTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGA
GAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAT
CTGCTACCTGCAGGAAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAG
GTCGACGACAGCTTCTTCCACcg gCTGGAAGAAAGCTTCC
TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTT
CGGAACAATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTAC
CCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCA
CAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC
ACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGA
GACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAA
CCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTG
AGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGA
TCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCCG
AAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCCGAACCTC

10

20

30

40

50

AAGAGCAACTTTCGACCTGGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCA
GCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC
TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCCACCGCTGAGCGC
AAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCAGGACCTG
ACACTGCTGAAGGCACTGGTTCAGACAGCAGCTGCCGGAAA
AGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATA
CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCT
TACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCT
GAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCAC
CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGAC
AGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAA
GATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTC
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGA
AGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATC
GAAAGAATGACAAGAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAA
AGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCAC
AGTCTACAACGAAGCTGACAAGGTCAGTACGTCACAGAA
GGAATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAG
AGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAAAGGT
CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATC
GAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACA
GATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAAC
GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAG
AGAAGAAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGC
TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCGAAGG
AAGACATCCAGAAGGCACAGGTTCAGCGGACAGGGAGACAG
CCTGCACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCA
ATCAAGAAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACG
AACTGGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAT
CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAACCAAGACAACACAGAAG
GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAATCGAAG
AAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACA
CCCGGTTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAaAACGGAAGAGACATGTACGTTCGACC
AGGAAGCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGA
CCACATCGTCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTCCTGACAAGAAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGTCCCCGAGCGAAGAAAGTCGTCAAGAAAGAT
GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATC
ACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAG
GAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTTCATCAAGAG

10

20

30

40

50

A C A G C T G G T C G A A A C A A G A C A G A T C A C A A A G C A C G T C G C A
 C A G A T C C T G G A C A G C A G A A T G A A C A C A A A G T A C G A C G A A A
 A C G A C A A G C T G A T C A G A G A A G T C A A G G T C A T C A C A C T G A A
 G A G C A A G C T G G T C A G C G A C T T C A G A A A G G A C T T C C A G T T C
 T A C A A G G T C A G A G A A A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C A C A C G
 A C G C A T A C C T G A A C G C A G T C G T C G G A A C A G C A C T G A T C A A
 G A A G T A C C C G A A G C T G G A A A G C G A A T T C G T C T A C G G A G A C
 T A C A A G G T C T A C G A C G T C A G A A A G A T G A T C G C A A A G A G C G
 A A C A G G A A A T C G G A A A G G C A A C A G C A A A G T A C T T C T T C T A
 C A G C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C A G A A A T C A C A C T G
 G C A A A C G G A G A A A T C A G A A A G A G A C C G C T G A T C G A A A C A A
 A C G G A G A A A C A G G A G A A A T C G T C T G G G A C A A G G G A A G A G A
 C T T C G C A A C A G T C A G A A A G G T C C T G A G C A T G C C G C A G G T C
 A A C A T C G T C A A G A A G A C A G A A G T C C A G A C A G G A G G A T T C A
 G C A A G G A A A G C A T C C T G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C T
 G A T C G C A A G A A A G A A G G A C T G G G A C C C G A A G A A G T A C G G A
 G G A T T C G A C A G C C C G A C A G T C G C A T A C A G C G T C C T G G T C G
 T C G C A A A G G T C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G
 C G T C A A G G A A C T G C T G G G A A T C A C A A T C A T G G A A A G A A G C
 A G C T T C G A A A A G A A C C C G A T C G A C T T C C T G G A A G C A A A G G
 G A T A C A A G G A A G T C A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C
 G A A G T A C A G C C T G T T C G A A C T G G A A A A C G G A A G A A A G A G A
 A T G C T G G C A A G C G C A G G A G A A C T G C A G A A G G G A A A C G A A C
 T G G C A C T G C C G A G C A A G T A C G T C A A C T T C C T G T A C C T G G C
 A A G C C A C T A C G A A A A G C T G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C
 G A A C A G A A G C A G C T G T T C G T C G A A C A G C A C A A G C A C T A C C
 T G G A C G A A A T C A T C G A A C A G A T C A G C G A A T T C A G C A A G A G
 A G T C A T C C T G G C A G A C G C A A A C C T G G A C A A G G T C C T G A G C
 G C A T A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A T C A G A G A A C A G G
 C A G A A A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C A C T G A C A A A C C T G G G
 A G C A C C G G C A G C A T T C A A G T A C T T C G A C A C A A C A A T C G A C
 A G A A A G A G A T A C A C A A G C A C A A A G G A A G T C C T G G A C G C A A
 C A C T G A T C C A C C A G A G C A T C A C A G G A C T G T A C G A A A C A A G
 A A T C G A C C T G A G C C A G C T G G G A G G A G A C G G A G G A G G A A G C
 C C G A A G A A G A A G A G A A A G G T C T A G

250

HSDの5'UTR、配列番号50に対応するORF、Kozak配列、およびALBの3'UTRを有するCas9転写産物

G G G T C C C G C A G T C G G C G T C C A G C G G C T C T G C T T G T T
 C G T G T G T G T C G T T G C A G G C C T T A T T C G G A T C C G C C A C C
 A T G G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G A C T G G A C A T C G G A A C A A
 A C A G C G T C G G A T G G G C A G T C A T C A C A G A C G A A T A C A A G G T
 C C C G A G C A A G A A G T T C A A G G T C C T G G G A A A C A C A G A C A G A
 C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G A G C A C T G C T G T T C G
 A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C T G A A G A G A A C
 A G C A A G A A G A A G A T A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A T C T G C
 T A C C T G C A G G A A A T C T T C A G C A A C G A A A T G G C A A A G G T C G
 A C G A C A G C T T C T T C C A C c g g C T G G A A G A A A G C T T C C T G G T
 C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A T C T T C G G A
 A A C A T C G T C G A C G A A G T C G C A T A C C A C G A A A A G T A C C C G A

10

20

30

40

50

CAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGA
CAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACAC
ATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGACC
TGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCA
GCTGGTCCAGACATACAACCAAGCTGTTTCGAAGAAAACCCG
ATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCG
CAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGC
ACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAAC
CTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGA
GCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAGGCTGCAGCTGAG
CAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCA
CAGATCGGAGACCAGTACGACAGACCTGTTCTCTGGCAGCAA
AGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAG
AGTCAACACAGAAATCACAAAGGCAACCGCTGAGCGCAAGC
ATGATCAAGAGATACGACGAACACCACAGGACCTGACAC
TGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTA
CAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCA
GGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACA
AGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGA
AGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGA
AAGCAGAGAAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCCAGA
TCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGA
AGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATC
GAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGAC
CGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAG
AAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTTCGAAGAA
GTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATCGAAA
GAATGACAAAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGT
CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCACAGTC
TACAACGAACCTGACAAGGTTCAAGTACGTACAGAAAGGAA
TGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAGGAA
AATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCA
GTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAAT
GCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT
CAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATC
ATCAAGGACAAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAAG
ACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTTCA
AGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCA
CACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAA
GAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGAT
CAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG
GACTTCTCTGAAGAGCGACGGGATTTCGCAAAACAGAAACTTCA
TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAGGGAAGA
CATCCAGAAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTG
CACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA
AGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTTCGACGAAC
GGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTC
ATCGAAATGGCAAGAGAGAAAACAGACAACACAGAAAGGAC
AGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAAATCGAAGAAAG
AATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCG

10

20

30

40

50

GTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGT
ACTACCTGCAaAACGGAAGAGACATGTACGTGACCCAGGA
ACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCCAC
ATCGTCCCAGAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGACA
ACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAAGAGAGGAAAGAG
CGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCTGTCAGAAGATGAAG
AACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACAC
AGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGG
ACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTTCATCAAGAGACAG
CTGGTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTGCGACAGA
TCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGA
CAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGC
AAGCTGGTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACA
AGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACACGACACGACGC
ATACCTGAACGCGAGTCGTGGAACAGCACTGATCAAGAAG
TACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTACA
AGGTCTACGACGTGAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACA
GGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGC
AACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAA
ACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGG
AGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAAGAGACTTC
GCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTCAACA
TCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAA
GGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATC
GCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGAT
TCGACAGCCCAGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTCTGTCGC
AAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTC
AAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGCT
TCGAAAAGAACC CGATCGACTTCTCTGGAAAGCAAAGGGATA
CAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAG
TACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAAACGGAAAGAAAGAGAAATGC
TGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACCTGGC
ACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTCTGTACCTGGGCAAGC
CACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAAC
AGAAGCAGCTGTTTCGTGCAACAGCACAAAGCACTACCTGGA
CGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAGAGTTC
ATCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCAT
ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAAACAGGCAGA
AAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAACCTGGGAGCA
CCGGCAGCATTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGAA
AGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTCTGGACGCAACACT
GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAATC
GACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGA
AGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAG
CATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAG
ATCAATAGCTTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGT
AAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAAT
CATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAAT
GGAAAGAACCTCGAG

10

20

30

40

一般的にヒトで頻繁に使用される最小ウリジンコドンを含む Cas9 ORF、1
2. 75%のU含有量

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGGCCTGGACATCGGC
ACCAACAGCGTGGGCTGGGGCCGTGATCACCGACGAGTACA
AGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGA
CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG
TTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGGCCACCAGACTGAAGA
GAACCGCCAGAAAGAAGATACACCAGAAGAAAGAACAGAAT
CTGCTACCTGCAAGGAGATCTTTCAGCAACGAGATGGCCAAAG
GTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGGAGAGCTTCC
TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGAGACACCCCATCTT
CGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTAC
CCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGACAGCA
CCGACAAGGCCGACCTGAGACTGATCTACCTGGCCCTGGC
CCACATGATCAAGTTTCAGAGGCCACTTCTGATCGAGGGC
GACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAA
CCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG
AGCGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAGAACCTGA
TCGCCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCCGG
CAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGGCCTGACCCCCCAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCC
GCCAAGAACCTGAGCGACGCCCATCCTGCTGAGCGACATCC
TGAGAGTGAAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGC
CAGCATGATCAAGAGATACGACGAGCACCAACCAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGAAGACAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTTCGACCAAGAGCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCT
GAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAAGAC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACAGAGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAAATCCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCAGAGGCAACAGCAGATTTCGCCTGGATGA
CCAGAAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTTCATC
GAGAGAATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAAC
CGTGTAACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGAGAAAGCCCGCCTTCTCTGAGCGGCGAGCAGAAAG
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAGGT
GACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC
GAGTGCTTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACA
GATTCAAACGCCAGCCTGGGGCACCTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCCTGACCCCTGT
TCGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTA

10

20

30

40

50

CGCCACCTGTTGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
AGAAGAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGCAGAAAGC
TGATCAACGGCATCAGAGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAAAC
TTCATGCAAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGGCGACAG
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCC
ATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAAGGTGATGGGGCAGACACAAGCCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCAGAGAGAAACCAGACCAACCAGAAAG
GGCCAGAAGAACAGCAGAGAGAGAATGAAGAGAATCGAGG
AGGGCATCAAGGAGCTGGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGGCAGAGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGA
CCACATCGTGGCCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCA
AGAGCGACAACGTGGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGAT
GAAGAAGTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC
ACCCAGAGAAAGTTCTGACAACCTGACCAAGGCCCGAGAGAG
GCGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTTCATCAAGAG
ACAGCTGGTGGAGACCAGACAGATCACCAAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAGA
ACGACAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACCTTGAA
GAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTTC
TACAAGGTGAGAGAGATCAACAACCTACCACCAAGCCACG
ACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAA
GAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTGTACGGCGAC
TACAAGGTGTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAGAGCG
AGCAGGAGATCGGCCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCTTG
GCCAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGACCA
ACGGCGAGACCGGCCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGAGA
CTTCGCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTTG
AACATCGTGAAAGAAGACCGAGGTGCGAGACCGGCCGGCTTCA
GCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGAGAAACAGCGACAAGCT
GATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGC
GGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCCTACAGCGTGTGGTGG
TGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG
CGTGAAAGGAGCTGCTGGGGCATCACCATCATGGAGAGAAGC
AGCTTCGAGAAGAAGACCCCATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGG
GCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
CAAGTACAGCCTGTTCTGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGAGA
ATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCGAGAAGGGCAACGAGC
TGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGC
CAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAC
GAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTTCAGCAAGAG
AGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGC
GCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCCCATCAGAGAGCAGG

10

20

30

40

50

CCGAGAACATCATCCACCTGTTCAACCCTGACCAACCTGGG
CGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGAC
AGAAAGAGATACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCA
CCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCAG
AATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGGCGACGGCGGGCGGCAGC
CCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGTGA

252

HSDの5'UTR、配列番号52に対応するORF、Kozak配列、およびALBの3'UTRを有するCas9転写産物

GGGTCCCCGAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGT
CGTGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACC
ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCCACCA
ACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGT
GCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACAGA
CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCG
ACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCAGACTGAAGAGAAC
CGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAAGAACAGAATCTGC
TACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGGTGG
ACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGGAGAGCTTCTCTGGT
GGAGGAGGACAAGAAGCACGAGAGACACCCCATCTTCGGC
AACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCCAGAGAAGTACCCCA
CCATCTACCACCTGAGAAAGAAAGCTGGTGGACAGCACCGA
CAAGGCCGACCTGAGACTGATCTACCTGGCCCTGGGCCAC
ATGATCAAGTTTCAGAGGCCACTTCTCTGATCGAGGGGCGACC
TGAACCCCGACAACAGCGACGCTGGACAAGCTGTTTCATCCA
GCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCC
ATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCG
CCAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAGAACCTGATCGC
CCAGCTGCCCGGCGAGAAAGAAAGAACGGCCTGTTTCGGCAAC
CTGATCGCCCTGAGCCTGGGGCCTGACCCCCCAACTTCAAGA
GCAACTTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAG
CAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCC
CAGATCGGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCCGCCA
AGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAG
AGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGC
ATGATCAAGAGATACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCC
TGCTGAAGGCCCTGGTGAAGACAGCAGCTGCCCGAGAAGTA
CAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCC
GGCTACATCGACGGCGGGCGCCAGGCCAGGAGGAGTTCTACA
AGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGA
GGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGAGA
AAGCAGAGAACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGA
TCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAAGACAGGA
GGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACAGAGAGAAAGATC
GAGAAGATCCTGACCTTTCAGAAATCCCTACTACGTGGGCC
CCCTGGCCAGAGGCAACAGCAGATTTCGCCTGGATGACCAG
AAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAG
GTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTTCATCGAGA
GAATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGT
GCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTG

10

20

30

40

50

TACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCA
TGAGAAAGCCCCGCTTCTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGC
CATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACC
GTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGT
GCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATT
CAACGCCAGCCTGGGACACCTACCACGACCTGCTGAAGATC
ATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAGG
ACATCCTGGAGGACATCGTGTGCTGACCCTGACCCTGTTTGA
GGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTACGCC
CACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAA
GAAGATACACCGGCTGGGGGCAGACTGAGCAGAAAGCTGAT
CAACGGGCATCAGAGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTG
GACTTCTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAAACTTCA
TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGA
CATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTG
CACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCA
AGAAGGGGCATCCTGCAGACCCTGAAGGTGGTGGACGAGCT
GGTGAAGGTGATGGGCAGACACAAGCCCCGAGAACATCGTG
ATCGAGATGGCCAGAGAGAAACCAGACCACCCAGAAGGGCC
AGAAGAACAGCAGAGAGAGAAATGAAGAGAATCGAGGAGGG
CATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCC
GTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGT
ACTACCTGCAGAACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGA
GCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCAC
ATCGTGTCCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGACA
ACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAG
CGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAG
AACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCC
AGAGAAAGTTTCGACAACCTGACCACAGGCCGAGAGAGGGCGG
CCTGAGCGAGCTGGACAAGGGCCGGCTTCATCAAGAGACAG
CTGGTGGAGACCAGACAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGA
TCCTGGACAGCAGAAATGAACACCAAGTACGACGAGAACGA
CAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGAGC
AAGCTGGTGAAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACA
AGGTGAGAGAGATCAACAACCTACCACACGCCACGACGC
CTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAAG
TACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTGTACGGCGACTACA
AGGTGTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCA
GGAGATCGGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGC
AACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCA
ACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGACCAACGG
CGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGAGACTTC
GCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACA
TCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAA
GGAGAGCATCCTGCCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATC
GCCAGAAAGAAAGGACTGGGACCCCAAGAAAGTACGGCGGCT
TCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGTGGTGGTGGC
CAAGGTGGAGAAAGGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTG
AAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAGAAGCAGCT
TCGAGAAAGAACCCCATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGGGCTA

10

20

30

40

50

CAAGGAGGTTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAG
TACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGAGAAATGC
TGGCCAGCGCCGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGCTGGC
CCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGGCCAGC
CACTACGAGAAGCTGAAGGGGAGCCCCGAGGACAACGAGC
AGAAGCAGCTGTTTCGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGA
CGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTTCAGCAAGAGAGTG
ATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCT
ACAACAAGCACAGAGACAAGCCCCATCAGAGAGCAGGCCGA
GAACATCATCCACCTGTTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCC
CCCGCCGCTTCAAGTACTTTCGACACCACCATCGACAGAA
AGAGATACACCAGCACCAAGGAGGTTGCTGGACGCCACCT
GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCAGAATC
GACCTGAGCCAGCTGGGCGGGCGACGGCGGGCAGCCCCA
AGAAGAAGAGAAAGGTGTGACTAGCCATCACATTTAAAAG
CATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAG
ATCAATAGCTTTATTCATCTCTTTTCTTTTCTTTTCTGTTGGTGT
AAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAAT
CATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAAT
GGAAAGAACCTCGAG

10

20

253

一般的にヒトでほとんど使用されない最小ウリジンコドンを含むCas9 ORF
、12.75%のU含有量

ATGGACAAAAAATACAGCATAGGGCTAGACATAGGG
ACGAACAGCGTAGGGTGGGCGGTAATAACGGACGAATACA
AAGTACCGAGCAAAAAAATTCAAAGTACTAGGGAACACGGA
CCGACACAGCATAAAAAATAACCTAATAGGGGCGCTACTA
TTCGACAGCGGGGGAACGGCGGAAGCGACGCGACTAAAAAC
GAACGGCGCGACGACGATACACGCGACGAATAAACCGAAT
ATGCTACCTACAAGAAATATTCAGCAACGAATGGCGAAA
GTAGACGACAGCTTCTTCCACCGACTAGAAGAAAGCTTCC
TAGTAGAAGAAGACAAAAAACAGAACGACACCCGATATT
CGGGAAACATAGTAGACGAAGTAGCGTACCACGAATAATAC
CCGACGATATACCACTACGAATAAACTAGTAGACAGCA
CGGACAAAGCGGACCTACGACTAATATACCTAGCGCTAGC
GCACATGATAAAATTCGAGGGGCACTTCTAATAGAAGGG
GACCTAAACCCGGACAAACAGCGACGCTAGACAAACTATTCA
TACAACCTAGTACAAACGTACAACCAACTATTGGAAGAAAA
CCCGATAAACGCGAGCGGGGTAGACGCGAAAGCGATACTA
AGCGCGCGACTAAGCAAAAGCCGACGACTAGAAAACCTAA
TAGCGCAACTACCGGGGGAATAAAAAAACGGGCTATTCTGG
GAACCTAATAGCGCTAAGCCTAGGGCTAACGCCGAACCTTC
AAAAGCAACTTTCGACCTAGCGGAAGACGCGAAACTACAAC
TAAGCAAAGACACGTACGACGACGACCTAGACAACTACT
AGCGCAAATAGGGGACCAATACGCGGACCTATTCTAGCG
GCGAAAAACCTAAGCGACGCGATACTACTAAGCGACATAC
TACGAGTAAACACGGAAATAACGAAAGCGCCGCTAAGCGC
GAGCATGATAAAACGATACGACGAACACCAACCAAGACCTA
ACGCTACTAAAAGCGCTAGTACGACAACTACCGGAAA
AATACAAAGAAATATTCCTTCGACCAAGCAAAAAACGGGTA

30

40

50

CGCGGGGTACATAGACGGGGGGGGCGAGCCAAGAAGAATTCT
TACAAATTTCATAAAACCGATACTAGAAAAAATGGACGGGA
CGGAAGAACTACTAGTAAAACCTAAACCGAGAAGACCTACT
ACGAAAAACAACGAACGTTTCGACAACGGGAGCATACCGGCAC
CAAATACACCTAGGGGGAACCTACACGCGATACTACGACGAC
AAGAAGACTTCTACCCGTTCTCTAAAAGACAACCGAGAAAA
AATAGAAAAAATACTAACGTTCCGAATACCGTACTACGTA
GGGCCCGCTAGCGCGAGGGGAACAGCCGATTTCGCGTGGATGA
CGCGAAAAAGCGAAGAAACGATAACGCCGTGGAACTTTCGA
AGAAGTAGTAGACAAAGGGGGCGAGCGCGCAAAGCTTTCATA
GAACGAATGACGAACCTTCGACAAAAAACCTACCGAACGAAA
AAGTACTACCGAAACACAGCCTACTATACGAATACTTTCAC
GGTATACAACGAACCTAACGAAAGTAAAATACGTAACGGAA
GGGATGCGAAAAACCGGCGTTCTCTAAGCGGGGAACAAAAAA
AAGCGATAGTAGACCTACTATTCAAACGAACCGAAAAAGT
AACGGTAAAAACAACCTAAAAGAAGACTACTTCAAATAATA
GAATGCTTCGACAGCGTAGAAATAAGCGGGGTAGAAAGACC
GATTCAACGCGAGCCTAGGGGACGTACCACGACCTACTAAA
AATAATAAAGACAAAGACTTCTCTAGACAACGAAGAAAAAC
GAAGACATACTAGAAAGACATAGTACTAACGCTAACGCTAT
TCGAAGACCGAGAAATGATAGAAAGAACGACTAAAAAACGTA
CGCGCACCTATTTCGACGACAAAGTAATGAAACAACCTAAAA
CGACGACGATACACGGGGGTGGGGGGCGACTAAGCCGAAAAAC
TAATAAACGGGATACGAGACAAACAAAGCGGGGAAAAACGAT
ACTAGACTTCTCTAAAAAGCGACGGGTTTCGCGAACCGAAAC
TTCATGCAACTAATACACGACGACAGCCTAACGTTCAAAG
AAGACATACAAAAAGCGCAAGTAAGCGGGCAAGGGGACAG
CCTACACGAACACATAGCGAACCTAGCGGGGAGCCCGGCG
ATAAAAAAAGGGATACTACAAACGGTAAAAGTAGTAGACG
AACTAGTAAAAGTAATGGGGGCGACACAAACCGGAAAAACAT
AGTAATAGAAATGGCGCGAGAAACCAAACGACGCAAAAA
GGGCAAAAAAACAGCCGAGAACGAATGAAACGAATAGAAAG
AAGGGATAAAAGAACTAGGGGAGCCAAATACTAAAAGAAC
CCCGGTAGAAAAACACGCAACTACAAAAACGAAAAACTATAC
CTATACTACCTACAAAAACGGGGCGAGACATGTACGTAGACC
AAGAAGTAGACATAAACCGACTAAGCGACTACGACGTAGA
CCACATAGTACCGCAAAGCTTCTCTAAAAGACGACAGCATA
GACAACAAGTACTAACGCGAAGCGACAAAAAACCGAGGGA
AAAGCGACAACGTACCGAGCGAAGAAGTAGTAAAAAAAAT
GAAAAACTACTGGCGACAACCTACTAACGCGAAACTAATA
ACGCAACGAAAAATTTCGACAACCTAACGAAGCGGAACGAG
GGGGGGCTAAGCGAACTAGACAAGCGGGGTTTCATAAACG
ACAACTAGTAGAAACGCGACAATAACGAACACGTAGCG
CAAATACTAGACAGCCGAATGAACACGAATAACGACGAAA
ACGACAACCTAATACGAGAAGTAAAAGTAATAACGCTAAA
AAGCAAACCTAGTAAGCGACTTCCGAAAAAGACTTCCAATT
TACAAAGTACGAGAAATAAACAACTACCACCACGCGCACG
ACGCGTACCTAACGCGGTAGTAGGGACGGCGCTAATAAA
AAAATACCCGAACCTAGAAAGCGAATTTCGTATACGGGGAC
TACAAAGTATACGACGTACGAAAAAATGATAGCGAAAAAGCG

10

20

30

40

50

AACAAGAAATAGGGAAAGCGACGGCGAAATACTTCTTCTA
CAGCAACATAATGAAC TTCTTCAAAACGGAAATAACGCTA
GCGAACGGGGAAATACGAAAACGACCGCTAATAGAAACGA
ACGGGGGAAACGGGGGAAATAGTATGGGGACAAAGGGGCGAGA
CTTCGCGACGGTACGAAAAGTACTAAGCATGCCGCAAGTA
AACATAGTAAAAAAAACGGGAAGTACAAACGGGGGGGGTTCA
GCAAAGAAAGCATACTACCGAAACGAAACAGCGACAAACT
AATAGCGCGAAAAAAAGACTGGGACCCGAAAAAATACGGG
GGGTTCGACAGCCCGACGGTAGCGTACAGCGTACTAGTAG
TAGCGAAAGTAGAAAAAGGGAAAGCAAAAAAACTAAAAAG
CGTAAAAGAACTACTAGGGATAACGATAATGGAACGAAGC
AGCTTCGAAAAAAACCCGATAGACTTCTCTAGAAAGCGAAAG
GGTACAAAGAAAGTAAAAAAAGACCTAATAATAAACTACC
GAAATACAGCCTATTTCGAACTAGAAAAACGGGGCGAAAAACGA
ATGCTAGCGAGCGCGGGGGAACTACAAAAAGGGGAACGAAC
TAGCGCTACCGAGCAAAATACGTAAACTTCTCTATACCTAGC
GAGCCACTACGAAAAACTAAAAAGGGAGCCCGGAAGACAAC
GAACAAAAACAACCTATTTCGTAGAACACAACAACACTACC
TAGACGAAATAATAGAACAAATAAGCGAATTTCAGCAAACG
AGTAATACTAGCGGACGCGGAACCTAGACAAAGTACTAAGC
GCGTACAACAACAACCGAGACAAACCGATACGAGAACAAAG
CGGAAAAACATAATACACCTATTTCACGCTAACGAACCTAGG
GGCGCCGGCGGGCGTTCAAATACTTTCGACACGACGATAGAC
CGAAAAACGATACACGAGCACGAAAGAAAGTACTAGACGCGA
CGCTAATACACCAAAAGCATAACGGGGCTATACGAAACGCG
AATAGACCTAAGCCAACCTAGGGGGGGGACGGGGGGGGGAGC
CCGAAAAAAAACGAAAAGTATGA

254

HSDの5'UTR、配列番号54に対応するORF、Kozak配列、およびALBの3'UTRを有するCas9転写産物

GGGTCCCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGT
CGTGTTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACC
ATGGACAAAAAATACAGCATAGGGCTAGACATAGGGACGA
ACAGCGTAGGGTGGGCGGTAATAACGGACGAATACAAAGT
ACCGAGCAAAAAAATTCAAAGTACTAGGGGAACACGGACCGA
CACAGCATAAAAAAAACCTAATAGGGGCGCTACTATTTCG
ACAGCGGGGAAACGGCGGAAGCGACGCGACTAAAACGAAC
GGCGCGACGACGATACACGCGACGAAAAAACCGAATATGC
TACCTACAAGAAATATTTCAGCAACGAAATGGCGAAAGTAG
ACGACAGCTTCTTCCACCGACTAGAAAGAAAGCTTCTCTAGT
AGAAGAAGACAAAAAACACGAACGACACCCGATATTTCGGG
AACATAGTAGACGAAGTAGCGTACCACGAAAAAATACCCGA
CGATATACCACCTACGAAAAAAAACCTAGTAGACAGCACGGA
CAAAGCGGACCTACGACTAATATACCTAGCGCTAGCGCAC
ATGATAAAATTCGAGGGGCACTTCTTAATAGAAAGGGGACC
TAAACCCGGACAACAGCGACGTAGACAAACTATTTCATACA
ACTAGTACAAACGTACAAACCAACTATTTCGAAGAAAACCCG
ATAAACGCGAGCGGGGTAGACGCGAAAGCGATACTAAGCG
CGCGACTAAGCAAAAGCCGACGACTAGAAAACCTAATAGC
GCAACTACCGGGGGGAAAAAAAACGGGCTATTTCGGGAAC

10

20

30

40

50

CTAATAGCGCTAAGCCTAGGGCTAACGCCGAACCTTCAAAA
GCAACTTCGACCTAGCGGAAGACGCGAAACTACAACCTAAG
CAAAGACACGTACGACGACGACCTAGACAACCTACTAGCG
CAAATAGGGGACCAATACGCGGACCTATTCTCTAGCGGGCGA
AAAACCTAAGCGACGCGATACTACTAAGCGACATACTACG
AGTAAACACGGAAATAACGAAAGCGCCGCTAAGCGCGAGC
ATGATAAAACGATACGACGAACACCACCAAGACCTAACGC
TACTAAAAGCGCTAGTACGACAACAACCTACCGGAAAAATA
CAAAGAAATATTCTTCGACCAAGCAAAAACGGGGTACGCG
GGGTACATAGACGGGGGGGGCGAGCCAAAGAAGAATTCTACA
AATTCATAAAAACCGATACTAGAAAAAATGGACGGGGACGGA
AGAACTACTAGTAAAACTAAACCGAGAAAGACCTACTACGA
AAACAACGAACGTTTCGACAACGGGAGCATACCGGCACCAAA
TACACCTAGGGGAACTACACGCGATACTACGACGACAAGA
AGACTTCTACCCGTTCTCTAAAAGACAACCGAGAAAAAATA
GAAAAAATACTAACGTTCCGAATACCGTACTACGTAGGGC
CGCTAGCGCGAGGGGAACAGCCGATTTCGCGTGGATGACGCG
AAAAAGCGAAGAAACGATAACGCCGTGGAACTTCGAAGAA
GTAGTAGACAAAGGGGGCGAGCGCGCAAGCTTCATAGAAC
GAATGACGAACCTTCGACAATAAACCTACCGAACGAAAAAGT
ACTACCGAAACACAGCCTACTATACGAATACTTCACGGTA
TACAACGAACCTAACGAAAGTAAATAACGTAAACGGAAGGGA
TGCGAAAAACCGGCGTTCTCTAAGCGGGGAACAAAAAAGC
GATAGTAGACCTACTATTCAAACGAACCGAAAAAGTAACG
GTAAAACAACCTAAAAGAAGACTACTTCAAAAAAATAGAAAT
GCTTCGACAGCGTAGAAATAAGCGGGGTAGAAGACCGATT
CAACGCGAGCCTAGGGACGTACCACGACCTACTAAAAATA
ATAAAAGACAAAGACTTCTCTAGACAACGAAGAAACGAAG
ACATACTAGAAGACATAGTACTAACGCTAACGCTATTTCGA
AGACCGAGAAATGATAGAAGAACGACTAAAAACGTACGCG
CACCTATTTCGACGACAAGTAATGAAACAACCTAAAAACGAC
GACGATACACGGGGTGGGGGGCGACTAAGCCGAAAACTAAT
AAACGGGGATACGAGACAACAAGCGGGGAAACGATACTA
GACTTCTCTAAAAAGCGACGGGGTTTCGCGAACCGAAACTTCA
TGCAACTAATACACGACGACAGCCTAACGTTTCAAAGAAGA
CATACAAAAAGCGCAAGTAAGCGGGCAAGGGGACAGCCTA
CACGAACACATAGCGAACCTAGCGGGGAGCCCGGCGATAA
AAAAAGGGATACTACAAACGGGTAAAAGTAGTAGACGAAC
AGTAAAAGTAATGGGGCGACACAACCGGAAAAACATAGTA
ATAGAAATGGCGCGAGAAAACCAACGACGCAAAAAGGGC
AAAAAAACAGCCGAGAACGAATGAAACGAATAGAAGAAGG
GATAAAAGAACTAGGGAGCCAAATACTAAAAGAACACCCG
GTAGAAAACACGCAACTACAAAACGAAAAACTATACCTAT
ACTACCTACAAAACGGGCGAGACATGTACGTAGACCAAGA
ACTAGACATAAACCGACTAAGCGACTACGACGTAGACCAC
ATAGTACCGCAAAGCTTCTCTAAAAGACGACAGCATAGACA
ACAAAGTACTAACGCGAAGCGACAAAAACCGAGGGGAAAAG
CGACAACGTACCGAGCGAAGGAAGTAGTAAAAAAAATGAAA
AACTACTGGCGACAACCTACTAAACGCGAAACTAATAACGC
AACGAAAAATTTCGACAACCTAACGAAAGCGGAACGAGGGGG

10

20

30

40

50

GCTAAGCGAACTAGACAAAGCGGGGTTCATAAAACGACAA
 CTAGTAGAAACGCGACAAATAACGAAACACGTAGCGCAAA
 TACTAGACAGCCGAATGAACACGAAATACGACGAAAACGA
 CAAACTAATACGAGAAGTAAAAGTAATAACGCTAAAAAGC
 AAAGTAGTAAGCGACTTCCGAAAAGACTTCCAATTCTACA
 AAGTACGAGAAATAAACAACTACCACCACGCGCACGACGC
 GTACCTAAACGCGGTAGTAGGGACGGCGCTAATAAAAAAA
 TACCCGAAACTAGAAAGCGAATTTCGTATACGGGGACTACA
 AAGTATACGACGTACGAAAAAATGATAGCGAAAAAGCGAACA
 AGAAATAGGGAAAGCGACGGCGAAATACTTCTTCTACAGC
 AACATAATGAACTTCTTCAAACGGAAATAACGCTAGCGA
 ACGGGGAAATACGAAAACGACCGCTAATAGAAACGAACGG
 GGAAACGGGGGAAATAGTATGGGACAAAGGGCGAGACTTC
 GCGACGGTACGAAAAGTACTAAGCATGCCGCAAGTAAACA
 TAGTAAAAAAAACGGAAGTACAAACGGGGGGGTTCAGCAA
 AGAAAGCATACTACCGAAACGAAACAGCGACAAACTAATA
 GCGCGAAAAAAAAGACTGGGACCCGAAAAAATACGGGGGGT
 TCGACAGCCCGACGGTAGCGTACAGCGTACTAGTAGTAGC
 GAAAGTAGAAAAAGGGAAAGCAAAAAACTAAAAAGCGTA
 AAAGAAGTACTAGGGATAACGATAATGGAACGAAGCAGCT
 TCGAAAAAAACCCGATAGACTTCTCTAGAAGCGAAAGGGTA
 CAAAGAAGTAAAAAAAGACCTAATAATAAACTACCGAAA
 TACAGCCTATTTCGAACTAGAAAACGGGGCGAAAACGAATGC
 TAGCGAGCGCGGGGGGAACTACAAAAAGGGGAACGAAGTAC
 GCTACCGAGCAAATACGTAAACTTCTCTATACCTAGCGAGC
 CACTACGAAAAAACTAAAAAGGGAGCCCCGGAAGACAACGAAC
 AAAAAACAAGTATTTCGTAGAACAAACACAAACACTACCTAGA
 CGAAATAATAGAACAAATAAGCGAATTTCAGCAAACGAGTA
 ATACTAGCGGACGCGAACCTAGACAAAGTACTAAGCGCGT
 ACAACAAACACCGAGACAAACCGATACGAGAACAAAGCGGA
 AAACATAATACACCTATTTCACGCTAACGAACCTAGGGGCG
 CCGGCGGCGTTCAAATACTTTCGACACGACGATAGACCGAA
 AACGATACACGAGCACGAAAGAAGTACTAGACGCGACGCT
 AATACACCAAAGCATAACGGGGCTATACGAAACGCGGAATA
 GACCTAAGCCAACTAGGGGGGGGACGGGGGGGGGAGCCCGA
 AAAAAAAACGAAAAGTATGACTAGCCATCACATTTTAAAG
 CATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAG
 ATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTCTTTTCTTTTCTGTTGGTGT
 AAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAAT
 CATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAAT
 GGAAAGAACCTCGAG

255

CleanCap（商標）とともに使用するための最初の3個のヌクレオチドとしてのAGG、HSDの5'UTR、配列番号4に対応するORF、Kozak配列、およびALBの3'UTRを有するCas9転写産物

AGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGT
 CGTGTGTGTGTGCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACC
 ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA
 ACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGT
 CCGGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGA

10

20

30

40

50

CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCG
ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAAC
AGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGC
TACCTGCAAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTTCG
ACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTCTGGT
CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGA
AACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGA
CAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGA
CAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACAC
ATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGACC
TGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCA
GCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCG
ATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCG
CAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGC
ACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAAC
CTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGA
GCAACTTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAG
CAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCA
CAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAA
AGAACCCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAG
AGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGC
ATGATCAAGAGATACGACGAACACCACAGGACCTGACAC
TGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTA
CAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCA
GGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACA
AGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGA
AGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGA
AAGCAGAGAAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCCAGA
TCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACAGGA
AGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATC
GAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGAC
CGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAG
AAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAA
GTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAA
GAATGACAAAACCTTCGACAAGAACCCTGCCGAACGAAAAGGT
CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAACAGTC
TACAACGAACTGACAAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAA
TGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAGAGGC
AATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAACA
GTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAAT
GCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT
CAACGCAAGCCTGGGAAACATACCACGACCTGCTGAAGATC
ATCAAGGACAAAGGACTTCTCTGGACAAACGAAAGAAACGAAG
ACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTTCGA
AGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCA
CACCTGTTTCGACGACAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA
GAAGATACACAGGATGGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGAT
CAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG
GACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAACTTCA
TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGGAAGA

10

20

30

40

50

CATCCAGAAGGCCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTG
CACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCC GGCAATCA
AGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGACGAACCT
GGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTC
ATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGAC
AGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGG
AATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCG
GTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGT
ACTACCTGTCAGAACGGGAAGAGACATGTACGTGACCCAGGA
ACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCCAC
ATCGTCCC GCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGACA
ACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAG
CGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAG
AACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACAC
AGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCGAGAGAGAGGAGG
ACTGAGCGAACTGGACAAGGCGAGGATTCATCAAGAGACAG
CTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTGCGACAGA
TCCTGGACAGCAGAATGAACACAAGGTACGACGAAAACGA
CAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGC
AAGCTGGTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACA
AGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCGCACACGACGCG
ATACCTGAACGCGAGTCGTGCGGAACAGCACTGATCAAGAAG
TACCCGAAGCTGGAAAGCGGAATTCTGTCTACGGAGACTACA
AGGTCCTACGACGTGAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACA
GGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGC
AACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAA
ACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAACCGG
AGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGACTTC
GCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTCAACA
TCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAA
GGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATC
GCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGAT
TCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTTCGTGCG
AAAGGTCGAAAAGGGGAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTC
AAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGCT
TCGAAAAGAACC CGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGGGATA
CAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAG
TACAGCCTGTTTCGAACCTGGAAAACGGAAGAAAGAGAAATGC
TGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAACTGGC
ACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGC
CACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCC GGAAAGACAACGAAC
AGAAGCAGCTGTTTCGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGA
CGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAGAGTTC
ATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCAT
ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGA
AAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAACCTGGGAGCA
CCGGCAGCATTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGAA
AGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACT
GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATC
GACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCCGA

10

20

30

40

50

AG AAG AAG AG AAG GTCTAGCTAGCCATCACATTTTAAAAG
CATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAG
ATCAATAGCTTATTTCATCTCTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGT
AAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAAT
CATTTTTGCCTCTTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAAT
GGAAAGAACCTCGAG

256

CMV由来の5'UTR、配列番号4に対応するORF、Kozak配列、およびA
LBの3'UTRを有するCas9転写産物

GGGCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTT
GACCTCCATAGAAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCG
GCCGGGAACGGTGCAATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAA
GAGTGACTCACCGTCTTTGACACGGCCACCATGGACAAGA
AGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAACAGCGTCGG
ATGGGCAGTCAACACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAG
AAGTTCAAGGTCCTGGGAACACAGACAGACACAGCATCA
AGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTGACAGCGGAGA
AACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGA
AGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGG
AAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAGCTT
CTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGCTCGAAGAAGAC
AAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCG
ACGAAGTCGCATACCACGAAAGTACCCGACAATCTACCA
CCTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGAC
CTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGT
TCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGA
CAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAG
ACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAA
GCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAG
CAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCG
GGAGAAAAGAAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCAC
TGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGA
CCTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACA
TACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGGAG
ACCAGTACGACAGACCTGTTCTGTCAGCAAAGAACCTGAG
CGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACA
GAAATCACAAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGA
GATACGACGAACACCACCAAGGACCTGACACTGCTGAAGGC
ACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATC
TTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCG
ACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCTACAAGTTTCATCAA
GCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGAAGAACTGCTG
GTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAA
CATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAAGATCCACCTGGG
AGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGACTTCTAC
CCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCC
TGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAG
AGGAACAACAGCAGATTGCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAA
GAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACA
AGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATCGAAAGAATGACAAA

10

20

30

40

50

CTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAG
CACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAAC
TGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAGGAATGAGAAAGCC
GGCATTCTTGAGCGGAGAACAGAAGGAAGGCAATCGTTCGAC
CTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTACACAGTCAAGCAGC
TGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAG
CGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGC
CTGGGAACATAACACGACCCTGCTGAAGATCATCAAGGACA
AGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGA
AGACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTCTGAAGACAGAGAA
ATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCG
ACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACAC
AGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATC
AGAGACAAGCAGAGCGGAAGACAAATCCTGGACTTCTCTGA
AGAGCGACGGATTCTGCAAAACAGAAACTTTCATGCAGCTGAT
CCACGACGACAGCCTGACATTCGAAGGAAGACATCCAGAAG
GCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACA
TCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAAT
CCTGCAGACAGTCAAGGTCGTTCGACGAACTGGTCAAGGTC
ATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTTCATCGAAATGG
CAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAG
CAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAAGGAATCAAGGAA
CTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCTGAAAACA
CACAGCTGTCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA
GAACGGAAGAGACATGTACGTTCGACCAGGAACCTGGACATC
AACAGACTGAGCGACTACGACGTTCGACCACATCGTCCC GC
AGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCT
GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAGAGCGACAACGTC
CCGAGCGAAGAAGTCTGTCGAAGAAGATGAAGAACTACTGGA
GACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTT
CGACAACCTGACAAGGCGAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAA
CTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTTCGAAA
CAAGACAGATCACAAAGCACGTTCGCACAGATCCTGGACAG
CAGAATGAACACAAGGTACGACGAAAACGACAAGCTGATC
AGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCA
GCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTTCAGAGA
AATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAAC
GCAGTCGTTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGC
TGGAAAGCGAATTCTGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGA
CGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATCGGA
AAGGCAACAGCAAGGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGA
ACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAAT
CAGAAAGAGACCCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGA
GAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCA
GAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTCAACATCGTCAAGAA
GACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATC
CTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGA
AGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCC
GACAGTCGCATACAGCGTCTGGTTCGTTCGCAAAAGGTCGAA
AAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGC

10

20

30

40

50

TGGGAATCACCAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAA
CCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTC
AAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGT
TCGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGC
AGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGC
AAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAA
AGCTGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCT
GTTCTGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATC
GAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAGAGTCAATCCTGGCAG
ACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCA
CAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATC
CACCTGTTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCAT
TCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACAC
AAGCACAAAGGAAGTCTGGACGCAACACTGATCCACCAG
AGCATCACAGGACTGTACGAACAAGAATCGACCTGAGCC
AGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCCGAAGAAGAAGAG
AAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAGCATCTCAGCC
TACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCT
TATTCATCTCTTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACA
CCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCT
CTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCT
TCGAG

257

HBB由来の5'UTR、配列番号4に対応するORF、Kozak配列、およびHBBの3'UTRを有するCas9転写産物

GGGacatttgcttctgacacaaactgtgtttcactagc
aacctcaaacagacaccggatctgcccaccATGGACAAGAA
GTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAACAGCGTCGGA
TGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGA
AGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAA
GAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAA
ACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAA
GATACACAAGAAGAAAGAAACAGAATCTGCTACCTGCAGGA
AATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAGCTTTC
TTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTTCCTGGTCGAAGAAGACA
AGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGA
CGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCAC
CTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACC
TGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTT
CAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGAC
AACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGA
CATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAG
CGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGC
AAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGG
GAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACT
GAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGAC
CTGGCAGAAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACAT
ACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGAA
CCAGTACGCAGACCTGTTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGC
GACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAG

10

20

30

40

50

AAATCACAAAGGCCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAG
ATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCA
CTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCT
TCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGA
CGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTTCATCAAG
CCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGAAGAACTGCTGG
TCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAC
ATTGACAAACGGAAGCATCCCGCACCCAGATCCACCTGGGA
GAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGACTTCTACC
CGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCT
GACATTTCAGAATCCCGTACTACGTCCGACCGCTGGCAAGA
GGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAG
AAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTCGACAA
GGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAAC
TTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGC
ACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACCT
GACAAAGGTTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGAGAAAGCCG
GCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAGAGGCAATCGTCGACC
TGCTGTTCAAGACAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCT
GAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTTCGACAGC
GTCGAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCC
TGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAA
GGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAA
GACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTTCGAAGACAGAGAAA
TGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGA
CGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACA
GGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCA
GAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCTCTGAA
GAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATC
CACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGG
CACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACAT
CGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGGAATC
CTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCA
TGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTTCATCGAAATGGC
AAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGC
AGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAAC
TGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACAC
ACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAG
AACGGAAGAGACATGTACGTGACCCAGGAACCTGGACATCA
ACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCCACATCGTCCC GCA
GAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTG
ACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCC
CGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAG
ACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTTC
GACAACCTGACAAGAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAAC
TGGACAAGGCAGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTTCGAAAC
AAGACAGATCACAAAGCACGTTCGCACAGATCCTGGACAGC
AGAATGAACACAAGGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCA
GAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTTCAG
CGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAA

10

20

30

40

50

ATCAACAAC TACCACCAC GACGACAT ACCTGAACG
 CAGTCGTCG GGAACAGCA CTGATCAAGA AGTACCCGA AGCT
 GGAAAGCGA ATTCTGTCTAC GGAAGACTACA AGGTCTACGAC
 GTCAGAAAG ATGATCGCAA AGAGCGA AACAGGAAATCGGAA
 AGGCAACAGCAA AGTACTTCTTCTACAGCAA CATCATGAA
 CTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATC
 AGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAG
 AAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAG
 AAAGGTCCCTGAGCATGCCGCGAGGTCAACATCGTCAAGAAAG
 ACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCC
 TGCCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAA
 GGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCG
 ACAGTCGCATACAGCGTCTCTGGTCGTCGCAAAGGTTCGAAA
 AGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCT
 GGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAAC
 CCGATCGACTTCTCTGGAAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCA
 AGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGT
 CGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCA
 GGAGAACTGCAAGAAGGGAAACGAACCTGGCACTGCCGAGCA
 AGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAA
 GCTGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTG
 TTCGTGCAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCG
 AACAGATCAGCGAATTCTAGCAAGAGAGTCACTCTGGCAGA
 CGCAAACCTGGACAAGGTCTCTGAGCGCATACAACAAGCAC
 AGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCC
 ACCTGTTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATT
 CAAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACA
 AGCACAAAGGAAGTCTCTGGACGCAACACTGATCCACCAGA
 GCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCA
 GCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA
 AAGGTCTAGc t a g c g c t c g c t t t c t t g c t g t c c a a t t t c t
 a t t a a a g g t t c c t t t g t t c c c t a a g t c c a a c t a c t a a a c t
 g g g g g a t a t t a t g a a g g g c c t t g a g c a t c t g g a t t c t g c c
 t a a t a a a a a a c a t t t a t t t t c a t t g c c t c g a g

258

XBG由来の5' UTR、配列番号4に対応するORF、Kozak配列、およびXBGの3' UTRを有するCas9転写産物

GGGaagctc agaataaac gctcaacttt ggccggat
 ctggccacCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACAT
 CGGAACAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAA
 TACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCTCTGGGAACA
 CAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACT
 GCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTG
 AAGAGAACAGCAAGAAGAAAGATACACAAGAAGAAAGAAC
 GAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTTCAGCAACGAAATGGC
 AAAGGTTCGACGACAGCTTCTTTCACAGACTGGAAGAAAGC
 TTCCTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGA
 TCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAA
 GTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTTCGAC
 AGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCAC

10

20

30

40

50

TGGCACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGA
AGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTG
TTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAG
AAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGGCAAT
CCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAAC
CTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGT
TCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAA
CTTCAAGAGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAGCTG
CAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACC
TGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGACAGACCTGTTCTCT
GGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGAC
ATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGGCACCGCTGA
GCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGA
CCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTTCAGACAGCAGCTGCCG
GAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTTCGACCAGAGCAAGAACG
GATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGA
ATTCTACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGAC
GGAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACC
TGCTGAGAAAGCAGAGAAACATTCGACAACGGAAAGCATCCC
GCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGA
AGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAG
AAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTA
CGTCGGACCCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGG
ATGACAAGAAAGAGCGAAAGAAACAATCACACCCTGGAACT
TCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTT
CATCGAAAGAATGACAAAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAAC
GAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACT
TCACAGTCTACAACGAACCTGACAAAAGGTCAAGTACGTCAC
AGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAG
AAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAA
AGGTCAACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAA
GATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAA
GACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAAACATACCACGACCTGC
TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGA
AAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACA
CTGTTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGA
CATACGCACACCCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCT
GAAGAGAAAGAAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGA
AAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGA
CAATCCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAG
AAACTTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCT
AAGGAAGACATCCAGAAGGCAACAGGTTCAGCGGACAGGGAG
ACAGCCTGCAACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCC
GGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTC
GACGAACCTGGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAA
ACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACA
GAAGGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAAATC
GAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAAGCCAGATCCTGAAGG
AACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCT
GTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAAGAGACATGTACGTC

10

20

30

40

50

G A C C A G G A A C T G G A C A T C A A C A G A C T G A G C G A C T A C G A C G
 T C G A C C A C A T C G T C C C G C A G A G C T T C C T G A A G G A C G A C A G
 C A T C G A C A A C A A G G T C C T G A C A A G A A G C G A C A A G A A C A G A
 G G A A A G A G C G A C A A C G T C C C G A G C G A A G A A G T C G T C A A G A
 A G A T G A A G A A C T A C T G G A G A C A G C T G C T G A A C G C A A A G C T
 G A T C A C A C A G A G A A A G T T C G A C A A C C T G A C A A A G G C A G A G
 A G A G G A G G A C T G A G C G A A C T G G A C A A G G C A G G A T T C A T C A
 A G A G A C A G C T G G T C G A A A C A A G A C A G A T C A C A A A G C A C G T
 C G C A C A G A T C C T G G A C A G C A G A A T G A A C A C A A A G T A C G A C
 G A A A A C G A C A A G C T G A T C A G A G A A G T C A A G G T C A T C A C A C
 T G A A G A G C A A G C T G G T C A G C G A C T T C A G A A A G G A C T T C C A
 G T T C T A C A A G G T C A G A G A A A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C A
 C A C G A C G C A T A C C T G A A C G C A G T C G T C G G A A C A G C A C T G A
 T C A A G A A G T A C C C G A A G C T G G A A A G C G A A T T C G T C T A C G G
 A G A C T A C A A G G T C T A C G A C G T C A G A A A G A T G A T C G C A A A G
 A G C G A A C A G G A A A T C G G A A A G G C A A C A G C A A A G T A C T T C T
 T C T A C A G C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C A G A A A T C A C
 A C T G G C A A A C G G A G A A A T C A G A A A G A G A C C G C T G A T C G A A
 A C A A A C G G A G A A A C A G G A G A A A T C G T C T G G G A C A A G G G A A
 G A G A C T T C G C A A C A G T C A G A A A G G T C C T G A G C A T G C C G C A
 G G T C A A C A T C G T C A A G A A G A C A G A A G T C C A G A C A G G A G G A
 T T C A G C A A G G A A A G C A T C C T G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A
 A G C T G A T C G C A A G A A A G A A G G A C T G G G A C C C G A A G A A G T A
 C G G A G G A T T C G A C A G C C C G A C A G T C G C A T A C A G C G T C C T G
 G T C G T C G C A A A G G T C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C T G A
 A G A G C G T C A A G G A A C T G C T G G G A A T C A C A A T C A T G G A A A G
 A A G C A G C T T C G A A A A G A A C C C G A T C G A C T T C C T G G A A G C A
 A A G G G A T A C A A G G A A G T C A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C
 T G C C G A A G T A C A G C C T G T T C G A A C T G G A A A A C G G A A G A A A
 G A G A A T G C T G G C A A G C G C A G G A G A A C T G C A G A A G G G A A A C
 G A A C T G G C A C T G C C G A G C A A G T A C G T C A A C T T C C T G T A C C
 T G G C A A G C C A C T A C G A A A A G C T G A A G G G A A G C C C G G A A G A
 C A A C G A A C A G A A G C A G C T G T T C G T C G A A C A G C A C A A G C A C
 T A C C T G G A C G A A A T C A T C G A A C A G A T C A G C G A A T T C A G C A
 A G A G A G T C A T C C T G G C A G A C G C A A A C C T G G A C A A G G T C C T
 G A G C G C A T A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A T C A G A G A A
 C A G G C A G A A A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C A C T G A C A A A C C
 T G G G A G C A C C G G C A G C A T T C A A G T A C T T C G A C A C A A C A A T
 C G A C A G A A A G A G A T A C A C A A G C A C A A A G G A A G T C C T G G A C
 G C A A C A C T G A T C C A C C A G A G C A T C A C A G G A C T G T A C G A A A
 C A A G A A T C G A C C T G A G C C A G C T G G G A G G A G A C G G A G G A G G
 A A G C C C G A A G A A G A A G A G A A A G G T C T A G c t a g c a c c a g c c
 t c a a g a a c a c c c g a a t g g a g t c t c t a a g c t a c a t a a t a c c
 a a c t t a c a c t t t a c a a a a t g t t g t c c c c c a a a a t g t a g c c
 a t t c g t a t c t g c t c c t a a t a a a a g a a a g t t t c t t c a c a t
 t c t c t c g a g

259

CleanCap (商標) とともに使用するための最初の3個のヌクレオチドとして
 のAGG、XBG由来の5' UTR、配列番号4に対応するORF、Kozak配列、およ
 びXBGの3' UTRを有するCas9転写産物

10

20

30

40

50

AGGaagctcagaataaacgctcaacttttggccggat
ctggccaccCATGGACAAGAAAGTACAGCATCGGACTGGACAT
CGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAA
TACAAGGTCCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACA
CAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACT
GCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTG
AAGAGAACAGCAAGAAGAAAGATACACAAGAAGAAAGAAC
GAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGC
AAAGGTTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGC
TTCCTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGA
TCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAA
GTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTTCGAC
AGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCAC
TGGCACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGA
AGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTG
TTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAG
AAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAAT
CCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAAAC
CTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAAGAAGAACGGACTGT
TCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCCGAA
CTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTG
CAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACC
TGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCT
GGCAGCAAAGAACCCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGAC
ATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCCGCTGA
GCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGA
CCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCG
GAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAAGAACG
GATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGA
ATTCTACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGAC
GGAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACC
TGCTGAGAAAGCAGAGAACATTTCGACAACGGAAGCATCCC
GCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGA
AGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAG
AAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTA
CGTCGGACCCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGG
ATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCCTGGAACT
TCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTT
CATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCCTGCCGAAC
GAAAAGGTCTCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACT
TCACAGTCTACAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTAC
AGAAGGAATGAGAAAGCCGGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAG
AAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAA
AGGTACACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAA
GATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAA
GACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGC
TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGA
AAACGAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCTCTGACACTGACA
CTGTTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGA
CATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTATGAAGCAGCT

10

20

30

40

50

GAAGAGAAGAAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGA
AAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAGA
CAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAG
AAACTTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC
AAGGAAGACATCCAGAAGGCCACAGGTCAGCGGACAGGGAG
ACAGCCTGCAACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCC
GGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAAGACAGTCAAGGTCGTC
GACGAACCTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAA
ACATCGTTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAAACACA
GAAGGGGACAGAAGAACAGCAGAGAGAAAGAATGAAGAGAATC
GAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGG
AACACCCGGTTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCT
GTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTC
GACCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACG
TCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAG
CATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGA
GGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCTGTCAGA
AGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCT
GATCACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCGAGAG
AGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTTCATCA
AGAGACAGCTGGTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGT
CGCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGAC
GAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCATCACAC
TGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCA
GTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCA
CACGACGCATACCTGAACGCAAGTCGTCTGGAACAGCACTGA
TCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTACGG
AGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAG
AGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCT
TCTACAGCAAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCAC
ACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAA
ACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAA
GAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCA
GGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGA
TTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACA
AGCTGATCGCAAAGAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTA
CGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTG
GTCGTCTGCAAAGGTCGAAAAGGGGAAAGAGCAAGAAGCTGA
AGAGCGTCAAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAG
AAGCAGCTTCGAAAAGAACCCTGATCGACTTCCTGGAAGCA
AAGGGATACAAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCGAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAAA
GAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAAC
GAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTCTGTACC
TGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCGGAAGA
CAACGAACAGAAGCAGCTGTTCTGTCTGAACAGCACAAAGCAC
TACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCA
AGAGAGTTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCT
GAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAA
CAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACA AAC

10

20

30

40

50

2 6 0

10

20

30

40

50

AAAGAGCGAAGAAACAATCACACC GTGGAAC TT CGAAGAA
GTCGTCGACAAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAA
GAATGACAAACTTTCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGT
CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTC
TACAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAA
TGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAGAGGC
AATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAACA
GTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAAT
GCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT
CAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATC
ATCAAGGACAAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAAG
ACATCCTGGAAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTCTGA
AGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCA
CACCTGTTTCGACGACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAA
GAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGAT
CAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG
GACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTCTGCAAAACAGAAACTTCA
TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGA
CATCCAGAAGGACACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAGCCTG
CACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA
AGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACT
GGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTC
ATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAAGGGAC
AGAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAAGG
AATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCG
GTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGT
ACTACCTGCAGAACGGAAAGAGACATGTACGTCTGACCAGGA
ACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCTGACCAC
ATCGTCCCAGAGGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGACA
ACAAGGTCTCTGACAAGAAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAG
CGACAACGTTCCCGAGCGAAAGAAAGTCTGTCAGAAAGATGAAG
AACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACAC
AGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCGAGAGAGAGGAGG
ACTGAGCGAACTGGACAAGGCGAGGATTCATCAAGAGACAG
CTGGTCTGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGACACAGA
TCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAGTACGACGAAAACGA
CAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGC
AAGCTGGTCAAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACA
AGGTCAAGAGAAATCAACAACCTACCACACGACACAGACGC
ATACCTGAACGCGAGTCGTCTGGAAACAGCACTGATCAAGAAAG
TACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTACGGAGACTACA
AGGTCTACGACGTCTAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACA
GGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGC
AACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAA
ACGGAGAAATCAGAAAGAGAGACCGCTGATCGAAAACAACGG
AGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAAGAGACTTC
GCAACAGTCAGAAAGGTCTCTGAGCATGCCGCGAGGTCAACA
TCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAA
GGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATC
GCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAAGTACGGAGGAT

10

20

30

40

50

TCGACAGCCCCGACAGTCGCGATACAGCGTCCTGGTCTCGC
AAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTC
AAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCT
TCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTCTGGAAAGCAAAGGGATA
CAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAG
TACAGCCTGTTTCGAACCTGGAAAACGGAAAGAAAGAGAATGC
TGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAACCTGGC
ACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTCTGTACCTGGCAAGC
CACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCCGGAAGACAACGAAC
AGAAGCAGCTGTTCTGTCTGAACAGCACAAGCACTACCTGGA
CGAAATCATTCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAGAGTC
ATCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAAGGTCTCTGAGCGCAT
ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCGAGA
AAACATCATCCACCTGTTTCACTGACAAACCTGGGGAGCA
CCGGCAGCATTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGAA
AGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTCTGGACGCAACACT
GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATC
GACCTGAGCCAGCTGGGAGGGAGACGGAGGGAGGAAGCCCCGA
AGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAG
CATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAGAAAGAAAATGAAG
ATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTCTTTTCTTTTCTGTTGGTGT
AAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAAT
CATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAAT
GGAAAGAACCTCGAG

261

30 / 30 / 39 ポリA配列

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

262

ポリA100配列

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

263

未使用

264

Neisseria meningitidis Cas9をコードするORF

ATGGCAGCATTCAAGCCGAACTCGATCAACTACATC
CTGGGACTGGACATCGGAATCGCATCGGTCTGGATGGGCAA
TGGTCGAAATCGACGAAGAAGAAAACCCGATCAGACTGAT
CGACCTGGGAGTCAAGAGTCTTCGAAAGAGCAGAAAGTCCCG
AAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGACTGGCAA
GATCGGTCTAGAAGACTGACAAGAAGAAGAGCACACAGACT
GCTGAGAACAAAGAAGACTGCTGAAGAGAGAAGGAGTCTTG
CAGGCAGCAAACCTTCGACGAAAACGGACTGATCAAGTCGC
TGCCGAACACACCGTGGCAGCTGAGAGCAGCAGCACTGGA
CAGAAAGCTGACACCGCTGGAATGGTCGGCAGTCTTGCTG
CACCTGATCAAGCACAGAGGATACCTGTCTGCAGAGAAAGA

10

20

30

40

50

ACGAAGGAGAAACAGCAGACAAGGAACTGGGAGCACTGCT
GAAGGGAGTTCGCAGGAAACGCACACGCACTGCAGACAGGA
GACTTTCAGAACACCGGCAGAACTGGCACTGAACAAGTTTCG
AAAAGGAATCGGGACACATCAGAAACCAGAGATCGGACTA
CTCGCACACATTCTCGAGAAAGGACCTGCAGGCAGAACTG
ATCCTGCTGTTTCGAAAAGCAGAAAGGAATTTCGGAAACCCGC
ACGTCTCGGGAGGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCT
GATGACACAGAGACC GGCACTGTCTGGGAGACGCAGTCCAG
AAGATGCTGGGACACTGCACATTCGAACCGGCAGAACCGA
AGGCAGCAAAGAACAACATACACAGCAGAAAGATTTCATCTG
GCTGACAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGGAACAGGGGA
TCGGAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACAACCTGA
TGGACGAACCGGTACAGAAAGTCGAAGCTGACATACGCACA
GGCAAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAAGACACAGCATTTCTTC
AAGGGACTGAGATACGGAAAGGACAAACGCAGAAAGCATCGA
CACTGATGGAAATGAAGGCATACCACGCAATCTCGAGAGC
ACTGGAAAGGAAGGACTGAAGGACAAAGAAGTCGCCGCTG
AACCTGTCTGCCGGAACCTGCAGGACGAAATCGGAACAGCAT
TCTCGCTGTTTCAAGACAGACGAAGACATCACAGGAAGACT
GAAGGACAGAAATCCAGCCGGAAATCCTGGAAGCACTGCTG
AAGCACATCTCGTTTCGACAAGTTTCGTCCAGATCTCGCTGA
AGGCACCTGAGAAGAATCGTCCCGCTGATGGAACAGGGAAA
GAGATACGACGAAGCATGCGCAGAAATCTACGGAGACCAC
TACGGAAAGAAAGAACACAGAAAGAAAAGATCTACCTGCCGC
CGATCCCGGCAGACGAAATCAGAAACCCGGTCGTCTCTGAG
AGCACTGTCTCGCAGGCAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGTC
AGAAGATACGGATCTGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAG
CAAGAGAAAGTCGGAAAGTCGTTCAGGACAGAAAGGAAAT
CGAAAAGAGACAGGAAGAAACAGAAAGGACAGAGAAAAG
GCAGCAGCAAAGTTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTCGTCTG
GAGAACCGAAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTA
CGAACAGCAGCACGGAAAGTGCCTGTACTCGGGAAAGGAA
ATCAACCTGGGAAGACTGAACGAAAAGGGATACGTCTGAAA
TCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAACATGGGACGACTC
GTTCAACAACAAGGTCCTGGTCTCTGGGATCGGAAAACAG
AACAAAGGGAAACAGACACCGGTACGAATACTTCAACGGAA
AGGACAACCTCGAGAGAAATGGCAGGAATTCAAGGCAAGAGT
CGAAACATCGAGATTCCCGAGATCGAAGAAGCAGAGAAATC
CTGCTGCAGAAAGTTTCGACGAAGACGGATTCAAGGAAAGAA
ACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGATTCTCTGTGCCA
GTTCTGTCTGCAGACAGAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAG
AAGAGAGTCTTCGCATCGAACGGACAGATCACAAACCTGC
TGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAAGGTCTAGAGCAGAAAA
CGACAGACACCACGCACTGGACGCAAGTCGTCTGTCTGCATGC
TCGACAGTCGCAATGCAGCAGAAAGATCACAAAGATTCTGTC
GATACAAGGAAATGAACGCATTCTGACGGAAAGACAATCGA
CAAGGAAACAGGAGAAAGTCTCTGCACCAGAAAGACACACTTC
CCGCAGCCGTGGGAATTTCTTCGCACAGGAAGTTCATGATCA
GAGTCTTCGGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAAATTCGAAGA
AGCAGACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAA

10

20

30

40

50

AAGCTGTCGTCGAGACCGGAAGCAGTCCACGAATACGTCA
CACCGCTGTTTCGTCTCGAGAGCACCGAACAGAAAGATGTC
GGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCAAAGAGA
CTGGACGAAGGAGTCTCGGTCCCTGAGAGTCCCGCTGACAC
AGCTGAAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAGAGA
AAGAGAACC GAAGCTGTACGAAGCACTGAAGGCAAGACTG
GAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCATTTCGCAGAAC
CGTTCTACAAGTACGACAAGGCAGGAAACAGAACACAGCA
GGTCAAGGCAGTCAAGAGTCGAACAGGTCCAGAAAGACAGGA
GTCTGGGTCAAGAAACCACAACGGAAATCGCAGACAACGCAA
CAATGGTCAAGAGTAGACGTCTTCGAAAAGGGAGACAAGTA
CTACCTGGTCCCGATCTACTCGTGGCAGGTTCGCAAAGGGA
ATCCTGCCGGACAGAGCAGTCGTCCAGGGAAAGGACGAAG
AAGACTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACTTCAAGTT
CTCGCTGCACCCGAACGACCTGGTTCGAAGTCATCACAAAG
AAGGCAAGAATGTTTCGGATACTTTCGCATCGTGCCACAGAG
GAACAGGAAAACATCAACATCAGAATCCACGACCTGGACCA
CAAGATCGGAAAGAACGGAAATCCTGGAAGGAATCGGGAGTC
AAGACAGCACTGTCTGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAAC
TGGGAAAGGAAATCAGACCGTGCAGACTGAAGAAGAGACC
GCCGGTCAGATCCGGAAAGAGAAACAGCAGACGGATCGGAA
TTCGAATCGCCGAAGAAGAGAGAAAGGTTCGAATGA

265

Neisseria meningitidis Cas9をコードするORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GCAGCATTCAAGCCGAACCTCGATCAACTACATCCTG
GGACTGGACATCGGAATCGCATCGGTCCGGATGGGGCAATGG
TCGAAATCGACGAAGAAGAAAACCCGATCAGACTGATCGA
CCTGGGAGTCAAGAGTCTTCGAAAAGAGCAGAAGTCCCGAAG
ACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGACTGGCAAGAT
CGGTCAAGAAGACTGACAAGAAGAAGAGCACACAGACTGCT
GAGAACAAAGAAGACTGCTGAAGAGAGAAAGGAGTCTGCA
GCAGCAAACCTTCGACGAAAACGGACTGATCAAGTCGCTGC
CGAACACACCCGTGGCAGCTGAGAGCAGCAGCACTGGACAG
AAAGCTGACACCCGCTGGAATGGTTCGGCAGTCCCTGCTGCAC
CTGATCAAGCACAGAGGATACCTGTTCGAGAGAAAGAACG
AAGGAGAAACAGCAGACAAGGAACCTGGGAGCACTGCTGAA
GGGAGTCGCAGGAAACGCACACGCACTGCAGACAGGAGAC
TTCAGAACACCCGGCAGAACTGGCACTGAACAAGTTTCGAAA
AGGAATCGGGACACATCAGAAACCAGAGATCGGACTACTC
GCACACATTCTCGAGAAAGGACCTGCAGGCAGAACTGATC
CTGCTGTTTCGAAAAGCAGAAAGGAATTTCGGAAACCCGCA
TCTCGGGAGGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCTGAT
GACACAGAGACCCGGCACTGTTCGGGAGACGCAGTCCAGAAG
ATGCTGGGACACTGCACATTTCGAACCCGGCAGAACCGAAGG
CAGCAAAGAACACATACACAGCAGAAAGATTCTATCTGGCT
GACAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGGAACAGGGGATCG
GAAAGACCCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACACTGATGG
ACGAACCGGTACAGAAAGTTCGAAGCTGACATACGCACAGGC
AAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAGACACAGCATTCTTCAAG

10

20

30

40

50

GGACTGAGATACGGAAAGGGACAACGCAGAAAGCATCGACAC
TGATGGAAATGAAGGCATACCACGCAATCTCGAGAGCACT
GGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGAAGTCGCCGCTGAAC
CTGTCGCCGGAACCTGCAGGACGAAATCGGAAACAGCATTCT
CGCTGTTCAAGACAGACGAAGACATCACAGGAAAGACTGAA
GGACAGAATCCAGCCGGAAATCCTGGAAGCACTGCTGAAG
CACATCTCGTTTCGACAAGTTTCGTCCAGATCTCGCTGAAGG
CACTGAGAAGAATCGTCCCGCTGATGGAACAGGGGAAAGAG
ATACGACGAAGCATGCGCAGAAATCTACGGAGACCACTAC
GGAAAGAAGAACAACAGAAGAAAAGATCTACCTGCCGCCGA
TCCCGGCAGACGAAATCAGAAACCCGGTCGTCTCTGAGAGC
ACTGTCGCAGGCAAGAAAAGGTCATCAACGGAGTCGTGAGA
AGATACGGATCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCAA
GAGAAGTCGGAAAGTCGTTCAGGACAGAAAGGAAATCGA
AAAGAGACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAGAGAAAAGGCA
GCAGCAAAGTTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTCGTGCGGAG
AACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTACGA
ACAGCAGCACGGAAAGTGCCTGTACTCGGGAAAGGAAATC
AACCTGGGAAGACTGAACGAAAAGGGATACGTGAAATCG
ACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAACATGGGACGACTCGTT
CAACAACAAGGTCCTGGTCCTGGGATCGGAAAACAGAAC
AAGGGAAACCAGACACCGTACGAATACTTCAACGGAAAGG
ACAACCTCGAGAGAATGGCAGGAATTCAAGGCAAGAGTCGA
AACATCGAGATTCCCGAGATCGAAGAAGCAGAGAATCCTG
CTGCAGAAGTTTCGACGAAGACGGATTCAAGGAAAGAAAAC
TGAAACGACACAAGATACGTCAACAGATTCTGTGCCAGTT
CGTCGCAGACAGAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAGAAAG
AGAGTCTTCGCATCGAACGGACAGATCACAAACCTGCTGA
GAGGATTCTGGGGACTGAGAAAGGTCAGAGCAGAAAACGA
CAGACACCACGCACTGGACGCGAGTCGTGTCGTCATGCTCG
ACAGTCGCAATGCAGCAGAAGATCACAAAGATTCTGTGAGAT
ACAAGGAAATGAACGCATTTCGACGGAAAGACAATCGACAA
GGAAACAGGAGAAGTCCTGCACCAGAAGACACACTTCCCG
CAGCCGTGGGAATTCTTTCGCACAGGAAGTCATGATCAGAG
TCTTCGGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAAATTCGAAGAAGC
AGACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAG
CTGTCGTGAGACCGGAAGCAGTCCACGAATACGTACACAC
CGCTGTTCTGTCTCGAGAGCACCGAAACAGAAAGATGTGCGG
ACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCAAAGAGACTG
GACGAAGGAGTCTCGGTCTGAGAGTCCCGCTGACACAGC
TGAAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAGAGAAAG
AGAACCGAAGCTGTACGAAGCACTGAAGGCAAGACTGGAA
GCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCATTTCGCAGAACCGT
TCTACAAGTACGACAAGGCAGGAAACAGAACACAGCAGGT
CAAGGCAGTCAGAGTCGAACAGGTCCAGAAGACAGGAGTC
TGGGTGAGAAACACAACGGAAATCGCAGACAACGCAACAA
TGGTCAGAGTAGACGTCTTCGAAAAGGGAGACAAGTACTA
CCTGGTCCCGATCTACTCGTGGCAGGTGCGCAAAGGGAAATC
CTGCCGGACAGAGCAGTCGTCCAGGGAAAGGACGAAGAAG
ACTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACTTCAAGTTCTC

10

20

30

40

50

GCTGCACCCGAACGACCTGGTCGAAGTCATCACAAAGGAAG
GCAAGAATGTTTCGGATACTTCGCATCGTGCCACAGAGGAA
CAGGAAACATCAACATCAGAATCCACGACCTGGACCACAA
GATCGGAAAGAACGGAATCCTGGAAAGGAATCGGAGTCAAG
ACAGCACTGTCTGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACCTGG
GAAAGGAAATCAGACCGTGCAGACTGAAGAAGAGACCGCC
GGTCAGATCCGGAAAGAGAACAGCAGACGGATCGGAATT
GAATCGCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCGAA

266

配列番号65を含む転写産物 (*Neisseria meningitidis* C
as9をコードする)

GGGAGACCCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTTAAGCT
TGGATCCGCCACCATGGCAGCATTCAAGCCGAACCTCGATC
AACTACATCCTGGGACTGGACATCGGAATCGCATCGGTCTG
GATGGGCAATGGTCGAAATCGACGAAGAAGAAAACCCGAT
CAGACTGATCGACCTGGGAGTCTGAGAGTCTTCGAAAGAGCA
GAAGTCCCGAAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAA
GACTGGCAAGATCGGTCTAGAAAGACTGACAAGAAGAAGAGC
ACACAGACTGCTGAGAAACAAGAAGACTGCTGAAGAGAGAA
GGAGTCTTGCAGGCAGCAAACCTTCGACGAAAACGGACTGA
TCAAGTCGCTGCCGAACACACCCGTGGCAGCTGAGAGCAGC
AGCACTGGACAGAAAGCTGACACCCGCTGGAATGGTCGGCA
GTCCTGCTGCACTGATCAAGCACAGAGGATACCTGTCTGC
AGAGAAAGAAACGAAGGAGAAACAGCAGACAAGGAACCTGGG
AGCACTGCTGAAGGGAGTCTGCAGGAAACGCACACGCACTG
CAGACAGGAGACTTCTAGAAACACCCGGCAGAACTGGCACTGA
ACAAGTTCTGAAAAGGAATCGGGACACATCAGAAACCAGAG
ATCGGACTACTCGCACACATTTCTCGAGAAAGGACCTGTCAG
GCAGAACTGATCCTGCTGTTCTGAAAAGCAGAAAGGAATTCG
GAAACCCGCACTCTCGGGAGGACTGAAGGAAGGAATCGA
AACACTGCTGATGACACAGAGACCCGGCACTGTCGGGAGAC
GCAGTCCAGAAGATGCTGGGACACTGCACATTCGAACCGG
CAGAACCCGAAGGCAGCAAAGAACAACATACACAGCAGAAAG
ATTCATCTGGCTGACAAAGCTGAACAACCTGAGAAATCCTG
GAACAGGGATCGGAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAG
CAACACTGATGGACGAACCGTACAGAAAGTCGAAGCTGAC
ATACGCACAGGCAAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAGACACA
GCATTTCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACAAACGCAG
AAGCATCGACACTGATGGAAATGAAGGCATACCACGCAAT
CTCGAGAGCACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAAGAA
TCGCCGCTGAACCTGTCGCCGGAACCTGCAGGACGAAATCG
GAACAGCATTTCTCGCTGTTCAAGACAGACGAAGACATCAC
AGGAAGACTGAAGGACAGAAATCCAGCCGGAAATCCTGGAA
GCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCTGACAAGTTCTGTCCAGA
TCTCGCTGAAGGCACTGAGAAAGAATCGTCCCGCTGATGGA
ACAGGGAAAGAGATACGACGAAGCATGCGCAGAAATCTAC
GGAGACCACTACGGAAAGAAAGAACACAGAAAGAAAGATCT
ACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGAATCAGAAACCCGGT
CGTCCTGAGAGCACTGTCGCAGGCAAGAAAGGTCATCAAC
GGAGTCGTCAGAAAGATACGGATCGCCGGCAAGAAATCCACA

10

20

30

40

50

TCGAAACAGCAAGAGAAGTTCGGAAAGTTCGTTCAAGGACAG
AAAGGAAATCGAAAAGAGACAGGAAAGAAAACAGAAAGGAC
AGAGAAAAGGCAGCAGCAAAGTTTCAGAGAATACTTCCCGA
ACTTCGTTCGGAGAACCGAAGTTCGAAGGACATCCTGAAGCT
GAGACTGTACGAACAGCAGCACGGAAAGTGCCTGTACTCG
GGAAAGGAAATCAACCTGGGGAAGACTGAACGAAAAGGGAT
ACGTCGAAATCGACCACGCCTGCGTTCCTCGAGAACATG
GGACGACTCGTTCAACAACAAGGTCCTGGTCCTGGGATCG
GAAAACCCAGAACAAAGGGAAACCAGACACCGTACGAATACT
TCAACGGAAAGGACAACCTCGAGAGAATGGCAGGAATTCAA
GGCAAGAGTTCGAAACATCGAGATTCCCGAGATCGAAGAAG
CAGAGAATCCTGCTGCAGAAAGTTTCGACGAAGACGGATTCA
AGGAAAGAAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGATT
CCTGTGCCAGTTTCGTTCGCAGACAGAATGAGACTGACAGGA
AAGGGAAAGAAAGAGAGTCTTCGCATCGAACGGACAGATCA
CAAACCTGCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAAGGTCAG
AGCAGAAAACGACAGACACCAACGCCTGGACGCAGTCGTC
GTCGCATGCTCGACAGTCGCAATGCAGCAGAAGATCACAA
GATTCGTTCAGATACAAGGAAATGAACGCATTTCGACGGAAA
GACAATCGACAAGGAAACAGGAGAAGTCTGCAACCAGAAG
ACACACTTCCCGCAGCCGTGGGAATTCTTCGCACAGGAAG
TCATGATCAGAGTCTTCGGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGA
ATTCGAAGAAGCAGACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTG
CTGGCAGAAAAGCTGTCTCGTCGAGACCGGAAGCAGTCCACG
AATACGTCAACACCGCTGTTTCGTCTCGAGAGCACCGAACAG
AAAGATGTCGGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCG
GCAAAGAGAGCTGGACGAAGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCC
CGCTGACACAGCTGAAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGT
CAACAGAGAAAAGAGAACCAGAAAGCTGTACGAAGCACTGAAG
GCAAGACTGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCAT
TCGCAGAACCGTTCTACAAGTACGACAAAGGCAGGAAACAG
AACACAGCAGGTCAAGGCAGTCAGAGTCGAACAGGTCCAG
AAGACAGGAGTCTGGGTTCAGAAACCACAACGGAAATCGCAG
ACAACGCAACAATGGTTCAGAGTAGACGTCTTCGAAAAGGG
AGACAAGTACTACCTGGTCCCGATCTACTCGTGGCAGGTC
GCAAAGGGGAATCCTGCCGGACAGAGCAGTCGTCCAGGGAA
AGGACGAAGAAGACTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAA
CTTCAAAGTTCTCGCTGCACCCGAAACGACCTGGTTCGAAGTC
ATCACAAAGAAGGCAAGAATGTTTCGGATACTTTCGCATCGT
GCCACAGAGGAACAGGAAACATCAACATCAGAATCCACGA
CCTGGACCAACAAGATCGGAAAGAACGGAAATCCTGGAAAGGA
ATCGGAGTCAAGACAGCACTGTCTGTTCCAGAAGTACCAGA
TCGACGAACCTGGGAAAGGAAATCAGACCGTGCAGACTGAA
GAAGAGACCGCCGGTCAGATCCGGAAAGAGAACAGCAGAC
GGATCGGAATTTCGAATCGCCGAAAGAAAGAGAAAGGTTCG
AATGATAGCTAGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCC
GCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC
TGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGAACCTGGAA
GGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAA
TTGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCATTCTGGG

10

20

30

40

50

GGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA
GACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
267

Neisseria meningitidis Cas9のアミノ酸配列

MAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPI
RLIDLGVRFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRA
HRLRLRTRRLKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTPWQLRAA
ALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELG
ALLKGVAGNAHALQTGDFRTPAELALNKFEEKESGHIRNQR
SDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIE
TLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAER
FIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSCLT
YAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAI
SRALEKEGLKDKKSPNLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDIT
GRLKDRIQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLME
QGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPV
VLRALSQARKVINGVRRRYGSPARIHIETAREVGKSKDR
KEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKL
RLYEQQHGKCLYSGKEINLGRLENEKGYVEIDHALPFSRTW
DDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFK
ARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEEDGFKERNLNDTRYVNR
LCQFVADRMRLTGKGKKRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVR
AENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGK
TIDKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPE
FEEADTLEKLRTLLEAKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNR
KMSGQGHEMETVKSARKRLDEGVSVLRVPLTQLKLKDEK
NMVNREREPKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAEPFYKYDKAGNR
TQQVKAVRVEQVQKTGVWVRNHNGIADNATMVRVDVFEKG
DKYYLVPIIYSWQVAKGILPDRAVVQGGKDEEDWQLIDDSFN
FKFSLHPNDLVEVITKKARMFGYFASCHRG TG NINIRIHD
LDHKIGKNGILEGIGVKTALS FQKYQIDELGKEIRPCRLK
KRPPVRSGKRTADGSEFESPKKKRKVE
268

未使用

269

G502ガイドRNA

mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
270

G509ガイドRNA

mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCCGUCGGUUUUAGAmG
mCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAG
UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC
mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
271

G534ガイドRNA

mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmG

10

20

30

40

50

50

TCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGC
GGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAACAATGTGAGCAAAAG
GCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCT
GGCGTTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCCTGACGAGCATCAC
AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAG
GACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCT
CGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATAC
CTGTCCGCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTC
ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGT
TCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAG
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGT
CCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC
CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGT
GCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACA
CTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC
AGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGC
AAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCA
AGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAGA
TCCTTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAC
GAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAA
AAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAG
TTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTTGGTCT
GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGACCTATCTCAG
CGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCC
CGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCT
GGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCAC
CGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAG
GGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCCTCC
ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTA
GTTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCGCAACGTTGTTGCCATTGC
TACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTTGGTATGGCT
TCATTACAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACAT
GATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGG
TCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTTA
TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTG
TCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTA
CTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCGGCGACCG
AGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGC
CACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATATTGGAAAAACG
TTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTG
AGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGAT
CTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTTCTGGGTGAGC
AAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGG
GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTC
AATATTATTGAAGCATTATATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATA
GGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAAGTGCCACCTGACG
TCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACTATAAAAA
TAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTG

10

20

30

40

50

2 7 3

未使用

2 7 4

CMV-1 5' UTR

CAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGAC
CTCCAT

2 7 5

CMV-2 5' UTR

AGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGG
GAACGG

10

2 7 6

CMV-3 5' UTR

TGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGAC
TCACCG

2 7 7

SV40 NLS

PKKKRKV

2 7 8

例示的なNLS 1

20

LAAKRSRTT

2 7 9

例示的なNLS 2

QAAKRSRTT

2 8 0

例示的なNLS 3

PAPAKRERTT

2 8 1

例示的なNLS 4

QAAKRPRTT

30

2 8 2

例示的なNLS 5

RAAKRPRTT

2 8 3

例示的なNLS 6

AAAKRSWSMAA

2 8 4

例示的なNLS 7

AAAKRVWSMAF

2 8 5

40

例示的なNLS 8

AAAKRSWSMAF

2 8 6

例示的なNLS 9

AAAKRKYFAA

2 8 7

例示的なNLS 10

RAAKRKAFAA

2 8 8

例示的なNLS 11

50

RAAKRK YFAV
289
代替SV40 NLS
PKKKRRV
290
ヌクレオプラスミンNLS
KRPAATKKAGQAKKKK
291
SV40 NLSの例示的なコード配列
CCGAAGAAGAAGAGAAAGGTC 10
292
NLS1の例示的なコード配列
CTGGCAGCAAAGAGAAAGCAGAACAAACA
293
NLS2の例示的なコード配列
CAGGCAGCAAAGAGAAAGCAGAACAAACA
294
NLS3の例示的なコード配列
CCGGCACCCGGCAAAGAGAGAAAGAACAAACA 20
295
NLS4の例示的なコード配列
CAGGCAGCAAAGAGACCAGAACAAACA
296
NLS5の例示的なコード配列
AGAGCAGCAAAGAGACCAGAACAAACA
297
NLS6の例示的なコード配列
GCAGCAGCAAAGAGAAAGCTGGAGCATGGCAGCA
298
NLS7の例示的なコード配列 30
GCAGCAGCAAAGAGAGTCTGGAGCATGGCATTC
299
NLS8の例示的なコード配列
GCAGCAGCAAAGAGAAAGCTGGAGCATGGCATTC
300
NLS9の例示的なコード配列
GCAGCAGCAAAGAGAAAGTACTTCGCAGCA
301
NLS10の例示的なコード配列
AGAGCAGCAAAGAGAAAGGCATTCGCAGCA 40
302
NLS11の例示的なコード配列
AGAGCAGCAAAGAGAAAGTACTTCGCAGTC
303
代替SV40 NLSの例示的なコード配列
CCGAAGAAGAAGAGAAAGGTC
304
例示的なKozak配列
gccgccRccAUGG
305 50

未使用

306

開始コドンおよび終止コドンを有する、表4の長い半減期コドンを使用したC a s 9
O R F

ATGGACAAGAAGTACTCTATCGGTTTGGACATCGGT
ACCAACTCTGTCTGGTTGGGCGGTCATCACCGACGAATACA
AGGTCCCATCTAAGAAGTTCAAGGTCTTGGGTAAACACCGA
CAGACACTCTATCAAGAAGAACTTGATCGGTGCCTTGTTG
TTCGACTCTGGTGAAACCGCCGAAGCCACCAGATTGAAGA
GAACCGCCAGAAAGAAGATACACCAGAAAGAAAGAACAGAAT
CTGCTACTTGCAGAAATCTTCTCTAACGAAATGGCCAAG
GTCGACGACTCTTTCTTCCACAGATTGGAAGAATCTTTCT
TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCAATCTT
CGGTAAACATCGTCGACGAAGTCGCCTACCACGAAAAGTAC
CCAACCATCTACCACTTGAGAAAGAAGTTGGTCGACTCTA
CCGACAAGGCCGACTTGAGATTGATCTACTTGGCCTTGGC
CCACATGATCAAGTTCAGAGGTCACCTTCTTGATCGAAGGT
GACTTGAAACCCAGACAACCTCTGACGTCGACAAGTTGTTCA
TCCAATTGGTCCAAACCTACAACCAATTGTTGGAAGAAAA
CCCAATCAACGCCTCTGGTGTCGACGCCAAGGCCATCTTG
TCTGCCAGATTGTCTAAGAGCAGAAGATTGGAAAACCTTGA
TCGCCCAATTGCCAGGTGAAAAGAAGAACGGTTTGTTCGG
TAACTTGATCGCCTTGTCCTTTGGGTTTGACCCCAAACCTC
AAGTCTAACTTTCGACTTGGCCGAAGACGCCAAGTTGCAAT
TGTCTAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAACCTTGTT
GGCCCAAATCGGTGACCAATACGCCGACTTGTTCTTGGCC
GCCAAGAACTTGTCCTGACGCCATCTTGTTGTCTGACATCT
TGAGAGTCAACACCGAAATCACCAAGGCCCCCATTTGTCTGC
CTCTATGATCAAGAGATACGACGAACACCAACCAAGACTTG
ACCTTGTTGAAGGCCCTTGGTTCAGACAACAATTGCCAGAAA
AGTACAAGGAAATCTTCTTTCGACCAATCTAAGAACGGTTA
CGCCGGTTACATCGACGGTGGTGCTCTCAAGAAGAATTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCAATCTTGGAAAAGATGGACGGTA
CCGAAGAATTGTTGGTCAAGTTGAACAGAGAAGACTTGTT
GAGAAAGCAAAGAACCTTCGACAACGGTTCTATCCACAC
CAAATCCACTTGGGTGAATTGCACGCCATCTTGAGAAGAC
AAGAAGACTTCTACCCATTCTTGAAAGGACAACAGAGAAAA
GATCGAAAAGATCTTGACCTTCAGAATCCCATACTACGTC
GGTCCATTGGCCAGAGGTAACAGCAGATTTCGCCTGGATGA
CCAGAAAGTCTGAAGAAACCATCACCCCATGGAACTTCGA
AGAAGTCGTCGACAAGGGTGCTCTGCCCAATCTTTATC
GAAAGAATGACCAACTTCGACAAGAACTTGCCAAACGAAA
AGGTCTTGCCAAAGCACTCTTTGTTGTACGAATACTTCAC
CGTCTACAACGAATTGACCAAGGTCAAGTACGTCACCGAA
GGTATGAGAAAGCCAGCCTTCTTGTCCTGGTGAACAAAAGA
AGGCCATCGTCGACTTGTTGTTCAAGACCAACAGAAAGGT
CACCGTCAAGCAATTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATC
GAATGCTTCGACTCTGTGCAAAATCTCTGGTGTGGAAGACA
GATTCAACGCCTCTTTGGGTACCTACCACGACTTGTTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTTGGACAACGAAGAAAAAC

10

20

30

40

50

GAAGACATCTTGGAAGACATCGTCTTGACCTTGACCTTGT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGATTGAAGACCTA
CGCCCACTTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAATTGAAG
AGAAGAAGATACACCGGTTGGGGTAGATTGAGCAGAAAGT
TGATCAACGGTATCAGAGACAAGCAATCTGGTAAGACCAT
CTTGGACTTCTTGAAGTCTGACGGTTTCGCCAACAGAAAC
TTCATGCAATTGATCCACGACGACTCTTTGACCTTCAAGG
AAGACATCCAAAAGGCCCAAGTCTCTGGTCAAGGTGACTC
TTTGCACGAACACATCGCCAACTTGGCCGGTTCTCCAGCC
ATCAAGAAGGGTATCTTGCAAACCGTCAAGGTCTGTCGACG
AATTGGTCAAGGTCATGGGTAGACACAAGCCAGAAAACAT
CGTCATCGAAATGGCCAGAGAAACCAAAACCCCAAAG
GGTCAAAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAG
AAGGTATCAAGGAATTGGGTCTCAAATCTTGAAGGAACA
CCCAGTCGAAAACACCCCAATTGCAAAACGAAAAGTTGTAC
TTGTACTACTTGCAAACCGGTAGAGACATGTACGTCGACC
AAGAATTGGACATCAACAGATTGTCTGACTACGACGTCGA
CCACATCGTCCCACAATCTTTCTTGAAGGACGACTCTATC
GACAACAAGGTCTTGACCAGATCTGACAAGAACAGAGGTA
AGTCTGACAACGTCCCATCTGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT
GAAGAACTACTGGAGACAATTGTTGAACGCCAAGTTGATC
ACCCAAAGAAAGTTTCGACAACCTTGACCAAGGCCGAAAGAG
GTGGTTTGTCTGAATTGGACAAGGCCGGTTTTCATCAAGAG
ACAATTGGTTCGAAACCAGACAATCACCAAGCACGTCGCC
CAAATCTTGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAAA
ACGACAAGTTGATCAGAGAAGTCAAGGTCTCACCTTGAA
GTCTAAGTTGGTCTCTGACTTTCAGAAAGGACTTCCAATTC
TACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCAAGCCACG
ACGCCCTACTTGAAACGCCGTCTGTCGGTACCGCCTTGATCAA
GAAGTACCCAAAGTTGGAATCTGAATTCTGTCCTACGGTGAC
TACAAGGTCCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCCAAGTCTG
AACAAAGAAATCGGTAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CTCTAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAAATCACCTTG
GCCAACGGTGAAATCAGAAAGAGACCATTGATCGAAACCA
ACGGTGAAACCGGTGAAATCGTCTGGGACAAGGGTAGAGA
CTTCGCCACCGTCAAGAAAGGTCTTGTCTATGCCACAAGTC
AACATCGTCAAGAAGACCGAAGTCCAAACCGGTGGTTTCT
CTAAGGAATCTATCTTGCCAAAGAGAAACTCTGACAAGTT
GATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCAAAGAAGTACGGT
GGTTTTCGACTCTCCAACCGTCGCCTACTCTGTCTTGGTCTG
TCGCCAAGGTCGAAAAGGGTAAGTCTAAGAAGTTGAAGTC
TGTCAAAGGAATTGTTGGGTATCACCATCATGGAAAGATCT
TCTTTCGAAAAGAACCCCAATCGACTTCTTGGAAAGCCAAGG
GTTACAAGGAAGTCAAGAAGGACTTGATCATCAAGTTGCC
AAAGTACTCTTTGTTTCGAATTGGAAAACGGTAGAAAGAGA
ATGTTGGCCTCTGCCGGTGAAATTGCAAAAGGGTAACGAAT
TGGCCTTGCCATCTAAGTACGTCAACTTCTTGTACTTGGC
CTCTCACTACGAAAAGTTGAAGGGTTCTCCAGAAAGACAAC
GAACAAAAGCAATTGTTTCGTGCAACAACAAGCACTACT
TGGACGAATCATCGAACAAATCTCTGAATTCTCTAAGAG

10

20

30

40

50

AGTCATCTTGGCCGACGCCAACTTGGACAAGGTCTTGTCT
GCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCCAATCAGAGAACAAAG
CCGAAAACATCATCCACTTGTTCACCTTGACCAACTTGGG
TGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGAC
AGAAAGAGATACACCTCTACCAAGGAAGTCTTGGACGCCA
CCTTGATCCACCAATCTATCACCGGTTTGTACGAAACCAG
AATCGACTTGTCTCAATTGGGTGGTGACGGTGGTGGTTCT
CCAAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAA

307

開始コドンおよび終止コドンを有する、表4のUリッチコドンを使用したCas9
ORF

ATGGATAAAAAAATATTCTATTGGTTTAGATATTGGT
ACTAATTCTGTTGGTTGGGCTGTTATTACTGATGAATATA
AAGTTCCTTCTAAAAAATTTAAAGTTTTAGGTAATACTGA
TCGTCATTCTATTAAAAAAATTTAATTGGTGCTTTATTA
TTTGATTCTGGTGAAACTGCTGAAGCTACTCGTTTTAAAC
GTACTGCTCGTCGTCGTTATACTCGTCGTAAAAATCGTAT
TTGTTATTTACAAGAAATTTTTTTCTAATGAAATGGCTAAA
GTTGATGATTCTTTTTTTTCATCGTTTTAGAAGAATCTTTTT
TAGTTGAAGAAGATAAAAAACATGAACGTCATCCTATTTTT
TGGTAATATTGTTGATGAAGTTGCTTATCATGAAAAATAT
CCTACTATTTATCATTTTACGTAAAAAATTAGTTGATTCTA
CTGATAAAGCTGATTTTACGTTTTAATTTATTTAGCTTTAGC
TCATATGATTAAATTTTCGTGGTCATTTTTTTAATTGAAGGT
GATTTAAATCCTGATAATTCTGATGTTGATAAATTTATTTA
TTCAATTAGTTCAAACCTTATAATCAATTATTTGAAGAAAA
TCCTATTAAATGCTTCTGGTGTTGATGCTAAAGCTATTTTTA
TCTGCTCGTTTTATCTAAATCTCGTCGTTTTAGAAAAATTTAA
TTGCTCAATTACCTGGTGAAAAAATAATGGTTTTATTTGG
TAATTTTAATTGCTTTTATCTTTAGGTTTTAACTCCTAATTTT
AAATCTAATTTTTGATTTAGCTGAAGATGCTAAATTTACAAT
TATCTAAAGATACTTATGATGATGATTTAGATAAATTTATT
AGCTCAAATTGGTGATCAATATGCTGATTTATTTTTTAGCT
GCTAAAAAATTTATCTGATGCTATTTTTATTATCTGATATTT
TACGTGTTAATACTGAAATTAATAAGCTCCTTTTATCTGC
TTCTATGATTAAACGTTATGATGAACATCATCAAGATTTA
ACTTTATTAAAAAGCTTTTAGTTTCGTCAACAATTACCTGAAA
AATATAAAGAAATTTTTTTTTTGATCAATCTAAAAAATGGTTA
TGCTGGTTATATTGATGGTGGTGCTTCTCAAGAAGAATTT
TATAAATTTATTAAACCTATTTTAGAAAAAATGGATGGTA
CTGAAGAATTATTAGTTAAATTTAAATCGTGAAGATTTATT
ACGTAAACAACGTACTTTTGATAAATGGTTCTATTCCTCAT
CAAATTCATTTAGGTGAATTACATGCTATTTTTACGTCGTC
AAGAAGATTTTTTATCCTTTTTTTTAAAGATAATCGTGAAAA
AATTGAAAAAATTTTAACTTTTCGTATTCCTTATTATGTT
GGTCCTTTAGCTCGTGGTAATTCTCGTTTTTGCTTGGATGA
CTCGTAAATCTGAAGAACTATTACTCCTTGGAAATTTTGA
AGAAGTTGTTGATAAAGGTGCTTCTGCTCAATCTTTTTATT
GAACGTATGACTAATTTTTGATAAAAAATTTACCTAATGAAA
AAGTTTTTACCTAAACATTCCTTTATTATATGAATATTTTAC

10

20

30

40

50

TGTTTATAAATGAATTAACTAAAGTTAAATATGTTACTGAA
GGTATGCGTAAACCTGCTTTTTTTATCTGGTGAACAAAAAA
AAGCTATTGTTGATTTATTATTTAAAACATAATCGTAAAGT
TACTGTTAAACAATTAAAAGAAGATTATTTTAAAAAAATT
GAATGTTTTTGATTCTGTTGAAATTTCTGGTGTGGAAGATC
GTTTTTAATGCTTCTTTAGGTACTTATCATGATTTATTAAA
AATTATTAAAGATAAAGATTTTTTTTAGATAATGAAGAAAAT
GAAGATATTTTGAAGATATTGTTTTTAACTTTAACTTTTAT
TTGAAGATCGTGAAATGATTGAAGAACGTTTTAAAAACTTA
TGCTCATTTTATTTGATGATAAAGTTATGAAACAATTAAAA
CGTCGTCGTTATACTGGTTGGGGTCGTTTTATCTCGTAAAT
TAATTAATGGTATTCGTGATAAACAACTCTGGTAAAACTAT
TTTAGATTTTTTTAAAATCTGATGGTTTTTGCTAATCGTAAT
TTTATGCAATTAAATTCATGATGATTCTTTAACTTTTAAAG
AAGATATTCAAAAAGCTCAAGTTTTCTGGTCAAGGTGATTC
TTTACATGAACATATTGCTAATTTAGCTGGTTCTCCTGCT
ATTAAAAAAGGTATTTTTACAAACTGTTAAAGTTGTTGATG
AATTAGTTAAAGTTATGGGTCGTCAATAAACCTGAAAATAT
TGTTATTGAAATGGCTCGTGAAAAATCAAACCTACTCAAAAA
GGTCAAAAAAATTCTCGTGAAACGTATGAAACGTATTGAAG
AAGGTATTAAAGAATTAGGTTCTCAAATTTTTAAAGAACA
TCCTGTTGAAAATACTCAATTACAAAATGAAAAAATTATAT
TTATATTATTTACAAAATGGTTCGTGATATGTATGTTGATC
AAGAATTAGATATTAAATCGTTTTATCTGATTATGATGTTGA
TCATATTGTTCTCAATCTTTTTTTTAAAAGATGATTCTATT
GATAATAAAGTTTTTAACTCGTTCTGATAAAAATCGTGGTA
AATCTGATAAATGTTCTTCTGAAGAAGTTGTTAAAAAAAT
GAAAAATTATTGGCGTCAATTATTAAATGCTAAATTAAAT
ACTCAACGTAAATTTGATAAATTTAACTAAAGCTGAACGTG
GTGGTTTTATCTGAATTAGATAAAGCTGGTTTTTATTAAACG
TCAATTAGTTGAAACTCGTCAAATTACTAAACATGTTGCT
CAAATTTTTAGATTCTCGTATGAATACTAAATATGATGAAA
ATGATAAATTAATTCGTGAAGTTAAAGTTATTACTTTAAA
ATCTAAATTAGTTTTCTGATTTTTCTGTAAGATTTTTCAATTT
TATAAAGTTTCGTGAAATTAAATAATTATCATCATGCTCATG
ATGCTTATTTAAATGCTGTTGTTGGTACTGCTTTTAATTAA
AAAAATATCCTAAATTAGAATCTGAATTTGTTTTATGGTGAT
TATAAAGTTTATGATGTTTCGTAAAATGATTGCTAAATCTG
AACAAAGAAATTGGTAAAGCTACTGCTAAATATTTTTTTTTTA
TTCTAATATTATGAATTTTTTTTTTAAAACCTGAAATTACTTTA
GCTAATGGTGAAATTCTGTAAACGTCCTTTAATTGAAACTA
ATGGTGAAACTGGTGAAATTGTTTTGGGATAAAGGTCGTGA
TTTTTGCTACTGTTCTGTAAAGTTTTTATCTATGCCTCAAGTT
AATATTGTTAAAAAAACTGAAGTTCAAACCTGGTGGTTTTTT
CTAAAGAATCTATTTTACCTAAACGTAAATCTGATAAATT
AATTGCTCGTAAAAAAGATTGGGATCCTAAAAAATATGGT
GGTTTTGATTCTCCTACTGTTGCTTATTCTGTTTTAGTTG
TTGCTAAAGTTGAAAAAGGTAAATCTAAAAAATTAATAATC
TGTTAAAGAATTATTAGGTATTACTATTATGGAACGTTCT
TCTTTTGAAAAAATCCTATTGATTTTTTTAGAAGCTAAAG

10

20

30

40

50

GTTATAAAGAAGTTAAAAAAGATTTAATTATTAAATTACC
 TAAATATTCTTTATTTGAATTAGAAAATGGTCGTAAACGT
 ATGTTAGCTTCTGCTGGTGAATTACAAAAAGGTAATGAAT
 TAGCTTTACCTTCTAAATATGTTAATTTTTTTATATTTAGC
 TTCTCATTTATGAAAAATTAAAAAGGTTCTCCTGAAGATAAT
 GAACAAAAACAATTATTTGTTGAACAACATAAACATTATT
 TAGATGAAATTATTGAACAATTTCTGAATTTTCTAAACG
 TGTTATTTTAGCTGATGCTAATTTAGATAAAGTTTTATCT
 GCTTATAATAAACATCGTGATAAACCTATTCGTGAACAAG
 CTGAAAATATTATTCAATTTATTTACTTTAACTAATTTAGG
 TGCTCCTGCTGCTTTTAAATATTTTGATACTACTATTGAT
 CGTAAACGTTATACTTCTACTAAAGAAGTTTTAGATGCTA
 CTTTAATTCATCAATCTATTACTGGTTTATATGAAACTCG
 TATTGATTTATCTCAATTAGGTGGTGATGGTGGTGGTTCT
 CCTAAAAAAAACGTAAAGTTTGA

308

開始コドンおよび終止コドンを含む、表4の低Gコドンを使用したCas9 ORF

ATGGACAAAAAATACTCCATCGGCCTCGACATCGGC
 ACCAACTCCGTCGGCTGGGCGGTCATCACCGACGAATACA
 AAGTCCCTCCAAAAAATTCAAAGTCCTCGGCAACACCGA
 CAGACACTCCATCAAAAAAACCCTCATCGGCGCCCTCCTC
 TTCGACTCCGGCGAAACCGCGCGAAGCCACCAGACTCAAAA
 GAACCGCCAGAAAGATACACCAGAAAGAAAAAACAGAAAT
 CTGCTACCTCCAAGAAATCTTCTCCAACGAAATGGCCAAA
 GTCGACGACTCCTTCTTCCACAGACTCGAAGAATCCTTCC
 TCGTCGAAGAAGACAAAAAACAGAAAGACACCCCATCTT
 CGGCAACATCGTCGACGAAGTCGCCTACCAAGAAAAATAC
 CCCACCATCTACCACTCAGAAAAAAACTCGTCGACTCCA
 CCGACAAAGCCGACCTCAGACTCATCTACCTCGCCCTCGC
 CCACATGATCAAATTCAGAGGCCACTTCTCATCGAAGGC
 GACCTCAACCCCGACAACTCCGACGTCGACAAACTCTTCA
 TCCAACCTCGTCCAACCTACAACCAACTCTTCAAGAAAA
 CCCCATCAACGCCTCCGGCGGTCGACGCCAAAGCCATCCTC
 TCCGCCAGACTCTCCAATTCAGAAAGACTCGAAAAACCTCA
 TCGCCCAACTCCCCGGCGAAAAAAACGGCCTCTTCGG
 CAACCTCATCGCCCTCTCCCTCGGCCTCACCCCAACTTC
 AAATCCAACCTTCGACCTCGCCGAAGACGCCAAACTCCAAC
 TCTCCAAGACACCTACGACGACGACCTCGACAACTCCT
 CGCCCAAAATCGGCGACCAATACGCCGACCTCTTCTCGCC
 GCCAAAAACCTCTCCGACGCCATCCTCCTCTCCGACATCC
 TCAGAGTCAACACCGAAATCACCAAAGCCCCCTCTCCGC
 CTCCATGATCAAAGATACGACGAACACCAACCAAGACCTC
 ACCCTCCTCAAAGCCCTCGTCAGACAAACAACCTCCCCGAAA
 AATACAAAGAAATCTTCTTCGACCAATCAAAAAACGGCTA
 CGCCGGGCTACATCGACGGCGGGCGCCTCCCAAGAAAGAAATTC
 TACAAATTCAACAACCCATCCTCGAAAAAATGGACGGCA
 CCGAAGAACTCCTCGTCAAACCTCAACAGAGAAGACCTCCT
 CAGAAAAACAAGAACCTTCGACAAACGGCTCCATCCCCAC
 CAAATCCACCTCGGCGAACTCCACGCCATCCTCAGAAAGAC
 AAGAAGACTTCTACCCCTTCTCCTCAAAGACAAACAGAGAAA

10

20

30

40

50

AATCGAAAAAATCCTCACCTTCAGAATCCCCCTACTACGTC
GGCCCCCTCGCCAGAGGCAACTCCAGATTGCGCTGGATGA
CCAGAAAAATCCGAAGAAACCATCACCCCTGGAACTTCGA
AGAAGTCGTGACAAAGGCGCCTCCGCCCAATCCTTCAATC
GAAAGAATGACCAACTTCGACAAAAAACCTCCCCAACGAAA
AAGTCCTCCCCAACACTCCCTCCTCTACGAATACTTCAC
CGTCTACAACGAACCTCACCAAGTCAAATACGTCAACGAA
GGCATGAGAAAAACCCGCTTCTCTCCGGCGAACAAAAAA
AAGCCATCGTCGACCTCCTCTTCAAACCAACAGAAAAGT
CACCGTCAAACAACCTCAAAGAAGACTACTTCAAAAAAATC
GAATGCTTCGACTCCGTGGAATCTCCGGCGTCGAAGACA
GATTCAACGCCTCCCTCGGGACCTACCACGACCTCCTCAA
AATCATCAAAGACAAAGACTTCTCGACAAACGAAGAAAAC
GAAGACATCCTCGAAGACATCGTCCCTCACCTCACCTCT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTCAAAACCTA
CGCCACCTCTTCGACGACAAAGTCAATGAACAACCTCAAA
AGAAGAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTCTCCAGAAAAC
TCATCAACGGCATCAGAGACAAACAATCCGGCAAAACCAT
CCTCGACTTCTCTCAAATCCGACGGCTTCGCCAACAGAAAC
TTCATGCAACTCATCCACGACGACTCCCTCACCTTCAAAG
AAGACATCCAAAAAGCCCAAGTCTCCGGCCAAGGCGACTC
CCTCCACGAACACATCGCCAACCTCGCCGGCTCCCCCGCC
ATCAAAAAAAGGCATCCTCCAAACCGTCAAAGTCGTGACG
AACTCGTCAAAGTCATGGGCAGACACAAACCCGAAAACAT
CGTCATCGAAATGGCCAGAGAAAACCAAAACCAACCAAAAA
GGCCAAAAAAACTCCAGAGAAAGAATGAAAAGAATCGAAG
AAGGCATCAAAGAACTCGGGCTCCCAAATCCTCAAAGAAC
CCCCGTGCAAAAACACCCAACTCCAAAACGAAAAAACTCTAC
CTCTACTACCTCCAAAACGGGCAGAGACATGTACGTGACCC
AAGAACTCGACATCAACAGACTCTCCGACTACGACGTGCA
CCACATCGTCCCCCAATCCTTCTCTCAAAGACGACTCCATC
GACAACAAAGTCCTCACCCAGATCCGACAAAAACAGAGGCA
AATCCGACAAACGTCCCTCCGAAGAAGTCGTCAAAAAAAT
GAAAAAACTACTGGAGACAACCTCCTCAACGCCAAACTCATC
ACCCAAAGAAAAATTGACAAACCTCACCAAGCCGAAAGAG
GCGGCCTCTCCGAACCTCGACAAAGCCGGCTTCATCAAAG
ACAACTCGTCGAAACCAGACAAATCACCAAAACACGTGCGC
CAAATCCTCGACTCCAGAAATGAACACCAAAATACGACGAAA
ACGACAAACTCATCAGAGAAGTCAAAGTCATCACCTCAA
ATCCAAACTCGTCTCCGACTTCAGAAAAGACTTCCAATT
TACAAAGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCAACGCCACG
ACGCCTACCTCAACGCCGTGTCGGCACCGCCCTCATCAA
AAAATACCCCAAACCTCGAATCCGAATTCTGTCTACGGCGAC
TACAAAGTCTACGACGTGAGAAAAAATGATCGCCAAATCCG
AACAAAGAAATCGGCAAGGCCACCGCCAAATACTTCTTCTA
CTCCAACATCATGAACCTTCTTCAAACCGAAATCACCTC
GCCAACGGCGAAATCAGAAAAAGACCCCTCATCGAAACCA
ACGGCGAAACCGGCGAAATCGTCTGGGACAAAGGCGAGAGA
CTTCGCCACCGTCAGAAAAGTCTCTCATGCCCAAGTCA
AACATCGTCAAAAAAACCGAAGTCCAAACCGGCGGGCTTCT

10

20

30

40

50

CCAAAGAATCCATCCTCCCCAAAAGAAACTCCGACAAACT
CATCGCCAGAAAAAAGACTGGGACCCCAAAAAATACGGC
GGCTTCGACTCCCCACCGTCGCCTACTCCGTCCTCGTCG
TCGCCAAAGTCGAAAAAGGCCAAATCCAAAAAACTCAAATC
CGTCAAAGAAGCTCCTCGGCATCACCATCATGGAAAGATCC
TCCTTCGAAAAAAACCCCATCGACTTCCTCGAAGCCAAAG
GCTACAAAGAAGTCAAAAAAGACCTCATCATCAAACTCCC
CAAATACTCCCTCTTCGAACTCGAAAAACGGCAGAAAAAGA
ATGCTCGCCTCCGCCGGCGAACTCCAAAAAGGCCAACGAAC
TCGCCCTCCCCCTCCAAATACGTCAAACTTCCTCTACCTCGC
CTCCCACCTACGAAAAACTCAAAGGCTCCCCCGAAGACAAC
GAACAAAAACAAGCTCTTCGTGGAACAACAACAACACTACC
TCGACGAAATCATCGAACAAATCTCCGAATTCTCCAAAAG
AGTCATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTCTCC
GCCTACAACAACAACAGAGACAACCCATCAGAGAACAAAG
CCGAAAAACATCATCCACCTCTTCACCCCTCACCACCTCGG
CGCCCCCGCCGCTTCAAATACTTCGACACCACCATCGAC
AGAAAAAGATACACCTCCACCAAAGAAGTCCTCGACGCCA
CCCTCATCCACCAATCCATCACCGGCCTCTACGAAACCAG
AATCGACCTCTCCCAACTCGGCGGGCGACGGCGGGCTCC
CCCAAAAAAAGAAAGTCTGA

10

20

309

開始コドンおよび終止コドンを有する、表4の低Cコドンを使用したCas9 ORF

ATGGATAAGAAGTATAGTATTGGATTGGATATTGGA
ACAAATAGTGTGGGATGGGCTGTGATTACAGATGAGTATA
AGGTGCCTAGTAAGAAGTTTAAGGTGTTGGGAAATACAGA
TAGACATAGTATTAAGAAGAATTTGATTGGAGCTTTGTTG
TTTGATAGTGGAGAGACAGCTGAGGCTACAAGATTGAAGA
GAACAGCTAGAAGAAGATATACAAGAAGAAGAATAGAAT
TTGTTATTTGTCAGGAGATTTTGTAGTAATGAGATGGCTAAG
GTGGATGATAGTTTTTTTCATAGATTGGAGGAGAGTTTTT
TGGTGGAGGAGGATAAGAAGCATGAGAGACATCCTATTTT
TGGAAATATTGTGGATGAGGTGGCTTATCATGAGAAGTAT
CCTACAATTTATCATTTTGAGAAAGAAGTTGGTGGATAGTA
CAGATAAGGCTGATTTTGAGATTGATTTATTTGGCTTTGGC
TCATATGATTAAAGTTTAGAGGACATTTTTTTGATTGAGGGA
GATTTGAATCCTGATAATAGTGATGTGGATAAGTTGTTTA
TTCAGTTGGTGCAGACATATAATCAGTTGTTTGAGGAGAA
TCCTATTTAATGCTAGTGGAGTGGATGCTAAGGCTATTTTG
AGTGCTAGATTGAGTAAGAGTAGAAGATTGGAGAATTTGA
TTGCTCAGTTGCCTGGAGAGAAAGAAGAATGGATTGTTTGG
AAATTTGATTGCTTTGAGTTTGGGATTGACACCTAATTTT
AAGAGTAATTTTGAATTTGGCTGAGGATGCTAAGTTGCAGT
TGAGTAAGGATACATATGATGATGATTTGGATAATTTGTT
GGCTCAGATTGGAGATCAGTATGCTGATTTGTTTTTGGCT
GCTAAGAATTTGAGTGATGCTATTTTGTGAGTGATATTT
TGAGAGTGAATACAGAGATTACAAAGGCTCCTTTGAGTGC
TAGTATGATTAAAGAGATATGATGAGCATCATCAGGATTTG
ACATTTGTTGAAGGCTTTGGTGAGACAGCAGTTGCCTGAGA
AGTATAAGGAGATTTTTTTTGTATCAGAGTAAGAATGGATA

30

40

50

TGCTGGATATATTGATGGAGGAGCTAGTCAGGAGGAGTTT
TATAAGTTTATTAAAGCCTATTTTGGAGAAGATGGATGGAA
CAGAGGAGTTGTTGGTGAAGTTGAATAGAGAGGATTTGTT
GAGAAAGCAGAGAACATTTGATAATGGAAGTATTCCTCAT
CAGATTTCATTTGGGAGAGTTGCGATGCTATTTTGGAGAAGAC
AGGAGGATTTTTTATCCTTTTTTTGAAGGATAATAGAGAGAA
GATTGAGAAGATTTTGCATTTTAGAATTCCTTATTATGTG
GGACCTTTGGCTAGAGGAAATAGTAGATTTGCTTGGATGA
CAAGAAAGAGTGAGGAGACAATTACACCTTGGAAATTTTGA
GGAGGTGGTGGATAAGGGAGCTAGTGCTCAGAGTTTTTATT
GAGAGAATGACAAATTTTGTATAAGAATTTGCCTAATGAGA
AGGTGTTGCCATAAGCATAGTTTTGTTGTATGAGTATTTTAC
AGTGTATAATGAGTTGACAAAGGTGAAGTATGTGACAGAG
GGAATGAGAAAGCCTGCTTTTTTTGAGTGGAGAGCAGAAAG
AGGCTATTGTGGATTTGTTGTTTAAAGACAAATAGAAAGGT
GACAGTGAAGCAGTTGAAGGAGGATTATTTTAAAGAAGATT
GAGTGTTTTGTAGTGTGGAGATTAGTGGAGTGGAGGATA
GATTTAATGCTAGTTTGGGAACATATCATGATTTGTTGAA
GATTATTAAGGATAAGGATTTTTTTGGATAATGAGGAGAAT
GAGGATATTTTGGAGGATATTGTGTTGACATTGACATTGT
TTGAGGATAGAGAGATGATTGAGGAGAGATTGAAGACATA
TGCTCATTTGTTTGTATGATAAGGTGATGAAGCAGTTGAAG
AGAAGAAGATATACAGGATGGGGAAAGATTGAGTAGAAAGT
TGATTAATGGAATTAGAGATAAGCAGAGTGGAAAGACAAT
TTTGGATTTTTTTGAAGAGTGATGGATTTGCTAATAGAAAT
TTTATGCAGTTGATTTCATGATGATAGTTTGACATTTAAGG
AGGATATTCAGAAGGCTCAGGTGAGTGGACAGGGAGATAG
TTTGCATGAGCATATTGCTAATTTGGCTGGAAGTCTCTGCT
ATTAAGAAGGGAATTTTTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGATG
AGTTGGTGAAGGTGATGGGAAGACATAAGCCTGAGAATAT
TGTGATTGAGATGGCTAGAGAGAATCAGACAAACACAGAAG
GGACAGAAGAATAGTAGAGAGAGAATGAAGAGAATTGAGG
AGGGAATTAAGGAGTTGGGAAGTCAAGATTTTGAAGGAGCA
TCCTGTGGAGAATACACAGTTGCGAGAATGAGAAGTTGTAT
TTGTATTATTTGCAGAATGGAAGAGATATGTATGTGGATC
AGGAGTTGGATATTAATAGATTGAGTGATTATGATGTGGA
TCATATTGTGCCCTCAGAGTTTTTTTTGAAGGATGATAGTATT
GATAATAAGGTGTTGACAAGAAGTGATAAGAATAGAGGAA
AGAGTGATAATGTGCCCTAGTGAGGAGGTGGTGAAGAAGAT
GAAGAATTATTGGAGACAGTTGTTGAATGCTAAGTTGATT
ACACAGAGAAAGTTTTGATAATTTGACAAAGGCTGAGAGAG
GAGGATTGAGTGAGTTGGATAAGGCTGGATTTATTAAGAG
ACAGTTGGTGGAGACAAGACAGATTACAAAGCATGTGGCT
CAGATTTTGGATAGTAGAATGAATACAAAGTATGATGAGA
ATGATAAGTTGATTAGAGAGGTGAAGGTGATTACATTGAA
GAGTAAGTTGGTGAAGTGAATTTTAGAAAGGATTTTTCAGTTT
TATAAGGTGAGAGAGATTAATAATTATCATCATGCTCATG
ATGCTTATTTGAATGCTGTGGTGGGAACAGCTTTGATTAA
GAAGTATCCTAAGTTGGAGAGTGAGTTTGTGTATGGAGAT
TATAAGGTGTATGATGTGAGAAAGATGATTGCTAAGAGTG

10

20

30

40

50

AGCAGGAGATTGGAAAGGCTACAGCTAAGTATTTTTTTTAA
TAGTAATATTATGAATTTTTTTTAAAGACAGAGATTACATTG
GCTAATGGAGAGATTAGAAAGAGACCCTTTGATTGAGACAA
ATGGAGAGACAGGAGAGATTGTGTGGGATAAGGGGAAGAGA
TTTTTGCTACAGTGAGAAAGGTGTTGAGTATGCCTCAGGTG
AATATTGTGAAGAAGACAGAGGTGCAGACAGGAGGATTTA
GTAAGGAGAGTATTTTGCCTAAGAGAAATAGTGATAAGTT
GATTGCTAGAAAGAAGGATTGGGATCCTAAGAAGTATGGA
GGATTTGATAGTCCTACAGTGGCTTATAGTGTGTTGGTGG
TGGCTAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGTAAGAAGTTGAAGAG
TGTGAAGGAGTTGTTGGGAATTACAATTATGGAGAGAAGT
AGTTTTTGAGAAGAATCCTATTGATTTTTTTGGAGGCTAAGG
GATATAAGGAGGTGAAGAAGGATTTGATTATTAAGTTGCC
TAAGTATAGTTTTGTTTGAGTTGGAGAATGGAAGAAAGAGA
ATGTTGGCTAGTGCTGGAGAGTTGCAGAAGGGAAATGAGT
TGGCTTTGCCCTAGTAAGTATGTGAATTTTTTTGTATTTGGC
TAGTCATTATGAGAAGTTGAAGGGAAAGTCCTGAGGATAAT
GAGCAGAAGCAGTTGTTTGTGGAGCAGCATAAGCATTATT
TGGATGAGATTATTGAGCAGATTAGTGAGTTTAGTAAGAG
AGTGATTTTTGGCTGATGCTAATTTGGATAAGGTGTTGAGT
GCTTATAATAAGCATAGAGATAAGCCTATTAGAGAGCAGG
CTGAGAATATTATTCATTTTGTTTTACATTGACAAATTTGGG
AGCTCCTGCTGCTTTTTAAGTATTTTTGATACAACAATTGAT
AGAAAGAGATATACAAGTACAAGGAGGTGTTGGATGCTA
CATTGATTTCATCAGAGTATTACAGGATTGTATGAGACAAG
AATTGATTTGAGTCAGTTGGGAGGAGATGGAGGAGGAAGT
CCTAAGAAGAAGAGAAAGGTGTGA

310

開始コドンおよび終止コドンを有する、表4の低Aコドンを使用したCas9 ORF

ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGC
ACCAACTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACA
AGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGA
CCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG
TTCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC
GGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGAT
CTGCTACCTGCAAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAG
GTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCCTTCC
TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTT
CGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTAC
CCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCA
CCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGC
CCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGC
GACCTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAA
CCCCATCAACGCCTCCGGCGGTGGACGCCAAGGCCATCCTG
TCCGCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCTGA
TCGCCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAGCGGCCTGTTCCG
CAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCCTGACCCCAACTTC
AAGTCCAACCTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGC
TGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT

10

20

30

40

50

GGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCC
GCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCC
TGCGGGGTGAACACCGAGATCACCAGGCCCCCTGTCCGC
CTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACCAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTT
TACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCGGATCCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACTCCCGGTTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCTGGGAACCTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCTTTCATC
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCA
CGTGTAACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATC
GAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACC
GGTTCAACGCCTCCCTGGGCACTTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCTGACCTGT
TCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCAT
CCTGGACTTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCCAAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGGCTCCCCCGCC
ATCAAGAAGGGGCATCCTGCAGACC GTGAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAGGTGATGGGCGGCAACAAGCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAAGACCACCCAGAAG
GGCCAGAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGA
CCACATCGTGC CCCAGTCTTCTTGAAGGACGACTCCATC
GACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCA
AGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGAT
GAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC
ACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGG
GCGGCCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCG
GCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGA

10

20

30

40

50

A C G A C A A G C T G A T C C G G G A G G T G A A G G T G A T C A C C C T G A A
 G T C C A A G C T G G T G T C C G A C T T C C G G A A G G A C T T C C A G T T C
 T A C A A G G T G C G G G A G A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C C C A C G
 A C G C C T A C C T G A A C G C C G T G G T G G G C A C C G C C C T G A T C A A
 G A A G T A C C C C A A G C T G G A G T C C G A G T T C G T G T A C G G C G A C
 T A C A A G G T G T A C G A C G T G C G G A A G A T G A T C G C C A A G T C C G
 A G C A G G A G A T C G G C A A G G C C A C C G C C A A G T A C T T C T T C T A
 C T C C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C C G A G A T C A C C C T G
 G C C A A C G G C G A G A T C C G G A A G C G G C C C C T G A T C G A G A C C A
 A C G G C G A G A C C G G C G A G A T C G T G T G G G A C A A G G G C C G G G A
 C T T C G C C A C C G T G C G G A A G G T G C T G T C C A T G C C C C A G G T G
 A A C A T C G T G A A G A A G A C C G A G G T G C A G A C C G G C G G C T T C T
 C C A A G G A G T C C A T C C T G C C C A A G C G G A A C T C C G A C A A G C T
 G A T C G C C C G G A A G A A G G A C T G G G A C C C C A A G A A G T A C G G C
 G G C T T C G A C T C C C C C A C C G T G G C C T A C T C C G T G C T G G T G G
 T G G C C A A G G T G G A G A A G G G C A A G T C C A A G A A G C T G A A G T C
 C G T G A A G G A G C T G C T G G G C A T C A C C A T C A T G G A G C G G T C C
 T C C T T C G A G A A G A A C C C C A T C G A C T T C C T G G A G G C C A A G G
 G C T A C A A G G A G G T G A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C
 C A A G T A C T C C C T G T T C G A G C T G G A G A A C G G C C G G A A G C G G
 A T G C T G G C C T C C G C C G G C G A G C T G C A G A A G G G C A A C G A G C
 T G G C C C T G C C C T C C A A G T A C G T G A A C T T C C T G T A C C T G G C
 C T C C C A C T A C G A G A A G C T G A A G G G C T C C C C C G A G G A C A A C
 G A G C A G A A G C A G C T G T T C G T G G A G C A G C A C A A G C A C T A C C
 T G G A C G A G A T C A T C G A G C A G A T C T C C G A G T T C T C C A A G C G
 G G T G A T C C T G G C C G A C G C C A A C C T G G A C A A G G T G C T G T C C
 G C C T A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A T C C G G G A G C A G G
 C C G A G A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C C C T G A C C A A C C T G G G
 C G C C C C C G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C
 C G G A A G C G G T A C A C C T C C A C C A A G G A G G T G C T G G A C G C C A
 C C C T G A T C C A C C A G T C C A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C C C G
 G A T C G A C C T G T C C C A G C T G G G C G G C G A C G G C G G C G G C T C C
 C C C A A G A A G A A G C G G A A G G T G T G A

10

20

30

3 1 1

開始および終止コドンを含む、表4の低A/Uコドンを使用したCas9 ORF

A T G G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G C C T G G A C A T C G G C
 A C C A A C A G C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A
 A G G T G C C C A G C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A
 C C G G C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G
 T T C G A C A G C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C
 G G A C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T
 C T G C T A C C T G C A G G A G A T C T T C A G C A A C G A G A T G G C C A A G
 G T G G A C G A C A G C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G A G C T T C C
 T G G T G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T
 C G G C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A G A A G T A C
 C C C A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C A G C A
 C C G A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C
 C C A C A T G A T C A A G T T C C G G G G C C A C T T C C T G A T C G A G G G C
 G A C C T G A A C C C C G A C A A C A G C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A
 T C C A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A A

40

50

CCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG
AGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGA
TCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAAGAACGGCCTGTTCTGG
CAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGGCCTGACCCCCAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCC
GCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCC
TGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGC
CAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACCAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCGGATCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATC
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAC
CGTGTAACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAAG
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATC
GAGTGCTTCGACAGCGTGAGGATCAGCGGCGTGAGGAGACC
GGTTCAACGCCAGCCTGGGGCACCTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCTGACCTGT
TCGAGGACC GGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCCAAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCC
ATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACC GTGAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAGGTGATGGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCAGACCACCCAGAAAG
GGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGCATCAAGGAGCTGGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGGCCGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGA
CCACATCGTGCCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCA

10

20

30

40

50

A G A G C G A C A A C G T G C C C A G C G A G G A G G T G G T G A A G A A G A T
 G A A G A A C T A C T G G C G G C A G C T G C T G A A C G C C A A G C T G A T C
 A C C C A G C G G A A G T T C G A C A A C C T G A C C A A G G C C G A G C G G G
 G C G G C C T G A G C G A G C T G G A C A A G G C C G G C T T C A T C A A G C G
 G C A G C T G G T G G A G A C C C G G C A G A T C A C C A A G C A C G T G G C C
 C A G A T C C T G G A C A G C C G G A T G A A C A C C A A G T A C G A C G A G A
 A C G A C A A G C T G A T C C G G G A G G T G A A G G T G A T C A C C C T G A A
 G A G C A A G C T G G T G A G C G A C T T C C G G A A G G A C T T C C A G T T C
 T A C A A G G T G C G G G A G A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C C C A C G
 A C G C C T A C C T G A A C G C C G T G G T G G G C A C C G C C C T G A T C A A
 G A A G T A C C C C A A G C T G G A G A G C G A G T T C G T G T A C G G C G A C
 T A C A A G G T G T A C G A C G T G C G G A A G A T G A T C G C C A A G A G C G
 A G C A G G A G A T C G G C A A G G C C A C C G C C A A G T A C T T C T T C T A
 C A G C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C C G A G A T C A C C C T G
 G C C A A C G G C G A G A T C C G G A A G C G G C C C C T G A T C G A G A C C A
 A C G G C G A G A C C G G C G A G A T C G T G T G G G A C A A G G G C C G G G A
 C T T C G C C A C C G T G C G G A A G G T G C T G A G C A T G C C C C A G G T G
 A A C A T C G T G A A G A A G A C C G A G G T G C A G A C C G G C G G C T T C A
 G C A A G G A G A G C A T C C T G C C C A A G C G G A A C A G C G A C A A G C T
 G A T C G C C C G G A A G A A G G A C T G G G A C C C C A A G A A G T A C G G C
 G G C T T C G A C A G C C C C A C C G T G G C C T A C A G C G T G C T G G T G G
 T G G C C A A G G T G G A G A A G G G C A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G
 C G T G A A G G A G C T G C T G G G C A T C A C C A T C A T G G A G C G G A G C
 A G C T T C G A G A A G A A C C C C A T C G A C T T C C T G G A G G C C A A G G
 G C T A C A A G G A G G T G A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C
 C A A G T A C A G C C T G T T C G A G C T G G A G A A C G G C C G G A A G C G G
 A T G C T G G C C A G C G C C G G C G A G C T G C A G A A G G G C A A C G A G C
 T G G C C C T G C C C A G C A A G T A C G T G A A C T T C C T G T A C C T G G C
 C A G C C A C T A C G A G A A G C T G A A G G G C A G C C C C G A G G A C A A C
 G A G C A G A A G C A G C T G T T C G T G G A G C A G C A C A A G C A C T A C C
 T G G A C G A G A T C A T C G A G C A G A T C A G C G A G T T C A G C A A G C G
 G G T G A T C C T G G C C G A C G C C A A C C T G G A C A A G G T G C T G A G C
 G C C T A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A T C C G G G A G C A G G
 C C G A G A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C C C T G A C C A A C C T G G G
 C G C C C C C G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C
 C G G A A G C G G T A C A C C A G C A C C A A G G A G G T G C T G G A C G C C A
 C C C T G A T C C A C C A G A G C A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C C C G
 G A T C G A C C T G A G C C A G C T G G G C G G C G A C G G C G G C G G C A G C
 C C C A A G A A G A A G C G G A A G G T G T G A

3 1 2

2つのC末端NLS配列、ならびに開始および終止コドンを含む、表4の低Aコドンを使用したCas9 ORF

A T G G A C A A G A A G T A C T C C A T C G G C C T G G A C A T C G G C
 A C C A A C T C C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A
 A G G T G C C C T C C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A
 C C G G C A C T C C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G
 T T C G A C T C C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C
 G G A C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T
 C T G C T A C C T G C A G G A G A T C T T C T C C A A C G A G A T G G C C A A G
 G T G G A C G A C T C C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G T C C T T C C

TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTT
CGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTAC
CCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCA
CCGACAAGGCCGACCTGCGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGC
CCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCTGATCGAGGGC
GACCTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAA
CCCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG
TCCGCCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGGCGGCTGGAGAACCTGA
TCGCCCCAGCTGCCCGGCGAGAAAGAAACGGCCCTGTTTCGG
CAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGGCTGACCCCCCAACTTC
AAGTCCAACCTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGC
TGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCC
GCCAAGAACCTGTCCGACGCCCATCCTGCTGTCCGACATCC
TGCGGGGTGAAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGTCCGC
CTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACCAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACTCCC GGTTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAAGTCTTTCATC
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCAC
CGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCGCCTTCTCTGTCCGGCGAGCAGAAAG
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC
GAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGAGGAGACC
GGTTCAACGCCTCCCTGGGCGACCTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCTGACCTGT
TCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGGCGGTACACCGGGCTGGGGCCGGGCTGTCCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGGCAAGACCAT
CCTGGACTTCTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACC GGAAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCCAAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGGCTCCCCCGCC
ATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAGGTGATGGGCGGGCACAAGCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCAACCAGAAAG

10

20

30

40

50

GGCCAGAAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGGCATCAAGGAGCTGGGGCTCCCAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGGCCGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACC GGCTGTCCGACTACGACGTGGA
CCACATCGTGGCCCCAGTCCCTTCTTGAAGGACGACTCCATC
GACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCA
AGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGAT
GAAGAACTACTGGCGGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC
ACCCAGCGGGAAGTTGACACAACCTGACCAAGGCCCGAGCGGG
GCGGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTTCATCAAGCG
GCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGA
ACGACAAGCTGATCCGGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAA
GTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTT
TACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAAGCCACG
ACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAA
GAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTGTACGGCGAC
TACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCG
AGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CTCCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCTG
GCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGGCCCCCTGATCGAGACCA
ACGGCGGAGACCGGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGA
CTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGGTG
AACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGGCTTCT
CCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACCTCCGACAAGCT
GATCGCCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGC
GGCTTCGACTCCCCCACCGTGCGCCTACTCCGTGCTGGTGG
TGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTC
CGTGAAGGAGCTGCTGGGGCATCACCATCATGGAGCGGGTCC
TCCTTCGAGAAGAACCACATCGACTTCTTGGAGGCCAAGG
GCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
CAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGG
ATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGC
TGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGC
CTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAAC
GAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCG
GGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCC
GCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGG
CCGAGAACATCATCACCTGTTTCAACCCTGACCAACCTGGG
CGCCCCCGCCGCCCTTCAAGTACTTTCGACACCAACCATCGAC
CGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCA
CCCTGATCCACCAAGTCCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCG
GATCGACCTGTCCAGCTGGGGCGGCGACGGCTCCGGGCTCC
CCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCTCCCCCAAGAAGA
AGCGGAAGGTGGACTCCGGGCTGA

10

20

30

40

313

開始コドンおよび終止コドンを有する、表4の低Aコドンを使用したCas9ニッカーゼORF

50

ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGCCATCGGC
ACCAACTCCGTGGGCTGGGCGGTGATCACCGACGAGTACA
AGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGA
CCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG
TTCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC
GGACCGCCCGGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGAT
CTGCTACCTGCAAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAG
GTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCTTTCC
TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTT
CGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCAACGAGAAGTAC
CCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCA
CCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGC
CCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCTGATCGAGGGC
GACCTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAA
CCCCATCAACGCCTCCGGCGGTGGACGCCAAGGCCATCCTG
TCCGCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCTGA
TCGCCCCAGCTGCCCGGCGAGAAAGAAGAACGGCCTGTTCCG
CAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCCTGACCCCCAACTTC
AAGTCCAACCTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGC
TGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCC
GCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCC
TGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGTCCGC
CTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACTCCCGGTTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCTTTCATC
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCAC
CGTGTAACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCGCCTTCTCTGTCCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC
GAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACC
GGTTCAACGCCTCCCTGGGGCACCTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCCTGACCCCTGT
TCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGC

10

20

30

40

50

TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCAT
CCTGGACTTCTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCCCGCC
ATCAAGAAGGGGCATCCTGCAGACC GTGAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAGGTGATGGGCGGGCACAAGCCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAACCCAGACCACCCAGAAG
GGCCAGAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCCGAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACAACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGA
CCACATCGTGGCCCCAGTCTTCTCTGAAGGACGACTCCATC
GACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCCGGGGCA
AGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGAT
GAAGAAGTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC
ACCCAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGG
GCGGCCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCG
GCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGA
ACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAA
GTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTTC
TACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAAGCCACG
ACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAA
GAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTGTACGGCGAC
TACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCG
AGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CTCCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTG
GCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGGCCCCCTGATCGAGACCA
ACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGA
CTTCGCCACCGTGCAGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTG
AACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGGCTTCT
CCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACCTCCGACAAGCT
GATCGCCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGC
GGCTTCGACTCCCCCACCGTGGCCCTACTCCGTGCTGGTGG
TGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTC
CGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCC
TCCTTCGAGAAGAACCACATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGG
GCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
CAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGG
ATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGC
TGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGC
CTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAAC
GAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCG
GGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCC
GCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGG
CCGAGAACATCATCACCTGTTCAACCCTGACCAACCTGGG
CGCCCCCGCCGCCCTTCAAGTACTTTCGACACCACCATCGAC

10

20

30

40

50

CGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCA
CCCTGATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCCG
GATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGCTCC
CCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA

314

開始および終止コドンを含、NLSを有しない、表4の低Aコドンを使用したCas9ニックーゼORF

ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCGCTGGCCATCGGC
ACCAACTCCGTGGGCTGGGCGCGTGATCACCGACGAGTACA
AGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGA
CCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGGCCCTGCTG
TTCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGGCCACCCGGCTGAAGC
GGACCGCCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGAT
CTGCTACCTGCAAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAAG
GTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCTTCTC
TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTT
CGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCAACGAGAAGTAC
CCCAACCATCTACCACTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCA
CCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGC
CCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCTGATCGAGGGC
GACCTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAA
CCCCATCAACGCCTCCGGCGGTGGACGCCAAGGCCATCCTG
TCCGCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCCTGA
TCGCCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCCGG
CAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCGCTGACCCCCCAACTTC
AAGTCCAACCTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGC
TGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCC
GCCAAGAACCCTGTCCGACGCCCATCCTGCTGTCCGACATCC
TGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGTCCGC
CTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTTCGACCAAGTCCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACC GGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACTCCCCGGTTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCCCTGGAACTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCTTTCATC
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTTCAC
CGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCCGCCTTCTCTGTCCGGCGAGCAGAAAG
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACC GGAAGGT
GACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC

10

20

30

40

50

GAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACC
GGTTCAACGCCTCCCTGGGGCACCTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGT
TCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCAT
CCTGGACTTCTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC
TTCATGCAAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCCCGCC
ATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACC GTGAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAAGGTGATGGGCCGGGACAAGCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCAGACCACCCAGAAG
GGCCAGAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCCAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACC GGCTGTCCGACTACGACGTGGA
CCACATCGTGC C C C CAGTCTTCTCTGAAGGACGACTCCATC
GACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCA
AGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGAT
GAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC
ACCCAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGG
GCGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCG
GCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGA
ACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAA
GTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTTC
TACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAAGCCACG
ACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAA
GAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTGTACGGCGAC
TACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCG
AGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CTCCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTG
GCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCA
ACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGA
CTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGGTG
AACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGGCTTCT
CCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGCT
GATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGC
GGCTTCGACTCCCCCACCGTGCCCTACTCCGTGCTGGTGG
TGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTC
CGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCC
TCCTTCGAGAAGAACC C C C C C C A T C G A C T T C C T G G A G G C C A A G G
GCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
CAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAAGCGG
ATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGC
TGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAAC T T C C T G T A C C T G G C

10

20

30

40

50

CTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAAC
GAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCG
GGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCC
GCCTACAACAAGCACCCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGG
CCGAGAACATCATCCACCTGTTCAACCCTGACCAACCTGGG
CGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTTCGACACCACCATCGAC
CGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCA
CCCTGATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCCG
GATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGGCGACTGA

10

315

2つのC末端NLS配列、ならびに開始および終止コドンを含む、表4の低Aコドンを使用したCas9ニックーゼORF

ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGGCCTGGCCATCGGGC
ACCAACTCCGTGGGCTGGGCGCGTGATCACCGACGAGTACA
AGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGA
CCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG
TTCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC
GGACCGCCCGGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGAT
CTGCTACCTGCGAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAG
GTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCTTCC
TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTT
CGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTAC
CCCACCATCTACCACTGCGGGAAGAAGCTGGTGGACTCCA
CCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGC
CCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCTGATCGAGGGC
GACCTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAA
CCCCATCAACGCCTCCGGCGGTGGACGCCAAGGCCATCCTG
TCCGCCCGGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCTGA
TCGCCCAAGCTGCCCGGCGAGAAAGAAGAACGGCCTGTTCCG
CAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCTGACCCCCCAACTTC
AAGTCCAACCTTCGACCTGGCCCGAGGACGCCAAGCTGCAGC
TGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCC
GCCAAGAACCTGTCCGACGCCCATCTGCTGTCCGACATCC
TGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGTCCGC
CTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCTCCAGGAGGAGTTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCCATCTGGAGAAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCTGCGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCGGGGCAACTCCCGGTTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCTGGGAACCTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAAGTCTTTCATC

20

30

40

50

GAGCGGATGACCAACTTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCAC
CGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCCTGTCCGGCGAGCAGAAAG
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC
GAGTGCTTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGAGGACC
GGTTCAACGCCTCCCTGGGACCTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCCCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGTGACCCCTGACCCCTGT
TCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGGCAAGACCAT
CCTGGACTTCCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCCAAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGGCCGGCTCCCCCGCC
ATCAAGAAGGGGCATCCTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAAGGTGATGGGCCGGGACAAGCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCAGACCACCCAGAAG
GGCCAGAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGCATCAAGGAGCTGGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGA
CCACATCGTGCCCCAGTCCCTTCCCTGAAGGACGACTCCATC
GACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCA
AGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGAT
GAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC
ACCCAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGG
GCGGCCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTTCATCAAGCG
GCAGCTGGTGGAGACCCGGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGA
ACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAA
GTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTT
TACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAACGCCACG
ACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCAACCGCCCTGATCAA
GAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTGTACGGCGAC
TACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCG
AGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CTCCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTG
GCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGGCCCTGATCGAGACCA
ACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGA
CTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTG
AACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCT
CCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACCTCCGACAAGCT
GATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGC
GGCTTCGACTCCCCCACCGTGCGCTACTCCGTGCTGGTGG
TGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTC

10

20

30

40

50

CGTGAAGGAGCTGCTGGGCGATCACCATCATGGAGCGGTCC
TCCTTCGAGAAGAACCCTCGACTTCCTGGAGGCCAAGG
GCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
CAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGG
ATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAAGAGGGCAACGAGC
TGGCCCTGCCCCTCCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGC
CTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAAC
GAGCAGAAGCAGCTGTTTCGTGGAGCAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCG
GGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCC
GCCTACAACAAGCACCCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGG
CCGAGAACATCATCCACCTGTTTACCCCTGACCAACCTGGG
CGCCCCCGCCGCCCTTCAAGTACTTTCGACACCACCATCGAC
CGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCA
CCCTGATCCACCAAGTCCATCACCCGGCCTGTACGAGACCCG
GATCGACCTGTCCCAGCTGGGGCGGCGACGGCTCCGGGCTCC
CCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCTCCCCCAAGAAGA
AGCGGAAGGTGGACTCCGGGCTGA

316

開始コドンおよび終止コドンを有する、表4の低Aコドンを使用したdCas9 ORF

ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGGCCTGGCCATCGGC
ACCAACTCCGTGGGCTGGGGCCGTGATCACCGACGAGTACA
AGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGA
CCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG
TTCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGGCCACCCGGCTGAAGC
GGACCGCCCCGGCGGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGAT
CTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAAG
GTGGACGACTCCTTCTTCCACCCGGCTGGAGGAGTCTTCC
TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTT
CGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTAC
CCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCA
CCGACAAGGCCGACCTGCGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGC
CCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGC
GACCTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTTTCGAGGAGAA
CCCCATCAACGCCCTCCGGCGGTGGACGCCAAGGCCATCCTG
TCCGCCCGGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGGCTGGAGAACCTGA
TCGCCCAGCTGCCCGGGCGAGAAGAAGAAGCGGCCTGTTCCGG
CAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGGCTGACCCCCCAACTTC
AAGTCCAACCTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGC
TGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCCCAAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCC
GCCAAGAACCCTGTCCGACGCCCATCCTGCTGTCCGACATCC
TGCGGGTGAACACCGAGATACCAAGGCCCCCCCTGTCCGC
CTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACCAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTTCGACCAAGTCCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCA

10

20

30

40

50

CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCGCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACTCCCCGGTTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCTTGGAACTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCCCTTCATC
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTTCAC
CGTGTAACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCCGCCTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAAG
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC
GAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGAGGAGACC
GGTTCAACGCCTCCCTGGGGCACCTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCTGACCTGT
TCGAGGAGCCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCAT
CCTGGACTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCCCGCC
ATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAGGTGATGGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCAACCAGAA
GGCCAGAAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGCATCAAGGAGCTGGGGCTCCCAAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGA
CGCCATCGTGCCCCAGTCCCTTCCTGAAGGACGACTCCATC
GACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCAGGGGCA
AGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGAT
GAAGAAGTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC
ACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGG
GCGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCG
GCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGA
ACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAA
GTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCGGAAGGACTTCCAGTTTC
TACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAAGCCACG
ACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAA
GAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGAC
TACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCG
AGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CTCCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCTG

10

20

30

40

50

G C C A A C G G C G A G A T C C G G A A G C G G C C C C T G A T C G A G A C C A
A C G G C G A G A C C G G C G A G A T C G T G T G G G A C A A G G G C C G G G A
C T T C G C C A C C G T G C G G A A G G T G C T G T C C A T G C C C C A G G T G
A A C A T C G T G A A G A A G A C C G A G G T G C A G A C C G G C G G C T T C T
C C A A G G A G T C C A T C C T G C C C A A G C G G A A C T C C G A C A A G C T
G A T C G C C C G G A A G A A G G A C T G G G A C C C C A A G A A G T A C G G C
G G C T T C G A C T C C C C C A C C G T G G C C T A C T C C G T G C T G G T G G
T G G C C A A G G T G G A G A A G G G C A A G T C C A A G A A G C T G A A G T C
C G T G A A G G A G C T G C T G G G C A T C A C C A T C A T G G A G C G G T C C
T C C T T C G A G A A G A A C C C C A T C G A C T T C C T G G A G G C C A A G G
G C T A C A A G G A G G T G A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C
C A A G T A C T C C C T G T T C G A G C T G G A G A A C G G C C G G A A G C G G
A T G C T G G C C T C C G C C G G C G A G C T G C A G A A G G G C A A C G A G C
T G G C C C T G C C C T C C A A G T A C G T G A A C T T C C T G T A C C T G G C
C T C C C A C T A C G A G A A G C T G A A G G G C T C C C C C G A G G A C A A C
G A G C A G A A G C A G C T G T T C G T G G A G C A G C A C A A G C A C T A C C
T G G A C G A G A T C A T C G A G C A G A T C T C C G A G T T C T C C A A G C G
G G T G A T C C T G G C C G A C G C C A A C C T G G A C A A G G T G C T G T C C
G C C T A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A T C C G G G A G C A G G
C C G A G A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C C C T G A C C A A C C T G G G
C G C C C C G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C
C G G A A G C G G T A C A C C T C C A C C A A G G A G G T G C T G G A C G C C A
C C C T G A T C C A C C A G T C C A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C C C G
G A T C G A C C T G T C C C A G C T G G G C G G C G A C G G C G G C G G C T C C
C C C A A G A A G A A G C G G A A G G T G T G A

317

開始および終止コドン有し、NLSを有しない、表4の低Aコドンを使用したdC
as9 ORF

A T G G A C A A G A A G T A C T C C A T C G G C C T G G C C A T C G G C
A C C A A C T C C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A
A G G T G C C C T C C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A
C C G G C A C T C C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G
T T C G A C T C C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C
G G A C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T
C T G C T A C C T G C A G G A G A T C T T C T C C A A C G A G A T G G C C A A G
G T G G A C G A C T C C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G T C C T T C C
T G G T G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T
C G G C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A G A A G T A C
C C C A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C T C C A
C C G A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C
C C A C A T G A T C A A G T T C C G G G G C C A C T T C C T G A T C G A G G G C
G A C C T G A A C C C C G A C A A C T C C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A
T C C A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A A
C C C C A T C A A C G C C T C C G G C G T G G A C G C C A A G G C C A T C C T G
T C C G C C C G G C T G T C C A A G T C C C G G C G G C T G G A G A A C C T G A
T C G C C C A G C T G C C C G G C G A G A A G A A G A A C G G C C T G T T C G G
C A A C C T G A T C G C C C T G T C C C T G G G C C T G A C C C C C A A C T T C
A A G T C C A A C T T C G A C C T G G C C G A G G A C G C C A A G C T G C A G C
T G T C C A A G G A C A C C T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T
G G C C C A G A T C G G C G A C C A G T A C G C C G A C C T G T T C C T G G C C

10

20

30

40

50

G C C A A G A A C C T G T C C G A C G C C A T C C T G C T G T C C G A C A T C C
T G C G G G T G A A C A C C G A G A T C A C C A A G G C C C C C T G T C C G C
C T C C A T G A T C A A G C G G T A C G A C G A G C A C C A C C A G G A C C T G
A C C C T G C T G A A G G C C C T G G T G C G G C A G C A G C T G C C C G A G A
A G T A C A A G G A G A T C T T C T T C G A C C A G T C C A A G A A C G G C T A
C G C C G G C T A C A T C G A C G G C G G C G C C T C C C A G G A G G A G T T C
T A C A A G T T C A T C A A G C C C A T C C T G G A G A A G A T G G A C G G C A
C C G A G G A G C T G C T G G T G A A G C T G A A C C G G G A G G A C C T G C T
G C G G A A G C A G C G G A C C T T C G A C A A C G G C T C C A T C C C C C A C
C A G A T C C A C C T G G G C G A G C T G C A C G C C A T C C T G C G G C G G C
A G G A G G A C T T C T A C C C C T T C C T G A A G G A C A A C C G G G A G A A
G A T C G A G A A G A T C C T G A C C T T C C G G A T C C C C T A C T A C G T G
G G C C C C C T G G C C C G G G G C A A C T C C C G G T T C G C C T G G A T G A
C C C G G A A G T C C G A G G A G A C C A T C A C C C C C T G G A A C T T C G A
G G A G G T G G T G G A C A A G G G C G C C T C C G C C C A G T C C T T C A T C
G A G C G G A T G A C C A A C T T C G A C A A G A A C C T G C C C A A C G A G A
A G G T G C T G C C C A A G C A C T C C C T G C T G T A C G A G T A C T T C A C
C G T G T A C A A C G A G C T G A C C A A G G T G A A G T A C G T G A C C G A G
G G C A T G C G G A A G C C C G C C T T C C T G T C C G G C G A G C A G A A G A
A G G C C A T C G T G G A C C T G C T G T T C A A G A C C A A C C G G A A G G T
G A C C G T G A A G C A G C T G A A G G A G G A C T A C T T C A A G A A G A T C
G A G T G C T T C G A C T C C G T G G A G A T C T C C G G C G T G G A G G A C C
G G T T C A A C G C C T C C C T G G G C A C C T A C C A C G A C C T G C T G A A
G A T C A T C A A G G A C A A G G A C T T C C T G G A C A A C G A G G A G A A C
G A G G A C A T C C T G G A G G A C A T C G T G C T G A C C C T G A C C C T G T
T C G A G G A C C G G G A G A T G A T C G A G G A G C G G C T G A A G A C C T A
C G C C C A C C T G T T C G A C G A C A A G G T G A T G A A G C A G C T G A A G
C G G C G G C G G T A C A C C G G C T G G G G C C G G C T G T C C C G G A A G C
T G A T C A A C G G C A T C C G G G A C A A G C A G T C C G G C A A G A C C A T
C C T G G A C T T C C T G A A G T C C G A C G G C T T C G C C A A C C G G A A C
T T C A T G C A G C T G A T C C A C G A C G A C T C C C T G A C C T T C A A G G
A G G A C A T C C A G A A G G C C C A G G T G T C C G G C C A G G G C G A C T C
C C T G C A C G A G C A C A T C G C C A A C C T G G C C G G C T C C C C C G C C
A T C A A G A A G G G C A T C C T G C A G A C C G T G A A G G T G G T G G A C G
A G C T G G T G A A G G T G A T G G G C C G G C A C A A G C C C G A G A A C A T
C G T G A T C G A G A T G G C C C G G G A G A A C C A G A C C A C C C A G A A G
G G C C A G A A G A A C T C C C G G G A G C G G A T G A A G C G G A T C G A G G
A G G G C A T C A A G G A G C T G G G C T C C C A G A T C C T G A A G G A G C A
C C C C G T G G A G A A C A C C C A G C T G C A G A A C G A G A A G C T G T A C
C T G T A C T A C C T G C A G A A C G G C C G G G A C A T G T A C G T G G A C C
A G G A G C T G G A C A T C A A C C G G C T G T C C G A C T A C G A C G T G G A
C G C C A T C G T G C C C C A G T C C T T C C T G A A G G A C G A C T C C A T C
G A C A A C A A G G T G C T G A C C C G G T C C G A C A A G A A C C G G G G C A
A G T C C G A C A A C G T G C C C T C C G A G G A G G T G G T G A A G A A G A T
G A A G A A C T A C T G G C G G C A G C T G C T G A A C G C C A A G C T G A T C
A C C C A G C G G A A G T T C G A C A A C C T G A C C A A G G C C G A G C G G G
G C G G C C T G T C C G A G C T G G A C A A G G C C G G C T T C A T C A A G C G
G C A G C T G G T G G A G A C C C G G C A G A T C A C C A A G C A C G T G G C C
C A G A T C C T G G A C T C C C G G A T G A A C A C C A A G T A C G A C G A G A
A C G A C A A G C T G A T C C G G G A G G T G A A G G T G A T C A C C C T G A A

10

20

30

40

50

GTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTTC
 TACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAAGCCACG
 ACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAA
 GAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGAC
 TACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCG
 AGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
 CTCCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCTTG
 GCCAACGCGGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCA
 ACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGA
 CTTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTG
 AACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGTCAGACCGGCGGCTTCT
 CCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACCTCCGACAAGCT
 GATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGC
 GGCTTCGACTCCCCCACCGTGCCCTACTCCGTGCTGGTGG
 TGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTC
 CGTGAAGGAGCTGCTGGGCGATCACCATCATGGAGCGGTCC
 TCCTTCGAGAAGAACCCTATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGG
 GCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
 CAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCCGGAAGCGG
 ATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGTCAGAAGGGCAACGAGC
 TGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGC
 CTCCCACCTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAAC
 GAGCAGAAGCAGCTGTTTCGTGGAGCAGCACCAAGCACTACC
 TGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTTCCAAGCG
 GGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCC
 GCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGG
 CCGAGAACATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAACCTGGG
 CGCCCCCGCCGCCCTTCAAGTACTTTCGACACCACCATCGAC
 CGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCA
 CCCTGATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCCG
 GATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGGCGACTGA

318

2つのC末端NLS配列、ならびに開始および終止コドンを含む、表4の低Aコドンを使用したdCas9 ORF

ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCCTGGCCATCGGGC
 ACCAACTCCGTGGGCTGGGCGGTGATCACCGACGAGTACA
 AGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGA
 CCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGGCCCTGCTG
 TTCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC
 GGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGAT
 CTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAG
 GTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCTTCC
 TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTT
 CGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTAC
 CCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCA
 CCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGC
 CCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCTCTGATCGAGGGC
 GACCTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTCA
 TCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAA
 CCCCATCAACGCCCTCCGGCGGTGGACGCCCAAGGCCATCCTG

10

20

30

40

50

TCCGCCCGGCTGTCCAAGTCCC GGCGGCTGGAGAACCTGA
TCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAAGAACGGCCTGTTCTGG
CAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCCTGACCCCCAACTTC
AAGTCCAACCTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGTCAGC
TGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCC
GCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCC
TGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGTCCGC
CTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCGAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGTCCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCGGGGCAACTCCCGGTTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCTTTCATC
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTTCAC
CGTGTAACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCGCCTTCTCTGTCCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATC
GAGTGCTTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGAGGAGACC
GGTTCAACGCCTCCCTGGGCACTTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCTGACCTGT
TCGAGGACC GGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCAT
CCTGGACTTCTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCCAAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGGCTCCCCCGCC
ATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAACCAAGACCAACCAGAAAG
GGCCAGAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCCAAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGA
CGCCATCGTGCCCCAGTCTTCTCTGAAGGACGACTCCATC
GACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCA
AGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGAT

10

20

30

40

50

GAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC
 ACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGG
 GCGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGCTTCATCAAGCG
 GCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC
 CAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGA
 ACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAA
 GTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTT
 TACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCAACGCCCCACG
 ACGCCTACCTGAACGCCCGTGGTGGGCAACCGCCCTGATCAA
 GAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTGTACGGCGAC
 TACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCG
 AGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
 CTCCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCTG
 GCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCA
 ACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGA
 CTTTCGCCACCGTGGGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTG
 AACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCT
 CCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACCTCCGACAAGCT
 GATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGC
 GGCTTCGACTCCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGG
 TGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTC
 CGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCC
 TCCTTCGAGAAGAACCCTCGACTTCTCTGGAGGCCAAGG
 GCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
 CAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGG
 ATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGC
 TGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACTTCTGTACCTGGC
 CTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAAC
 GAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACC
 TGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCG
 GGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCC
 GCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGG
 CCGAGAACATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGG
 CGCCCCCGCCGCCCTTCAAGTACTTTCGACACCAACCATCGAC
 CGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCA
 CCCTGATCCACCAAGTCCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCG
 GATCGACCTGTCCAGCTGGGCGGGCGACGGCTCCGGCTCC
 CCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCTCCCCCAAGAAGA
 AGCGGAAGGTGGACTCCGGCTGA

319

2つのC末端NLS配列、ならびに開始および終止コドンを含む、表4の低A/Uコドンを使用したCas9 ORF

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCCTGGACATCGGGC
 ACCAACAGCGTGGGCTGGGCGCGTGATCACCGACGAGTACA
 AGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGA
 CCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG
 TTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC
 GGACCGGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGAT
 CTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAG
 GTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCC

10

20

30

40

50

TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTT
CGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTAC
CCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCA
CCGACAAGGCCGACCTGCGGGCTGATCTACCTGGCCCTGGC
CCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGC
GACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAA
CCCCATCAACGCCAGCGGCCTGGACGCCAAGGCCATCCTG
AGCGCCCGGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGGCTGGAGAACCTGA
TCGCCCCAGCTGCCCGGCGAGAAAGAAACGGCCCTGTTTCGG
CAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGGCTGACCCCCCAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGCCCGAGGACGCCAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTTCCTGGCC
GCCAAGAACCTGAGCGACGCCCATCCTGCTGAGCGACATCC
TGCGGGGTGAAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGC
CAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACCAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCGGGATCCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCGGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTTCATC
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAC
CGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAAG
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC
GAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACC
GGTTCAACGCCAGCCTGGGCGACCTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTTCCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCTGACCTGT
TCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCGGGCTGAGCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAT
CCTGGACTTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCAGGAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCCAAGGTGAGCGGCGAGGGCGACAG
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCGAGCCCCGCC
ATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAGGTGATGGGCGGGCACAAGCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCAACCAGAAAG

10

20

30

40

50

GGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGGCATCAAGGAGCTGGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGGCCGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACC GGCTGAGCGACTACGACGTGGA
CCACATCGTGGCCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACC GGGGCA
AGAGCGACAACGTGGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGAT
GAAGA ACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC
ACCCAGCGGAAGTTCTGACAACCTGACCAAGGCCCGAGCGGG
GCGGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTTCATCAAGCG
GCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGA
ACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTTGAA
GAGCAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAAGGACTTCCAGTTT
TACAAGGTGCGGGAGATCAACA ACTACCACCGCCACG
ACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAA
GAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTGTACGGCGAC
TACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCG
AGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGA ACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTTG
GCCAACGGCGAGATCCGGAAAGCGGGCCCTGATCGAGACCA
ACGGCGAGACCGGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGGCCGGGA
CTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTG
AACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCGAGACCGGCGGCTTCA
GCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCT
GATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGC
GGCTTCGACAGCCCCACCGTGCGCTACAGCGTGCTGGTGG
TGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG
CGTGAAGGAGCTGCTGGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGC
AGCTTCGAGAAGAACC CATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGG
GCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
CAAGTACAGCCTGTTCTGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGG
ATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCGAGAAGGGGCAACGAGC
TGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGA ACTTCTGTACCTGGC
CAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAC
GAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTAGCAAGCG
GGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGC
GCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGG
CCGAGAACATCATCCACCTGTTTCAACCCTGACCAACCTGGG
CGCCCCCGCCGCCCTTCAAGTACTTCTGACACCACTATCGAC
CGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCA
CCCTGATCCACCAAGAGCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCG
GATCGACCTGAGCCAGCTGGGGCGGCGACGGCAGCGGCAGC
CCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCAGCCCCAAGAAGA
AGCGGAAGGTGGACAGCGGGCTGA

10

20

30

40

320

開始および終止コドンを有し、NLSを有しない、表4の低A/Uコドンを使用した
Cas9 ORF

50

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGC
ACCAACAGCGTGGGCTGGGCGGTGATCACCGACGAGTACA
AGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGA
CCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG
TTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC
GGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGAT
CTGCTACCTGCAAGGAGATCTTCAAGCAACGAGATGGCCAAG
GTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCC
TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTT
CGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCAACGAGAAGTAC
CCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCA
CCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGC
CCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGC
GACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAA
CCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG
AGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCCTGA
TCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAAGAAGAACGGCCTGTTCCG
CAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGGCCTGACCCCCAACTTC
AAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCC
GCCAAGAACCCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCC
TGCGGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGC
CAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTA
CGCCGGGCTACATCGACGGCGGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACC GGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTC CGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTTCATC
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAC
CGTGTAACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACC GGAAGGT
GACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATC
GAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACC
GGTTCAACGCCAGCCTGGGGCACCTACCAACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCCTGACCCCTGT
TCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCGCGGCTGAGCCGGAAGC

10

20

30

40

50

TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCC
ATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACC GTGAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAAGGTGATGGGCGGGCACAAGCCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCACCCAGAAG
GGCCAGAAGAACAGCCGGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGCATCAAGGAGCTGGGCGAGCCAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACC GGCTGAGCGACTACGACGTGGA
CCACATCGTGGCCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACC GGGGCA
AGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGAT
GAAGAAGTACTGCGGCGAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC
ACCCAGCGGAAGTTCTGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGG
GCGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCTATCAAGCG
GCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGA
ACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAA
GAGCAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAAGGACTTCCAGTTC
TACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCAACCACGCCACG
ACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAA
GAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTGTACGGCGAC
TACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCG
AGCAGGAGATCGGCCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTG
GCCAACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGATCGAGACCA
ACGGCGAGACC GGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGA
CTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTG
AACATCGTGAAGAAGACC GAGGTGCAGACC GGCGGCTTCA
GCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCT
GATCGCCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGC
GGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCCTACAGCGTGTGGTGG
TGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG
CGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGC
AGCTTCGAGAAGAACC CCATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGG
GCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
CAAGTACAGCCTGTTCTGAGCTGGAGAACGGCCGGAAAGCGG
ATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGC
TGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGC
CAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAC
GAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTTCAAGCAAGCG
GGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGC
GCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGG
CCGAGAACATCATCACCTGTTTACCCCTGACCAACCTGGG
CGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCTGACACCACCATCGAC

10

20

30

40

50

CGGAAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCA
CCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCG
GATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACTGA

3 2 1

開始および終止コドンを含む、表4の低A/Uコドンを使用したCas9ニック
ゼORF

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGCCATCGGGC
ACCAACAGCGTGGGCTGGGCGCGTGATCACCGACGAGTACA
AGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGA
CCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG
TTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGGCTGAAGC
GGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGAT
CTGCTACCTGCAGGAGATCTTTCAGCAACGAGATGGCCAAG
GTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCC
TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTT
CGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTAC
CCCACCATCTACCACTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCA
CCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGC
CCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCTCTGATCGAGGGC
GACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAA
CCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG
AGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGA
TCGCCCCAGCTGCCCGGCGAGAAAGAAGAACGGCCTGTTCCG
CAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACCTTC
AAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCC
GCCAAGAACCCTGAGCGACGCCCATCTCTGCTGAGCGACATCC
TGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGC
CAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCCATCTCTGGAGAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCTGCGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTTCATC
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAC
CGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCGCCTTCTCTGAGCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC
GAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACC

10

20

30

40

50

GGTTCAACGCCAGCCTGGGGCACCTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGT
TCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGGCTGAAGACCTA
CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGGCGGTACACCGGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGGCAAGACCAT
CCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC
TTCATGCGAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCC
ATCAAGAAGGGGCATCCTGCAGACC GTGAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAAGGTGATGGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCAGACCACCCAGAAG
GGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGGCATCAAGGAGCTGGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACAACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGGCCGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACCGGGCTGAGCGACTACGACGTGGA
CCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTGCTGACC CGGAGCGACAAGAACC GGGGCA
AGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGAT
GAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCCAAGCTGATC
ACCCAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCCGAGCGGG
GCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCG
GCAGCTGGTGGAGACCCGGGCAGATCACC AAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGA
ACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTTGAA
GAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGG AAGGACTTCCAGTTTC
TACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCA CGCCACG
ACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAA
GAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTGTACGGCGAC
TACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCG
AGCAGGAGATCGGCCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAAC TTCTTCAAGACCGAGATCACCTTG
GCCAACGGCGAGATCCGGGAAGCGGGCCCTGATCGAGACCA
ACGGCGAGACCGGGCGAGATCGTGTTGGGACAAGGGCCGGGA
CTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTG
AACATCGTGAAAGAAGACCGAGGTGCGAGACCGGGCGGCTTCA
GCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCT
GATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGC
GGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGG
TGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG
CGTGAAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGC
AGCTTCGAGAAGAACC CACATCGACTTCCTGGAGGGCCAAGG
GCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
CAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGGAAGCGG
ATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGC
TGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAAC TTCTGTACCTGGC
CAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAC

10

20

30

40

50

GAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTTCAGCAAAGCG
GGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGC
GCCTACAACAAGCACCCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGG
CCGAGAACATCATCCACCTGTTTCAACCCTGACCAACCTGGG
CGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTTCGACACCACCATCGAC
CGGAAGCGGTTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCA
CCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCG
GATCGACCTGAGCCAGCTGGGGCGGCGACGGCGGGCGGCAGC
CCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA

10

3 2 2

2つのC末端NLS配列、ならびに開始および終止コドンを含む、表4の低A/U
コドンを使用したCas9ニッカーゼORF

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGGCCTGGCCATCGGGC
ACCAACAGCGTGGGCTGGGCGGTGATCACCGACGAGTACA
AGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGA
CCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG
TTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC
GGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGAT
CTGCTACCTGCAAGGAGATCTTTCAGCAACGAGATGGCCAAG
GTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCC
TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTT
CGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTAC
CCCACCATCTACCACTGCGGGAAGAAGCTGGTGGACAGCA
CCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGC
CCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCTGATCGAGGGC
GACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAA
CCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG
AGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGA
TCGCCCAAGCTGCCCGGCGAGAAAGAAGAACGGCCTGTTCCG
CAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGGCCTGACCCCCAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCC
GCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCC
TGCGGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGC
CAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTA
CGCCGGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTT
TACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTTCGACAACGGCAGCATCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAAGAGCTTTCATC

20

30

40

50

GAGCGGATGACCAACTTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAC
CGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCGCCTTCTCTGAGCGGCGAGCAGAAAG
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC
GAGTGCTTTCGACAGCGTGAGAGATCAGCGGCGTGAGGAGACC
GGTTCAACGCCAGCCTGGGACACCTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGTCTGACCCCTGACCCCTGT
TCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCCAAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCC
ATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAAGGTGATGGGCCGGGCACAAGCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAAACCAGACCACCCAGAAG
GGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGCATCAAGGAGCTGGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGA
CCACATCGTGCCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCA
AGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGAT
GAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC
ACCCAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGG
GCGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTTCATCAAGCG
GCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGA
ACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAA
GAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAAGGACTTCCAGTTTC
TACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACG
ACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAA
GAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTGTACGGCGAC
TACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCG
AGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTG
GCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGGCCCCCTGATCGAGACCA
ACGGCGAGACC GGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGA
CTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGGTG
AACATCGTGAAAGAACCGAGGTGCAGACCGGCGGGCTTCA
GCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCT
GATCGCCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCCAAGAAAGTACGGC
GGCTTCGACAGCCCCACCGTGCGCTACAGCGTGCTGGTGG
TGGCCAAGGTGGAGAAAGGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAG

10

20

30

40

50

C G T G A A G G A G C T G C T G G G C A T C A C C A T C A T G G A G C G G A G C
 A G C T T C G A G A A G A A C C C C A T C G A C T T C C T G G A G G C C A A G G
 G C T A C A A G G A G G T G A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C
 C A A G T A C A G C C T G T T C G A G C T G G A G A A C G G C C G G A A G C G G
 A T G C T G G C C A G C G C C G G C G A G C T G C A G A A G G G C A A C G A G C
 T G G C C C T G C C C A G C A A G T A C G T G A A C T T C C T G T A C C T G G C
 C A G C C A C T A C G A G A A G C T G A A G G G C A G C C C C G A G G A C A A C
 G A G C A G A A G C A G C T G T T C G T G G A G C A G C A C A A G C A C T A C C
 T G G A C G A G A T C A T C G A G C A G A T C A G C G A G T T C A G C A A G C G
 G G T G A T C C T G G C C G A C G C C A A C C T G G A C A A G G T G C T G A G C
 G C C T A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A T C C G G G A G C A G G
 C C G A G A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C C C T G A C C A A C C T G G G
 C G C C C C C G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C
 C G G A A G C G G T A C A C C A G C A C C A A G G A G G T G C T G G A C G C C A
 C C C T G A T C C A C C A G A G C A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C C C G
 G A T C G A C C T G A G C C A G C T G G G C G G C G A C G G C A G C G G C A G C
 C C C A A G A A G A A G C G G A A G G T G G A C G G C A G C C C C A A G A A G A
 A G C G G A A G G T G G A C A G C G G C T G A

3 2 3

開始および終止コドンを含し、N L Sを含しない、表 4 の低 A / U コドンを使用した
C a s 9 ニッカーゼ O R F

A T G G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G C C T G G C C A T C G G C
 A C C A A C A G C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A
 A G G T G C C C A G C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A
 C C G G C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G
 T T C G A C A G C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C
 G G A C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T
 C T G C T A C C T G C A G G A G A T C T T C A G C A A C G A G A T G G C C A A G
 G T G G A C G A C A G C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G A G C T T C C
 T G G T G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T
 C G G C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A G A A G T A C
 C C C A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C A G C A
 C C G A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C
 C C A C A T G A T C A A G T T C C G G G G C C A C T T C C T G A T C G A G G G C
 G A C C T G A A C C C C G A C A A C A G C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A
 T C C A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A A
 C C C C A T C A A C G C C A G C G G C G T G G A C G C C A A G G C C A T C C T G
 A G C G C C C G G C T G A G C A A G A G C C G G C G G C T G G A G A A C C T G A
 T C G C C C A G C T G C C C G G C G A G A A G A A G A A C G G C C T G T T C G G
 C A A C C T G A T C G C C C T G A G C C T G G G C C T G A C C C C C A A C T T C
 A A G A G C A A C T T C G A C C T G G C C G A G G A C G C C A A G C T G C A G C
 T G A G C A A G G A C A C C T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T
 G G C C C A G A T C G G C G A C C A G T A C G C C G A C C T G T T C C T G G C C
 G C C A A G A A C C T G A G C G A C G C C A T C C T G C T G A G C G A C A T C C
 T G C G G G T G A A C A C C G A G A T C A C C A A G G C C C C C C T G A G C G C
 C A G C A T G A T C A A G C G G T A C G A C G A G C A C C A C C A G G A C C T G
 A C C C T G C T G A A G G C C C T G G T G C G G C A G C A G C T G C C C G A G A
 A G T A C A A G G A G A T C T T C T T C G A C C A G A G C A A G A A C G G C T A
 C G C C G G C T A C A T C G A C G G C G G C G C C A G C C A G G A G G A G T T C
 T A C A A G T T C A T C A A G C C C A T C C T G G A G A A G A T G G A C G G C A

10

20

30

40

50

CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCGCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTCATC
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTTCAC
CGTGTAACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC
GAGTGCTTCGACAGCGTGAGAGATCAGCGGCGTGAGGACC
GGTTCAACGCCAGCCTGGGGCACCTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGT
TCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAT
CCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCC
ATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACC GTGAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAGGTGATGGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCACCCAGAAG
GGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGCATCAAGGAGCTGGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGGCCGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGA
CCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACC GGGGCA
AGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGAT
GAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC
ACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGG
GCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCG
GCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGA
ACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAA
GAGCAAGCTGGTGAAGCGACTTCGGGAAGGACTTCCAGTTC
TACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAAGCCACG
ACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAA
GAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGAC
TACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCG
AGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCTG

10

20

30

40

50

G C C A A C G G C G A G A T C C G G A A G C G G C C C C T G A T C G A G A C C A
 A C G G C G A G A C C G G C G A G A T C G T G T G G G A C A A G G G C C G G G A
 C T T C G C C A C C G T G C G G A A G G T G C T G A G C A T G C C C C A G G T G
 A A C A T C G T G A A G A A G A C C G A G G T G C A G A C C G G C G G C T T C A
 G C A A G G A G A G C A T C C T G C C C A A G C G G A A C A G C G A C A A G C T
 G A T C G C C C G G A A G A A G G A C T G G G A C C C C A A G A A G T A C G G C
 G G C T T C G A C A G C C C C A C C G T G G C C T A C A G C G T G C T G G T G G
 T G G C C A A G G T G G A G A A G G G C A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G
 C G T G A A G G A G C T G C T G G G C A T C A C C A T C A T G G A G C G G A G C
 A G C T T C G A G A A G A A C C C C A T C G A C T T C C T G G A G G C C A A G G
 G C T A C A A G G A G G T G A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C
 C A A G T A C A G C C T G T T C G A G C T G G A G A A C G G C C G G A A G C G G
 A T G C T G G C C A G C G C C G G C G A G C T G C A G A A G G G C A A C G A G C
 T G G C C C T G C C C A G C A A G T A C G T G A A C T T C C T G T A C C T G G C
 C A G C C A C T A C G A G A A G C T G A A G G G C A G C C C C G A G G A C A A C
 G A G C A G A A G C A G C T G T T C G T G G A G C A G C A C A A G C A C T A C C
 T G G A C G A G A T C A T C G A G C A G A T C A G C G A G T T C A G C A A G C G
 G G T G A T C C T G G C C G A C G C C A A C C T G G A C A A G G T G C T G A G C
 G C C T A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A T C C G G G A G C A G G
 C C G A G A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C C C T G A C C A A C C T G G G
 C G C C C C G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C
 C G G A A G C G G T A C A C C A G C A C C A A G G A G G T G C T G G A C G C C A
 C C C T G A T C C A C C A G A G C A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C C C G
 G A T C G A C C T G A G C C A G C T G G G C G G C G A C T G A

3 2 4

開始および終止コドンを含む、表4の低A/Uコドンを使用したdC a s 9 O R F

A T G G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G C C T G G C C A T C G G C
 A C C A A C A G C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A
 A G G T G C C C A G C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A
 C C G G C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G
 T T C G A C A G C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C
 G G A C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T
 C T G C T A C C T G C A G G A G A T C T T C A G C A A C G A G A T G G C C A A G
 G T G G A C G A C A G C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G A G C T T C C
 T G G T G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T
 C G G C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A G A A G T A C
 C C C A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C A G C A
 C C G A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C
 C C A C A T G A T C A A G T T C C G G G G C C A C T T C C T G A T C G A G G G C
 G A C C T G A A C C C C G A C A A C A G C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A
 T C C A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A A
 C C C C A T C A A C G C C A G C G G C G T G G A C G C C A A G G C C A T C C T G
 A G C G C C C G G C T G A G C A A G A G C C G G C G G C T G G A G A A C C T G A
 T C G C C C A G C T G C C C G G C G A G A A G A A G A A C G G C C T G T T C G G
 C A A C C T G A T C G C C C T G A G C C T G G G C C T G A C C C C C A A C T T C
 A A G A G C A A C T T C G A C C T G G C C G A G G A C G C C A A G C T G C A G C
 T G A G C A A G G A C A C C T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T
 G G C C C A G A T C G G C G A C C A G T A C G C C G A C C T G T T C C T G G C C
 G C C A A G A A C C T G A G C G A C G C C A T C C T G C T G A G C G A C A T C C
 T G C G G G T G A A C A C C G A G A T C A C C A A G G C C C C C C T G A G C G C

10

20

30

40

50

CAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACCAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTCATC
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAC
CGTGTAACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCCGCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC
GAGTGCTTCGACAGCGTGAGATCAGCGGCGTGAGGAGACC
GGTTCAACGCCAGCCTGGGGCACCTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCTGACCTGT
TCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCCAAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCC
ATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAGGTGATGGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCACCCAGAAG
GGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGA
Cg c CATCGTGCCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCAGGGGCA
AGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGAT
GAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC
ACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGG
GCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCG
GCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC
CAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGA
ACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAA
GAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTC
TACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACACGCCCACG

10

20

30

40

50

A C G C C T A C C T G A A C G C C G T G G T G G G C A C C G C C C T G A T C A A
 G A A G T A C C C C A A G C T G G A G A G C G A G T T C G T G T A C G G C G A C
 T A C A A G G T G T A C G A C G T G C G G A A G A T G A T C G C C A A G A G C G
 A G C A G G A G A T C G G C A A G G C C A C C G C C A A G T A C T T C T T C T A
 C A G C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C C G A G A T C A C C C T G
 G C C A A C G G C G A G A T C C G G A A G C G G C C C C T G A T C G A G A C C A
 A C G G C G A G A C C G G C G A G A T C G T G T G G G A C A A G G G C C G G G A
 C T T C G C C A C C G T G C G G A A G G T G C T G A G C A T G C C C C A G G T G
 A A C A T C G T G A A G A A G A C C G A G G T G C A G A C C G G C G G C T T C A
 G C A A G G A G A G C A T C C T G C C C A A G C G G A A C A G C G A C A A G C T
 G A T C G C C C G G A A G A A G G A C T G G G A C C C C A A G A A G T A C G G C
 G G C T T C G A C A G C C C C A C C G T G G C C T A C A G C G T G C T G G T G G
 T G G C C A A G G T G G A G A A G G G C A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G
 C G T G A A G G A G C T G C T G G G C A T C A C C A T C A T G G A G C G G A G C
 A G C T T C G A G A A G A A C C C C A T C G A C T T C C T G G A G G C C A A G G
 G C T A C A A G G A G G T G A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C
 C A A G T A C A G C C T G T T C G A G C T G G A G A A C G G C C G G A A G C G G
 A T G C T G G C C A G C G C C G G C G A G C T G C A G A A G G G C A A C G A G C
 T G G C C C T G C C C A G C A A G T A C G T G A A C T T C C T G T A C C T G G C
 C A G C C A C T A C G A G A A G C T G A A G G G C A G C C C C G A G G A C A A C
 G A G C A G A A G C A G C T G T T C G T G G A G C A G C A C A A G C A C T A C C
 T G G A C G A G A T C A T C G A G C A G A T C A G C G A G T T C A G C A A G C G
 G G T G A T C C T G G C C G A C G C C A A C C T G G A C A A G G T G C T G A G C
 G C C T A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A T C C G G G A G C A G G
 C C G A G A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C C C T G A C C A A C C T G G G
 C G C C C C C G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C
 C G G A A G C G G T A C A C C A G C A C C A A G G A G G T G C T G G A C G C C A
 C C C T G A T C C A C C A G A G C A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C C C G
 G A T C G A C C T G A G C C A G C T G G G C G G C G A C G G C G G C G G C A G C
 C C C A A G A A G A A G C G G A A G G T G T G A

10

20

30

3 2 5

2つのC末端NLS配列、ならびに開始および終止コドンを含む、表4の低A/Uコドンを使用したdCas9 ORF

A T G G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G C C T G G C C A T C G G C
 A C C A A C A G C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A
 A G G T G C C C A G C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A
 C C G G C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G
 T T C G A C A G C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C
 G G A C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T
 C T G C T A C C T G C A G G A G A T C T T C A G C A A C G A G A T G G C C A A G
 G T G G A C G A C A G C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G A G C T T C C
 T G G T G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T
 C G G C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A G A A G T A C
 C C C A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C A G C A
 C C G A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C
 C C A C A T G A T C A A G T T C C G G G G C C A C T T C C T G A T C G A G G G C
 G A C C T G A A C C C C G A C A A C A G C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A
 T C C A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A A
 C C C C A T C A A C G C C A G C G G C G T G G A C G C C A A G G C C A T C C T G
 A G C G C C C G G C T G A G C A A G A G C C G G C G G C T G G A G A A C C T G A

40

50

TCGCCCCAGCTGCCCGGCGAGAAAGAAACGGCCTGTTTCGG
CAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCC
GCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCC
TGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGC
CAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCGAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTA
CGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTTCATC
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTTCAC
CGTGTAACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCCGCCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAAG
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC
GAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACC
GGTTCAACGCCAGCCTGGGGCACCTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTTCCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCTTGACCTGT
TCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAT
CCTGGACTTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCCGGCAGCCCCGCC
ATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCCTGAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAGGTGATGGGCGGGCACAAGCCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCAACCAGAAAG
GGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG
AGGGCATCAAGGAGCTGGGCGAGCCAGATCCTGAAGGAGCA
CCCCGTGGAGAACAACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACC
AGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGA
CGCCATCGTGCCCCAGAGCTTTCCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCA
AGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGAT
GAAGAATACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC

10

20

30

40

50

A C C C A G C G G A A G T T C G A C A A C C T G A C C A A G G C C G A G C G G G
 G C G G C C T G A G C G A G C T G G A C A A G G C C G G C T T C A T C A A G C G
 G C A G C T G G T G G A G A C C C G G C A G A T C A C C A A G C A C G T G G C C
 C A G A T C C T G G A C A G C C G G A T G A A C A C C A A G T A C G A C G A G A
 A C G A C A A G C T G A T C C G G G A G G T G A A G G T G A T C A C C C T G A A
 G A G C A A G C T G G T G A G C G A C T T C C G G A A G G A C T T C C A G T T C
 T A C A A G G T G C G G G A G A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C C C A C G
 A C G C C T A C C T G A A C G C C G T G G T G G G C A C C G C C C T G A T C A A
 G A A G T A C C C C A A G C T G G A G A G C G A G T T C G T G T A C G G C G A C
 T A C A A G G T G T A C G A C G T G C G G A A G A T G A T C G C C A A G A G C G
 A G C A G G A G A T C G G C A A G G C C A C C G C C A A G T A C T T C T T C T A
 C A G C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C C G A G A T C A C C C T G
 G C C A A C G G C G A G A T C C G G A A G C G G C C C C T G A T C G A G A C C A
 A C G G C G A G A C C G G C G A G A T C G T G T G G G A C A A G G G C C G G G A
 C T T C G C C A C C G T G C G G A A G G T G C T G A G C A T G C C C C A G G T G
 A A C A T C G T G A A G A A G A C C G A G G T G C A G A C C G G C G G C T T C A
 G C A A G G A G A G C A T C C T G C C C A A G C G G A A C A G C G A C A A G C T
 G A T C G C C C G G A A G A A G G A C T G G G A C C C C A A G A A G T A C G G C
 G G C T T C G A C A G C C C C A C C G T G G C C T A C A G C G T G C T G G T G G
 T G G C C A A G G T G G A G A A G G G C A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G
 C G T G A A G G A G C T G C T G G G C A T C A C C A T C A T G G A G C G G A G C
 A G C T T C G A G A A G A A C C C C A T C G A C T T C C T G G A G G C C A A G G
 G C T A C A A G G A G G T G A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C
 C A A G T A C A G C C T G T T C G A G C T G G A G A A C G G C C G G A A G C G G
 A T G C T G G C C A G C G C C G G C G A G C T G C A G A A G G G C A A C G A G C
 T G G C C C T G C C C A G C A A G T A C G T G A A C T T C C T G T A C C T G G C
 C A G C C A C T A C G A G A A G C T G A A G G G C A G C C C C G A G G A C A A C
 G A G C A G A A G C A G C T G T T C G T G G A G C A G C A C A A G C A C T A C C
 T G G A C G A G A T C A T C G A G C A G A T C A G C G A G T T C A G C A A G C G
 G G T G A T C C T G G C C G A C G C C A A C C T G G A C A A G G T G C T G A G C
 G C C T A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A T C C G G G A G C A G G
 C C G A G A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C C C T G A C C A A C C T G G G
 C G C C C C C G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C
 C G G A A G C G G T A C A C C A G C A C C A A A G G A G G T G C T G G A C G C C A
 C C C T G A T C C A C C A G A G C A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C C C G
 G A T C G A C C T G A G C C A G C T G G G C G G C G A C G G C A G C G G C A G C
 C C C A A G A A G A A G C G G A A G G T G G A C G G C A G C C C C A A G A A G A
 A G C G G A A G G T G G A C A G C G G C T G A

3 2 6

開始および終止コドンの有し、NLSを有しない、表4の低A/Uコドンを使用した
d C a s 9 O R F

A T G G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G C C T G G C C A T C G G C
 A C C A A C A G C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A
 A G G T G C C C A G C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A
 C C G G C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G
 T T C G A C A G C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C
 G G A C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T
 C T G C T A C C T G C A G G A G A T C T T C A G C A A C G A G A T G G C C A A G
 G T G G A C G A C A G C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G A G C T T C C
 T G G T G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T

10

20

30

40

50

CGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTAC
CCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCA
CCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGC
CCACATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGC
GACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAA
CCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG
AGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCGCGGCGGCTGGAGAACCTGA
TCGCCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAGCGGCCCTGTTCCGG
CAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGGCCTGACCCCCCAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCC
GCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCC
TGCGGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGC
CAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACCAGGACCTG
ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGA
AGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTA
CGCCGGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCA
CCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT
GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCAC
CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCGGC
AGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAA
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCGGGATCCCCTACTACGTG
GGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTTCGCCTGGATGA
CCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGA
GGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATC
GAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGA
AGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAC
CGTGTAACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAG
GGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGA
AGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGT
GACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATC
GAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACC
GGTTCAACGCCAGCCTGGGCACTTACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGTGACCCCTGACCCCTGT
TCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTA
CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCCGGCTGAGCCGGAAGC
TGATCAACGGCATCCGGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAT
CCTGGACTTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCAGGAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGG
AGGACATCCAGAAGGCCCAAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAG
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCC
ATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCCTGAAGGTGGTGGACG
AGCTGGTGAAGGTGATGGGCCGGGCAACAAGCCCGAGAACAT
CGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAAGACCAACCAGAAAG
GGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGG

10

20

30

40

50

A G G G C A T C A A G G A G C T G G G C A G C C A G A T C C T G A A G G A G C A
 C C C C G T G G A G A A C A C C C A G C T G C A G A A C G A G A A G C T G T A C
 C T G T A C T A C C T G C A G A A C G G C C G G G A C A T G T A C G T G G A C C
 A G G A G C T G G A C A T C A A C C G G C T G A G C G A C T A C G A C G T G G A
 C g c C A T C G T G C C C C A G A G C T T C C T G A A G G A C G A C A G C A T C
 G A C A A C A A G G T G C T G A C C C G G A G C G A C A A G A A C C G G G G C A
 A G A G C G A C A A C G T G C C C A G C G A G G A G G T G G T G A A G A A G A T
 G A A G A A C T A C T G G C G G C A G C T G C T G A A C G C C A A G C T G A T C
 A C C C A G C G G A A G T T C G A C A A C C T G A C C A A G G C C G A G C G G G
 G C G G C C T G A G C G A G C T G G A C A A G G C C G G C T T C A T C A A G C G
 G C A G C T G G T G G A G A C C C G G C A G A T C A C C A A G C A C G T G G C C
 C A G A T C C T G G A C A G C C G G A T G A A C A C C A A G T A C G A C G A G A
 A C G A C A A G C T G A T C C G G G A G G T G A A G G T G A T C A C C C T G A A
 G A G C A A G C T G G T G A G C G A C T T C C G G A A G G A C T T C C A G T T C
 T A C A A G G T G C G G G A G A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C C C A C G
 A C G C C T A C C T G A A C G C C G T G G T G G G C A C C G C C C T G A T C A A
 G A A G T A C C C C A A G C T G G A G A G C G A G T T C G T G T A C G G C G A C
 T A C A A G G T G T A C G A C G T G C G G A A G A T G A T C G C C A A G A G C G
 A G C A G G A G A T C G G C A A G G C C A C C G C C A A G T A C T T C T T C T A
 C A G C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C C G A G A T C A C C C T G
 G C C A A C G G C G A G A T C C G G A A G C G G C C C C T G A T C G A G A C C A
 A C G G C G A G A C C G G C G A G A T C G T G T G G G A C A A G G G C C G G G A
 C T T C G C C A C C G T G C G G A A G G T G C T G A G C A T G C C C C A G G T G
 A A C A T C G T G A A G A A G A C C G A G G T G C A G A C C G G C G G C T T C A
 G C A A G G A G A G C A T C C T G C C C A A G C G G A A C A G C G A C A A G C T
 G A T C G C C C G G A A G A A G G A C T G G G A C C C C A A G A A G T A C G G C
 G G C T T C G A C A G C C C C A C C G T G G C C T A C A G C G T G C T G G T G G
 T G G C C A A G G T G G A G A A G G G C A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G
 C G T G A A G G A G C T G C T G G G C A T C A C C A T C A T G G A G C G G A G C
 A G C T T C G A G A A G A A C C C C A T C G A C T T C C T G G A G G C C A A G G
 G C T A C A A G G A G G T G A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C
 C A A G T A C A G C C T G T T C G A G C T G G A G A A C G G C C G G A A G C G G
 A T G C T G G C C A G C G C C G G C G A G C T G C A G A A G G G C A A C G A G C
 T G G C C C T G C C C A G C A A G T A C G T G A A C T T C C T G T A C C T G G C
 C A G C C A C T A C G A G A A G C T G A A G G G C A G C C C C G A G G A C A A C
 G A G C A G A A G C A G C T G T T C G T G G A G C A G C A C A A G C A C T A C C
 T G G A C G A G A T C A T C G A G C A G A T C A G C G A G T T C A G C A A G C G
 G G T G A T C C T G G C C G A C G C C A A C C T G G A C A A G G T G C T G A G C
 G C C T A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A T C C G G G A G C A G G
 C C G A G A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C C C T G A C C A A C C T G G G
 C G C C C C C G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C
 C G G A A G C G G T A C A C C A G C A C C A A G G A G G T G C T G G A C G C C A
 C C C T G A T C C A C C A G A G C A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C C C G
 G A T C G A C C T G A G C C A G C T G G G C G G C G A C T G A

3 2 7

開始コドンおよび終止コドンを有する、表4の低Aコドンを使用したNme Cas
9 ORF

A T G G C C G C C T T C A A G C C C A A C T C C A T C A A C T A C A T C
 C T G G G C C T G G A C A T C G G C A T C G C C T C C G T G G G C T G G G C C A
 T G G T G G A G A T C G A C G A G G A G G A G A A C C C C A T C C G G C T G A T

10

20

30

40

50

CGACCTGGGCGTGCGGGTGTTCGAGCGGGCCGAGGTGCCC
AAGACCGGCGACTCCCTGGCCATGGCCCGGCGGCTGGCCC
GGTCCGTGCGGCGGCTGACCCGGCGGGCGGGCCCAACGGCT
GCTGCGGACCCGGCGGCTGCTGAAGCGGGAGGGCGTGCTG
CAGGCCGCGCAACTTCGACGAGAACGGCCTGATCAAGTCCC
TGCCCAACACCCCTGGCAGCTGCGGGCGGCCGCCCTGGA
CCGGAAGCTGACCCCTGGAGTGGTCCGCCGTGCTGCTG
CACCTGATCAAGCACCGGGGCTACCTGTCCAGCGGAAGA
ACGAGGGCGGAGACCGCCGACAAGGAGCTGGGCGGCCCTGCT
GAAGGGCGTGCGCGGCAACGCCCAACGCCCTGCAGACCGGC
GACTTCCGGACCCCGGCCGAGCTGGCCCTGAACAAGTTTCG
AGAAGGAGTCCGGCCACATCCGGAACAGCGGTCCGACTA
CTCCACACCTTCTCCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTG
ATCCTGCTGTTTCGAGAAGCAGAAAGGAGTTCGGCAACCCCC
ACGTGTCCGGCGGCTGAAAGGAGGGCATCGAGACCCCTGCT
GATGACCCAGCGGCCCGGCCCTGTCCGGCGACGCCGTGCAG
AAGATGCTGGGCGCACTGCACCTTCGAGCCCGCCGAGCCCA
AGGCCGCCAAGAACACCTACACCGCCGAGCGGTTCATCTG
GCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGGC
TCCGAGCGGCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCCCTGA
TGGACGAGCCCTACCGGAAGTCCAAGCTGACCTACGCCCA
GGCCCGGAAGCTGCTGGGCGCTGGAGGACACCGCCTTCTTC
AAGGGCCTGCGGTACGGCAAGGACAACGCCGAGGGCCTCCA
CCCTGATGGAGATGAAGGCCCTACCAACGCCATCTCCCGGGC
CCTGGAGAAGGAGGGCCTGAAGGACAAGAAGTCCCCCTG
AACCTGTCCCCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCCACCGCCT
TCTCCCTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACCGGCCGGCT
GAAGGACCGGATCCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTG
AAGCACATCTCCTTCGACAAGTTTCGTGCAGATCTCCCTGA
AGGCCCTGCGGCGGATCGTGCCTCTGATGGAGCAGGGCAA
GCGGTACGACGAGGCCTGCGCCGAGATCTACGGCGACCAAC
TACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGATCTACCTGCCCC
CCATCCCCCGCCGACGAGATCCGGAAACCCCGTGGTGCTGCG
GGCCCTGTCCCAAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGCGTGTTG
CGGCGGTACGGCTCCCCCGGCCCGGATCCACATCGAGACCG
CCCGGGAGGTGGGCAAGTCTTCAAGGACCGGAAGGAGAT
CGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAAG
GCCGCCGCCAAGTTCCGGGAGTACTTCCCCAACTTCGTGG
GCGAGCCCAAGTCCAAGGACATCCTGAAGCTGCGGCTGTA
CGAGCAGCAGCACGGCAAGTGCTGTACTCCGGCAAGGAG
ATCAACCTGGGCGGCTGAACGAGAAGGGCTACGTGGAGA
TCGACCAACGCCCTGCCCTTCTCCCGGACCTGGGACGACTC
CTTCAACAACAAGGTGCTGGTGCTGGGCTCCGAGAACCAAG
AACAAAGGGCAACCAGACCCCTACGAGTACTTCAACGGCA
AGGACAACCTCCCGGGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCCCGGGT
GGAGACCTCCCGGTTCCCCCGGTCCAAGAAGCAGCGGATC
CTGCTGCAGAAAGTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGCGGA
ACCTGAACGACACCCGGTACGTGAACCGGTTCCTGTGCCA
GTTTCGTGGCCGACCGGATGCGGCTGACCGGCAAGGGCAAG
AAGCGGGTGTTCGCCCTCCAACGGCCAGATCACCAACCTGC

10

20

30

40

50

T G C G G G G C T T C T G G G G C C T G C G G A A G G T G C G G G C C G A G A A
 C G A C C G G C A C C A C G C C C T G G A C G C C G T G G T G G T G G C C T G C
 T C C A C C G T G G C C A T G C A G C A G A A G A T C A C C C G G T T C G T G C
 G G T A C A A G G A G A T G A A C G C C T T C G A C G G C A A G A C C A T C G A
 C A A G G A G A C C G G C G A G G T G C T G C A C C A G A A G A C C C A C T T C
 C C C C A G C C C T G G G A G T T C T T C G C C C A G G A G G T G A T G A T C C
 G G G T G T T C G G C A A G C C C G A C G G C A A G C C C G A G T T C G A G G A
 G G C C G A C A C C C T G G A G A A G C T G C G G A C C C T G C T G G C C G A G
 A A G C T G T C C T C C C G G C C C G A G G C C G T G C A C G A G T A C G T G A
 C C C C C C T G T T C G T G T C C C G G G C C C C A A C C G G A A G A T G T C
 C G G C C A G G G C C A C A T G G A G A C C G T G A A G T C C G C C A A G C G G
 C T G G A C G A G G G C G T G T C C G T G C T G C G G G T G C C C C T G A C C C
 A G C T G A A G C T G A A G G A C C T G G A G A A G A T G G T G A A C C G G G A
 G C G G G A G C C C A A G C T G T A C G A G G C C C T G A A G G C C C G G C T G
 G A G G C C C A C A A G G A C G A C C C C G C C A A G G C C T T C G C C G A G C
 C C T T C T A C A A G T A C G A C A A G G C C G G C A A C C G G A C C C A G C A
 G G T G A A G G C C G T G C G G G T G G A G C A G G T G C A G A A G A C C G G C
 G T G T G G G T G C G G A A C C A C A A C G G C A T C G C C G A C A A C G C C A
 C C A T G G T G C G G G T G G A C G T G T T C G A G A A G G G C G A C A A G T A
 C T A C C T G G T G C C C A T C T A C T C C T G G C A G G T G G C C A A G G G C
 A T C C T G C C C G A C C G G G C C G T G G T G C A G G G C A A G G A C G A G G
 A G G A C T G G C A G C T G A T C G A C G A C T C C T T C A A C T T C A A G T T
 C T C C C T G C A C C C C A A C G A C C T G G T G G A G G T G A T C A C C A A G
 A A G G C C C G G A T G T T C G G C T A C T T C G C C T C C T G C C A C C G G G
 G C A C C G G C A A C A T C A A C A T C C G G A T C C A C G A C C T G G A C C A
 C A A G A T C G G C A A G A A C G G C A T C C T G G A G G G C A T C G G C G T G
 A A G A C C G C C C T G T C C T T C C A G A A G T A C C A G A T C G A C G A G C
 T G G G C A A G G A G A T C C G G C C C T G C C G G C T G A A G A A G C G G C C
 C C C C G T G C G G T C C G G C A A G C G G A C C G C C G A C G G C T C C G A G
 T T C G A G T C C C C C A A G A A G A A G C G G A A G G T G G A G T G A

10

20

30

3 2 8

開始および終止コドンを有する、表 4 の低 A / U コドンを使用した Nme Cas 9
O R F

A T G G C C G C C T T C A A G C C C A A C A G C A T C A A C T A C A T C
 C T G G G C C T G G A C A T C G G C A T C G C C A G C G T G G G C T G G G C C A
 T G G T G G A G A T C G A C G A G G A G G A G A A C C C C A T C C G G C T G A T
 C G A C C T G G G C G T G C G G G T G T T C G A G C G G G C C G A G G T G C C C
 A A G A C C G G C G A C A G C C T G G C C A T G G C C C G G C G G C T G G C C C
 G G A G C G T G C G G C G G C T G A C C C G G C G G C G G G C C C A C C G G C T
 G C T G C G G A C C C G G C G G C T G C T G A A G C G G G A G G G C G T G C T G
 C A G G C C G C C A A C T T C G A C G A G A A C G G C C T G A T C A A G A G C C
 T G C C C A A C A C C C C C T G G C A G C T G C G G G C C G C C G C C C T G G A
 C C G G A A G C T G A C C C C C C T G G A G T G G A G C G C C G T G C T G C T G
 C A C C T G A T C A A G C A C C G G G G C T A C C T G A G C C A G C G G A A G A
 A C G A G G G C G A G A C C G C C G A C A A G G A G C T G G G C G C C C T G C T
 G A A G G G C G T G G C C G G C A A C G C C C A C G C C C T G C A G A C C G G C
 G A C T T C C G G A C C C C C G C C G A G C T G G C C C T G A A C A A G T T C G
 A G A A G G A G A G C G G C C A C A T C C G G A A C C A G C G G A G C G A C T A
 C A G C C A C A C C T T C A G C C G G A A G G A C C T G C A G G C C G A G C T G
 A T C C T G C T G T T C G A G A A G C A G A A G G A G T T C G G C A A C C C C C

40

50

ACGTGAGCGGCGGCCTGAAGGAGGGCATCGAGACCCTGCT
GATGACCCAGCGGCCCGCCCTGAGCGGCGACGCCCGTGACAG
AAGATGCTGGGCGCACTGCACCTTCGAGCCCGCCGAGCCCA
AGGCCGCGCAAGAACACCTACACCGCCGAGCGGTTCATCTG
GCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGGC
AGCGAGCGGCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCCTGA
TGGACGAGCCCTACCGGAAGAGCAAGCTGACCTACGCCCA
GGCCCGGAAGCTGCTGGGCGCTGGAGGACACCGCCCTTCTTC
AAGGGCGCTGCGGTACGGCAAGGACAACGCCCGAGGGCCAGCA
CCCTGATGGAGATGAAGGCGCTACCAACGCCCATCAGCCGGGC
CCTGGAGAAGGAGGGCCTGAAGGACAAGAAGAGCCCCCTG
AACCTGAGCCCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCAACCGCCT
TCAGCCTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACCGGCCCGGCT
GAAGGACCGGATCCAGCCCCGAGATCCTGGAGGGCCCTGCTG
AAGCACATCAGCTTCGACAAGTTTCGTGCAGATCAGCCTGA
AGGCCCTGCGGCGGATCGTGGCCCTGATGGAGCAGGGCAA
GCGGTACGACGAGGCGCTGCGCCGAGATCTACGGCGACCA
TACGGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAGATCTACCTGCCCC
CCATCCCCGCGCGACGAGATCCGGAAACCCCGTGGTGCTGCG
GGCCCTGAGCCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGCGTGTTG
CGGCGGTACGGCAGCCCCGCCCGGATCCACATCGAGACCG
CCCGGGAGGTGGGCAAGAGCTTCAAGGACCGGAAGGAGAT
CGAGAAGCGGCAGGAGGAGAACCAGGAAGGACCGGGAGAA
GCCGCCGCCAAGTTCCGGGAGTACTTCCCAACTTCGTGG
GCGAGCCCAAGAGCAAGGACATCCTGAAGCTGCGGCTGTA
CGAGCAGCAGCACGGCAAGTGCTGTACAGCGGCAAGGAG
ATCAACCTGGGCGCGCTGAACGAGAAGGGCTACGTGGAGA
TCGACCAACGCCCTGCCCTTCAGCCGGACCTGGGACGACAG
CTTCAACAACAAGGTGCTGGTGCTGGGACGCGAGAACCA
AACAAAGGGCAACCAGACCCCCCTACGAGTACTTCAACGGCA
AGGACAACAGCCGGGAGTGCGCAGGAGTTCAAGGCCCGGGT
GGAGACCAGCCGGTTCCCCCGGAGCAAGAAGCAGCGGATC
CTGCTGCAGAAAGTTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGCGGA
ACCTGAACGACACCCGGTACGTGAACCGGTTCTCTGTGCCA
GTTCTGTGGCCGACCGGATGCGGCTGACCGGCAAGGGCAAG
AAGCGGGTGTTTCGCCAGCAACGGGCCAGATCACCAACCTGC
TGCGGGGGCTTCTGGGGCCTGCGGAAGGTGCGGGGCCGAGAA
CGACCGGCACCAACGCCCTGGACGCCGTGGTGGTGGCCTGC
AGCACCGGTGGCCATGCAGCAGAAAGATCACCCGGTTCTGTGC
GGTACAAGGAGATGAACGCCCTTCGACGGCAAGACCATCGA
CAAGGAGACCGGCGAGGTGCTGCACCAGAAGACCCACTTC
CCCCAGCCCTGGGAGTTCTTTCGCCCAGGAGGTGATGATCC
GGGTGTTTCGGCAAGCCCCGACGGCAAGCCCCGAGTTTCGAGGA
GGCCGACACCCCTGGAGAAGCTGCGGACCCCTGCTGGCCGAG
AAGCTGAGCAGCCGGCCCCGAGGCCGTGCACGAGTACGTGA
CCCCCCTGTTCTGTAGCCGGGGCCCCCAACCGGAAGATGAG
CGGCCAGGGCCACATGGAGACCGTGAAGAGCGCCAAGCGG
CTGGACGAGGGCGTGAGCGTGCTGCGGGTGCCCCCTGACCC
AGCTGAAGCTGAAGGACCTGGAGAAGATGGTGAACCGGGA
GCGGGAGCCCCAAGCTGTACGAGGCCCTGAAGGCCCGGCTG

10

20

30

40

50

G A G G C C C A C A A G G A C G A C C C C G C C A A G G C C T T C G C C G A G C
C C T T C T A C A A G T A C G A C A A G G C C G G C A A C C G G A C C C A G C A
G G T G A A G G C C G T G C G G G T G G A G C A G G T G C A G A A G A C C G G C
G T G T G G G T G C G G A A C C A C A A C G G C A T C G C C G A C A A C G C C A
C C A T G G T G C G G G T G G A C G T G T T C G A G A A G G G C G A C A A G T A
C T A C C T G G T G C C C A T C T A C A G C T G G C A G G T G G C C A A G G G C
A T C C T G C C C G A C C G G G C C G T G G T G C A G G G C A A G G A C G A G G
A G G A C T G G C A G C T G A T C G A C G A C A G C T T C A A C T T C A A G T T
C A G C C T G C A C C C C A A C G A C C T G G T G G A G G T G A T C A C C A A G
A A G G C C C G G A T G T T C G G C T A C T T C G C C A G C T G C C A C C G G G
G C A C C G G C A A C A T C A A C A T C C G G A T C C A C G A C C T G G A C C A
C A A G A T C G G C A A G A A C G G C A T C C T G G A G G G C A T C G G C G T G
A A G A C C G C C C T G A G C T T C C A G A A G T A C C A G A T C G A C G A G C
T G G G C A A G G A G A T C C G G C C C T G C C G G C T G A A G A A G C G G C C
C C C C G T G C G G A G C G G C A A G C G G A C C G C C G A C G G C A G C G A G
T T C G A G A G C C C C A A G A A G A A G C G G A A G G T G G A G T G A

3 2 9

開始コドンおよび終止コドンを有する、N L S 1を有するC a s 9のオープンリーディングフレーム

A T G G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G A C T G G A C A T C G G A
A C A A A C A G C G T C G G A T G G G C A G T C A T C A C A G A C G A A T A C A
A G G T C C C G A G C A A G A A G T T C A A G G T C C T G G G A A A C A C A G A
C A G A C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G A G C A C T G C T G
T T C G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C T G A A G A
G A A C A G C A A G A A G A A G A T A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A T
C T G C T A C C T G C A G G A A A T C T T C A G C A A C G A A A T G G C A A A G
G T C G A C G A C A G C T T C T T C C A C A G A C T G G A A G A A A G C T T C C
T G G T C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A T C T T
C G G A A A C A T C G T C G A C G A A G T C G C A T A C C A C G A A A A G T A C
C C G A C A A T C T A C C A C C T G A G A A A G A A G C T G G T C G A C A G C A
C A G A C A A G G C A G A C C T G A G A C T G A T C T A C C T G G C A C T G G C
A C A C A T G A T C A A G T T C A G A G G A C A C T T C C T G A T C G A A G G A
G A C C T G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G T C G A C A A G C T G T T C A
T C C A G C T G G T C C A G A C A T A C A A C C A G C T G T T C G A A G A A A A
C C C G A T C A A C G C A A G C G G A G T C G A C G C A A A G G C A A T C C T G
A G C G C A A G A C T G A G C A A G A G C A G A A G A C T G G A A A A C C T G A
T C G C A C A G C T G C C G G G A G A A A G A A G A A C G G A C T G T T C G G
A A A C C T G A T C G C A C T G A G C C T G G G A C T G A C A C C G A A C T T C
A A G A G C A A C T T C G A C C T G G C A G A A G A C G C A A A G C T G C A G C
T G A G C A A G G A C A C A T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T
G G C A C A G A T C G G A G A C C A G T A C G C A G A C C T G T T C C T G G C A
G C A A A G A A C C T G A G C G A C G C A A T C C T G C T G A G C G A C A T C C
T G A G A G T C A A C A C A G A A A T C A C A A A G G C A C C G C T G A G C G C
A A G C A T G A T C A A G A G A T A C G A C G A A C A C C A C C A G G A C C T G
A C A C T G C T G A A G G C A C T G G T C A G A C A G C A G C T G C C G G A A A
A G T A C A A G G A A A T C T T C T T C G A C C A G A G C A A G A A C G G A T A
C G C A G G A T A C A T C G A C G G A G G A G C A A G C C A G G A A G A A T T C
T A C A A G T T C A T C A A G C C G A T C C T G G A A A A G A T G G A C G G A A
C A G A A G A A C T G C T G G T C A A G C T G A A C A G A G A A G A C C T G C T
G A G A A A G C A G A G A A C A T T C G A C A A C G G A A G C A T C C C G C A C

10

20

30

40

50

CAGATCCACCTGGGAGAACTGCAACGCAATCCTGAGAAAGAC
AGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAAGGACAACAGAGAAAA
GATCGAAAAGATCCTGACATTTCAGAATCCCGTACTACGTC
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGA
AGAAGTCGTTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATC
GAAAGAATGACAAACTTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAA
AGGTCTCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCAC
AGTCTACAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAA
GGAATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAAACAGAAAG
AGGCAATCGTTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAAAGGT
CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATC
GAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACA
GATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAAC
GAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAG
AGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGC
TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTTCAGG
AAGACATCCAGAAGGCACAGGTTCAGCGGACAGGGAGACAG
CCTGCACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCA
ATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACG
AACTGGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAT
CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCAGACAACACAGAAG
GGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAG
AAGGAATCAAGGAACTGGGAAGGCCAGATCCTGAAGGAACA
CCCGGTTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACC
AGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGA
CCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTCTCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT
GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATC
ACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAG
GAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTTCATCAAGAG
ACAGCTGGTTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA
CAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAGTACGACGAAA
ACGACAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTTCATCACACTGAA
GAGCAAGCTGGTTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTT
TACAAGGTTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCAACGCAACG
ACGCATACCTGAACGCGAGTCGTCTGGAAACAGCACTGATCAA
GAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGAC
TACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCG
AACAGGAAATCGGAAAGGCACAAGCAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTG
GCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAA
ACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAAGAGA

10

20

30

40

50

CTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGCAGGTC
AACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCA
GCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCT
GATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA
GGATTTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTCTGGTTCG
TCGCAAAGGTCGAAAAGGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG
CGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGC
AGCTTTCGAAAAGAACCCTGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGG
GATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
GAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAGA
ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCGAGAAGGGGAAACGAAC
TGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAAACTTCTCTGTACCTGGC
AAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCCGGAAGACAAC
GAACAGAAAGCAGCTGTTTCGTTCGAACAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAG
AGTCATCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAGGTCCTGAGC
GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGG
CAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAACCTGGG
AGCACCCGGCAGCATTTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGAC
AGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTCTGGACGCAA
CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG
AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC
CTGGCAGCAAAGAGAGAAGCAGAAACAACATAG

330

開始コドンおよび終止コドンを有する、NLS2を有するCas9のオープンリーディングフレーム

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGA
ACAAACAGCGTCGGATGGGCGAGTCATCACAGACGAATACA
AGGTCCTCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA
CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTG
TTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGA
GAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAT
CTGCTACCTGCAGGAAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAG
GTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC
TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTT
CGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTAC
CCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCA
CAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC
ACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGA
GACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAA
CCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTG
AGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGA
TCGACACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCCGG
AAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCGAGACCTGTTCTCTGGCA
GCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC
TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGC

10

20

30

40

50

AAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCAGGACCTG
ACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAA
AGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATA
CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCT
TACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCT
GAGAAAGCAGAGAAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCAC
CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGAC
AGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAA
GATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTC
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGA
AGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATC
GAAAGAATGACAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAA
AGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCAC
AGTCTACAACGAACCTGACAAGGTCAAGTACGTCACAGAA
GGAATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAAACAGAAAG
AGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAAAGGT
CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATC
GAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACA
GATTCAACGCAAGCCTGGGGAACATACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAAC
GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAG
AGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGC
TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGG
AAGACATCCAGAAGGCACAGGTTCAGCGGACAGGGAGACAG
CCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCA
ATCAAGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACG
AACTGGTCAAGGTTCATGGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAT
CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAACCAAGACAACACAGAAG
GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAATCGAAG
AAGGAATCAAGGAACTGGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACA
CCCGGTTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACC
AGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGA
CCACATCGTCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGTCCCAGCGAAGAAGTCTGTC AAGAAGAT
GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATC
ACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCGAGAGAGAG
GAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCGAGGATTCATCAAGAG
ACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA
CAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAGTACGACGAAA
ACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTTCATCACACTGAA
GAGCAAGCTGGTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCT
TACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCGCACACG

10

20

30

40

50

ACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAA
GAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTCGTCTACGGAGAC
TACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG
AACAGGAAATCGGAAAGGCCAACAGCAAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTG
GCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCCTGATCGAAACAA
ACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGA
CTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTC
AACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCA
GCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCT
GATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA
GGATTTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTCTGGTCG
TCGCAAAGGTCTGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG
CGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGC
AGCTTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGG
GATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
GAAGTACAGCCTGTTCTGAACCTGGAAAACGGAAAGAAAGAGA
ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAAC
TGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTCTGTACCTGGC
AAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAAC
GAACAGAAGCAGCTGTTCTGTCGAACAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAG
AGTCATCCTGGGCAGACGCAAAACCTGGACAAGGTCCTGAGC
GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGG
CAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAACCTGGG
AGCACCCGGCAGCATTTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGAC
AGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAA
CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG
AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGGAGACGGAGGGAGGAAGC
CAGGCAGCAAAGAGAAAGCAGAAACAACATAG

10

20

30

331

開始コドンおよび終止コドンを有する、NLS3を有するCas9のオープンリーディングフレーム

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGA
ACAAACAGCGTCGGATGGGCGAGTCATCACAGACGAATACA
AGGTCCTCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA
CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTG
TTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGA
GAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAGAACAGAAT
CTGCTACCTGCAGGAAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAG
GTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC
TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTT
CGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCAACGAAAAGTAC
CCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCA
CAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC
ACACATGATCAAGTTTCAAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGA
GACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAA
CCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGGCAATCCTG
AGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGA

40

50

TCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAAGAACGGACTGTTTCGG
AAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCACAGATCGGAGACCAGTACGACAGACCTGTTCTCTGGCA
GCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC
TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCCACCGCTGAGCGC
AAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCAACAGGACCTG
ACACTGCTGAAGGCCACTGGTTCAGACAGCAGCTGCCGGAAA
AGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATA
CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCT
GAGAAAGCAGAGAAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCAC
CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGAC
AGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAA
GATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTC
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGA
AGAAGTCGTTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATC
GAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAA
AGGTCTCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCAC
AGTCTACAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAA
GGAATGAGAAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAAACAGAAAG
AGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGT
CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATC
GAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACA
GATTC AACGCAAGCCTGGGGAACATACCAACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAAC
GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAG
AGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGC
TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGG
AAGACATCCAGAAGGCACAGGTTCAGCGGACAGGGAGACAG
CCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCA
ATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACG
AACTGGTCAAGGTTCATGGGAAAGACACAAGCCGGAAAACAT
CGTCATCGAAAATGGCAAGAGAAACCAGACAACACAGAAG
GGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAG
AAGGAATCAAGGAACCTGGGAAAGCCAGATCCTGAAGGAACA
CCCGGTTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACC
AGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGA
CCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTCTCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT
GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATC

10

20

30

40

50

ACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAAGGCGAGAGAGAG
GAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCGAGGATTCATCAAGAG
ACAGCTGGTTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA
CAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAA
ACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTTCATCACACTGAA
GAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTTC
TACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACACGCAACG
ACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAA
GAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGAC
TACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG
AACAGGAAATCGGAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTG
GCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAA
ACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGA
CTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTC
AACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCA
GCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCT
GATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA
GGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTCTGGTCG
TCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG
CGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGC
AGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGG
GATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
GAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAGA
ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAAGAAGGGAAACGAAC
TGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGC
AAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAAC
GAACAGAAAGCAGCTGTTTCGTTCGAACAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAG
AGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGC
GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGG
CAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAACCTGGG
AGCACCGGCAGCATTCAGTACTTTCGACACAACAATCGAC
AGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTCTGGACGCAA
CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG
AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGGAGACGGAGGAGGAAGC
CCGGCACCGGCAAAGAGAGAGAAAGAAACAACATAG

332

開始コドンおよび終止コドンを有する、NLS4を有するCas9のオープンリーディングフレーム

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGA
ACAAACAGCGTCGGATGGGCGAGTCATCACAGACGAATACA
AGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA
CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTG
TTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGA
GAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAGAACAAGAAT
CTGCTACCTGCAGGAAATCTTTCAGCAAACGAAATGGCAAAG
GTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC
TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTT
CGGAACAATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTAC

CCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCA
CAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCAGCTGGC
ACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGA
GACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAA
CCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTG
AGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGA
TCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGG
AAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTTCCTGGCA
GCAAAGAACCCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC
TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGC
AAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCGAGGACCTG
ACACTGCTGAAGGCACCTGGTTCAGACAGCAGCTGCCGGAAA
AGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATA
CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCT
TACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCT
GAGAAAGCAGAGAACAATTCGACAACGGAAGCATCCCGCAC
CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGAC
AGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAA
GATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTC
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGA
AGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATC
GAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAA
AGGTCTCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC
AGTCTACAACGAACCTGACAAGAGGTCAAGTACGTCACAGAA
GGAAATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAAACAGAA
AGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGT
CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATC
GAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCAAGACA
GATTCAACGCAAGCCTGGGGAACATACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAAC
GAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAG
AGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGC
TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGG
AAGACATCCAGAAGGCACAGGTTCAGCGGACAGGGAGACAG
CCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCA
ATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACG
AACTGGTCAAGGTTCATGGGAAAGACACAAGCCGGAAAACAT
CGTCATCGAAAATGGCAAGAGAAAAACCAGACAACACAGAAG
GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAG
AAGGAATCAAGGAACTGGGAAAGCCAGATCCTGAAGGAACA

10

20

30

40

50

C C C G G T C G A A A A C A C A C A G C T G C A G A A C G A A A A G C T G T A C
 C T G T A C T A C C T G C A G A A C G G A A G A G A C A T G T A C G T C G A C C
 A G G A A C T G G A C A T C A A C A G A C T G A G C G A C T A C G A C G T C G A
 C C A C A T C G T C C C G C A G A G C T T C C T G A A G G A C G A C A G C A T C
 G A C A A C A A G G T C C T G A C A A G A A G C G A C A A G A A C A G A G G A A
 A G A G C G A C A A C G T C C C G A G C G A A G A A G T C G T C A A G A A G A T
 G A A G A A C T A C T G G A G A C A G C T G C T G A A C G C A A A G C T G A T C
 A C A C A G A G A A A G T T C G A C A A C C T G A C A A A G G C A G A G A G A G
 G A G G A C T G A G C G A A C T G G A C A A G G C A G G A T T C A T C A A G A G
 A C A G C T G G T C G A A A C A A G A C A G A T C A C A A A G C A C G T C G C A
 C A G A T C C T G G A C A G C A G A A T G A A C A C A A A G T A C G A C G A A A
 A C G A C A A G C T G A T C A G A G A A G T C A A G G T C A T C A C A C T G A A
 G A G C A A G C T G G T C A G C G A C T T C A G A A A G G A C T T C C A G T T C
 T A C A A G G T C A G A G A A A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C A C A C G
 A C G C A T A C C T G A A C G C A G T C G T C G G A A C A G C A C T G A T C A A
 G A A G T A C C C G A A G C T G G A A A G C G A A T T C G T C T A C G G A G A C
 T A C A A G G T C T A C G A C G T C A G A A A G A T G A T C G C A A A G A G C G
 A A C A G G A A A T C G G A A A G G C A A C A G C A A A G T A C T T C T T C T A
 C A G C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C A G A A A T C A C A C T G
 G C A A A C G G A G A A A T C A G A A A G A G A C C G C T G A T C G A A A C A A
 A C G G A G A A A C A G G A G A A A T C G T C T G G G A C A A G G G A A G A G A
 C T T C G C A A C A G T C A G A A A G G T C C T G A G C A T G C C G C A G G T C
 A A C A T C G T C A A G A A G A C A G A A G T C C A G A C A G G A G G A T T C A
 G C A A G G A A A G C A T C C T G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C T
 G A T C G C A A G A A A G A A G G A C T G G G A C C C G A A G A A G T A C G G A
 G G A T T C G A C A G C C C G A C A G T C G C A T A C A G C G T C C T G G T C G
 T C G C A A A G G T C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G
 C G T C A A G G A A C T G C T G G G A A T C A C A A T C A T G G A A A G A A G C
 A G C T T C G A A A A G A A C C C G A T C G A C T T C C T G G A A G C A A A G G
 G A T A C A A G G A A G T C A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C
 G A A G T A C A G C C T G T T C G A A C T G G A A A A C G G A A G A A A G A G A
 A T G C T G G C A A G C G C A G G A G A A C T G C A G A A G G G A A A C G A A C
 T G G C A C T G C C G A G C A A G T A C G T C A A C T T C C T G T A C C T G G C
 A A G C C A C T A C G A A A A G C T G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C
 G A A C A G A A G C A G C T G T T C G T C G A A C A G C A C A A G C A C T A C C
 T G G A C G A A A T C A T C G A A C A G A T C A G C G A A T T C A G C A A G A G
 A G T C A T C C T G G C A G A C G C A A A C C T G G A C A A G G T C C T G A G C
 G C A T A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A T C A G A G A A C A G G
 C A G A A A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C A C T G A C A A A C C T G G G
 A G C A C C G G C A G C A T T C A A G T A C T T C G A C A C A A C A A T C G A C
 A G A A A G A G A T A C A C A A G C A C A A A G G A A G T C C T G G A C G C A A
 C A C T G A T C C A C C A G A G C A T C A C A G G A C T G T A C G A A A C A A G
 A A T C G A C C T G A G C C A G C T G G G A G G A G A C G G A G G A G G A A G C
 C A G G C A G C A A A G A G A C C G A G A A C A A C A T A G

3 3 3

開始コドンおよび終止コドンを有する、N L S 5を有するC a s 9のオープンリーディングフレーム

A T G G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G A C T G G A C A T C G G A
 A C A A A C A G C G T C G G A T G G G C A G T C A T C A C A G A C G A A T A C A
 A G G T C C C G A G C A A G A A G T T C A A G G T C C T G G G A A A C A C A G A

10

20

30

40

50

CAGACACAGCATCAAGAAGAAACCTGATCGGAGCACTGCTG
TTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGA
GAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAT
CTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGC AAAAG
GTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC
TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTT
CGGA AACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTAC
CCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCA
CAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC
ACACATGATCAAGTTCAAGAGGACACTTCTGATCGAAGGA
GACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTCCAGACATAACAACCAAGCTGTTTCGAAGAAA
CCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTG
AGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGA
TCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCCGG
AAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCACAGATCGGAGACCAGTACGACAGACCTGTTCTCTGGCA
GCAAAGA AACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC
TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGC
AAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAAGGACCTG
ACACTGCTGAAGGC ACTGGTTCAGACAGCAGCTGCCGGAAA
AGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGGATA
CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTC
TACAAGTTTCAATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCT
GAGAAAGCAGAGAAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCAC
CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGAC
AGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAA
GATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTC
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGA ACTTCGA
AGAAGTCGTGACAAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCAATC
GAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAA
AGGTCTCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC
AGTCTACAACGA ACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAA
GGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAAACAGAAAG
AGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACA AACAGAAAGGT
CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATC
GAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACA
GATTC AACGCAAGCCTGGGGAACATACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAAC
GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGT CATGAAGCAGCTGAAG
AGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGC
TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGG

10

20

30

40

50

AAGACATCCAGAAGGCCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAG
CCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCCGGCA
ATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGACG
AACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAT
CGTCATCGAAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG
GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAATGAAGAGAATCGAAG
AAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACA
CCCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGGAAGAGACATGTACGTGACCC
AGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGCA
CCACATCGTCCCCGCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGTCCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT
GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATC
ACACAGAGAAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCGAGAGAGAG
GAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCGAGGATTTCATCAAGAG
ACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA
CAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAGTACGACGAAA
ACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAA
GAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTTC
TACAAGGTCAGAGAAAATCAACAACCTACCACCACGCACACG
ACGCATACCTGAACGCAGTCGTGGAACAGCACTGATCAA
GAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTACGGAGAC
TACAAGGTCCTACGACGTGAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG
AACAGGGAATTCGGAAAGGCCAACAGCAAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAAATCACACTG
GCAAACGGAGAAAATCAGAAAGAGACCCTGATCGAAACAA
ACGGAGAAAACAGGAGAAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGA
CTTCGCAACAGTCAGAAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTC
AACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCA
GCAAGGGAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCT
GATCGCAAAGAAAAGAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA
GGATTTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTTCG
TCGCAAAGGTCGAAAAGGGGAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG
CGTCAAGGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGC
AGCTTTCGAAAAGAACCCTGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGG
GATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
GAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAGA
ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAAGAGGGGAACGAAC
TGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGC
AAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCCGGAAGACAAC
GAACAGAAGCAGCTGTTTCGTGCAACAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAG
AGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGC
GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGG
CAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAAACCTGGG
AGCACCCGGCAGCATTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGAC
AGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAA
CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAG
AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGGAGACGGAGGGAGGAAGC

10

20

30

40

50

AGAGCAGCAAAGAGACCGAGAACCAATAG

334

開始コドンおよび終止コドンを有する、NLS6を有するCas9のオープンリーディングフレーム

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGA
ACAAACAGCGTCGGATGGGCGAGTCATCACAGACGAATACA
AGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCTTGGGAAACACAGA
CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTG
TTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGA
GAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAGAACAGAAT
CTGCTACCTGCGAGGAAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAG
GTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC
TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTT
CGGAACAATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTAC
CCGACAATCTACCACTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCA
CAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC
ACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGA
GACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAA
CCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTG
AGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGA
TCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCCG
AAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAGCTGCGAGC
TGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCA
GCAAAGAACCCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC
TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCAACCGCTGAGCGC
AAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACACCACCAAGGACCTG
ACACTGCTGAAGGCACCTGGTTCAGACAGCAGCTGCCGGAAA
AGTACAAGGAAATCTTCTTTCGACCAGAGCAAGAACGGATA
CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCT
GAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCAC
CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGAC
AGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAA
GATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTC
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGA
AGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATC
GAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCCTGCCGAACGAAA
AGGTCTCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC
AGTCTACAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAA
GGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAAACAGAAAG
AGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAAAGGT
CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATC
GAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACA
GATTCAACGCAAGCCTGGGAAACATACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAAAC

10

20

30

40

50

GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAG
AGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGC
TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAAC
TTCATGACAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGG
AAGACATCCAGAAGGACACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAG
CCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGGCAGGAAGCCCGGCA
ATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACG
AACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAT
CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAACAGACAACACAGAAG
GGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAG
AAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACA
CCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGAAAGAGACATGTACGTCGACC
AGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGA
CCACATCGTCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGTCCCAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT
GAAGAATACTGAGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATC
ACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAG
GAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTTCATCAAGAG
ACAGCTGGTTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA
CAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAGGTACGACGAAA
ACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAA
GAGCAAGCTGGTTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTTCAGTTT
TACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCAACCACGCACACG
ACGCATACCTGAACGCAGTCGTTCGGAACAGCACTGATCAA
GAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGAC
TACAAGGTCCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG
AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTA
CAGCAAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTG
GCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCCTGATCGAAACAA
ACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGA
CTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGACAGGTC
AACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCA
GCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCT
GATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA
GGATTTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTTCG
TCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG
CGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAAGC
AGCTTCGAAAAGAAACCCGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGG
GATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
GAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAGA
ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAAC
TGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGC
AAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAAC
GAACAGAAAGCAGCTGTTTCGTTCGAACAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAG

10

20

30

40

50

AGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGC
GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGG
CAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGG
AGCACCCGGCAGCATTC AAGTACTTTCGACACAACAATCGAC
AGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAA
CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG
AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC
GCAGCAGCAAAGAGAAGCTGGAGCATGGCAGCATAG

335

開始コドンおよび終止コドンを有する、NLS7を有するCas9のオープンリーディングフレーム

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGA
ACAAACAGCGTCGGATGGGCGAGTCATCACAGACGAATACA
AGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA
CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTG
TTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGA
GAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAGAACAGGAAT
CTGCTACCTGCAGGAAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAG
GTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC
TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTT
CGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTAC
CCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCA
CAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC
ACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGA
GACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAA
CCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTG
AGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGA
TCGCAACAGCTGCCGGGAGAAAAAGAAGAACGGACTGTTCCGG
AAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCCGAACCTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCA
GCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC
TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCCGCTGAGCGC
AAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACACCACAGGACCTG
ACACTGCTGAAGGCACTGGTTCAGACAGCAGCTGCCGGAAA
AGTACAAGGAAATCTTCTTTCGACCCAGAGCAAGAACGGATA
CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTC
TACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCT
GAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCAC
CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGAC
AGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAA
GATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTC
GGACCCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCCGTGGAACTTTCGA
AGAAGTCGTGACAAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATC
GAAAGAATGACAAACTTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAA
AGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC

10

20

30

40

50

AGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAA
GGAATGAGAAAGCCGGCATTTCCTGAGCGGAGAACAGAAAG
AGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGT
CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATC
GAATGCTTTCGACAGCGTCTGAAATCAGCGGAGTCTGAAGACA
GATTCAACGCAAGCCTGGGGAACATACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTTCCTGGACAACGAAGAAAAC
GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAG
AGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGC
TGATCAACGGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAAC
TTCATGACAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGG
AAGACATCCAGAAGGCACAGGTTCAGCGGACAGGGAGACAG
CCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGGCAGGAAGCCCGGCA
ATCAAGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACG
AACTGGTCAAGGTTCATGGGAAAGACACAAGCCGGAAAACAT
CGTCATCGAAAATGGCAAGAGAAAAACCAGACAACACAGAAG
GGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAATCGAAG
AAGGAATCAAGGAACTGGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACA
CCCGGTCTGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGGAAGAGACATGTACGTCGACC
AGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGA
CCACATCGTCCCAGAGCTTTCCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGTCCCAGCGAAGAAGTCTGTCAAGAAGAT
GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATC
ACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCGAGAGAGAG
GAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCGAGGATTCATCAAGAG
ACAGCTGGTCTGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA
CAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAGTACGACGAAA
ACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTTCATCACTGAA
GAGCAAGCTGGTTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTT
TACAAGGTTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACG
ACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAAACAGCACTGATCAA
GAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGAC
TACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG
AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTG
GCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCCTGATCGAAACAA
ACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGA
CTTCGCAACAGTCAAGAAAGGTCCCTGAGCATGCCGCAAGGTC
AACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCA
GCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCT
GATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA
GGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCCTGGTCTG
TCGCAAAGGTCTGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG
CGTCAAGGAACTGCTGGGAAATCACAAATCATGGAAAGAAAGC
AGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTTCCTGGAAGCAAAGG

10

20

30

40

50

GATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
GAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGA
ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAAC
TGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGC
AAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAAC
GAACAGAAAGCAGCTGTTTCGTTCGAACAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAG
AGTCATCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAGGTCCTGAGC
GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGG
CAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAAACCTGGG
AGCACCCGGCAGCATTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGAC
AGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAA
CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG
AATCGACCTGAGCCAGCTGGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC
GCAGCAGCAAAGAGAGTCTGGAGCATGGCATTCTAG

336

開始コドンおよび終止コドンを含む、NLS8を含むCas9のオープンリーディングフレーム

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGA
ACAAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCAATCACAGACGAATACA
AGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA
CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTG
TTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGA
GAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAGAACAGAAAT
CTGCTACCTGCGAGGAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAG
GTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC
TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTT
CGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTAC
CCGACAATCTACCACTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCA
CAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC
ACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGA
GACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAA
CCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTG
AGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGA
TCGACACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCCGG
AAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCA
GCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC
TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGC
AAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACACCACAGGACCTG
ACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGGAAA
AGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATA
CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCT
TACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CAGAAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCT
GAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCAC
CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGAC

10

20

30

40

50

AGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAA
GATCGAAAAGATCCTGACATTTCAGAATCCCGTACTACGTC
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGA
AGAAGTCGTTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATC
GAAAGAATGACAAACTTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAA
AGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCAC
AGTCTACAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAA
GGAATGAGAAAGCCGGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAG
AGGCAATCGTTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAAAGGT
CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATC
GAATGCTTCGACAGCGTTCGAAATCAGCGGAGTTCGAAGACA
GATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAAC
GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAG
AGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGC
TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGG
AAGACATCCAGAAGGCACAGGTTCAGCGGACAGGGAGACAG
CCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGGCAGGAAGCCCGGCA
ATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTTCGTTCGACG
AACTGGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAT
CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCAGACAACACAGAAG
GGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAG
AAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACA
CCCGGTTCGAAAACACACAGCTTCGAGAACGAAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGGAAGAGACATGTACGTCGACC
AGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGA
CCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTTCGTCAAGAAGAT
GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATC
ACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAG
GAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAG
ACAGCTGGTTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA
CAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAGGTACGACGAAA
ACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTTCATCACACTGAA
GAGCAAGCTGGTTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTTC
TACAAGGTTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCAACGCACACG
ACGCATACCTGAACGCAGTCGTTCGGAACAGCACTGATCAA
GAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGAC
TACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG
AACAGGAATTCGGAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTG
GCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCCTGATCGAAACAA
ACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGA
CTTCGCAACAGTCAAGAAAGGTCTCTGAGCATGCCGCGAGGTC

10

20

30

40

50

AACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCA
 GCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCT
 GATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA
 GGATTTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCCTGGTTCG
 TCGCAAAGGTGGAAGAAGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG
 CGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGC
 AGCTTTCGAAAAGAACCCTGATCGACTTCTCTGGAAAGCAAAGG
 GATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
 GAAGTACAGCCTGTTTCGAACCTGGAAAACGGAAAGAAAGAGA
 ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGACAGAAGGGAAACGAAC
 TGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTCTGTACCTGGC
 AAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAAC
 GAACAGAAAGCAGCTGTTTCGTTCGAACAGCACAAAGCACTACC
 TGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAG
 AGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCTCTGAGC
 GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGG
 CAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAAACCTGGG
 AGCACCGGCAGCATTTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGAC
 AGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTCTGGACGCAA
 CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG
 AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC
 GCAGCAGCAAAGAGAAAGCTGGAGCATGGCATTTCTAG

337

開始コドンおよび終止コドンを有する、NLS9を有するCas9のオープンリーディングフレーム

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGGA
 ACAAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACA
 AGGTCCCAGAGCAAGAAGTTCAAGGTCTCTGGGAAACACAGA
 CAGACACAGCATCAAGAAGAAACCTGATCGGAGCACTGCTG
 TTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGA
 GAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAGAACAAGAAAT
 CTGCTACCTGCAGGAAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAG
 GTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC
 TGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTT
 CGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTAC
 CCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTTCGACAGCA
 CAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC
 ACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGA
 GACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTGACAAAGCTGTTTCA
 TCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAA
 CCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTG
 AGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGA
 TCGCACAGCTGCCGGGAGAAAGAAGAACGGACTGTTTCGG
 AAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCCGAACCTTC
 AAGAGCAACTTTCGACCTGGGCAGAAAGACGCAAAGCTGCAGC
 TGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
 GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCA
 GCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC
 TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGC
 AAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACACCACCAGGACCTG

10

20

30

40

50

ACACTGCTGAAGGCACTGGTTCAGACAGCAGCTGCCGGAAA
AGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATA
CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCT
TACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCT
GAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCAC
CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGAC
AGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAA
GATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTC
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGA
AGAAGTCGTTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATC
GAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCCTGCCGAACGAAA
AGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC
AGTCTACAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAA
GGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGA
AGGCAATCGTTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAAAGGT
CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAAGACTACTTCAAGAAGATC
GAATGCTTTCGACAGCGTTCGAAATCAGCGGAGTTCGAAGACA
GATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAAAC
GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAG
AGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGC
TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAAC
TTCATGACAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGG
AAGACATCCAGAAGGCAACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAG
CCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGGCAGGAAGCCCGGCA
ATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTTCGACG
AACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAAACAT
CGTCATCGAAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAG
GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAG
AAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACA
CCCGGTTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTTCGACC
AGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGA
CCACATCGTCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGTCCCAGCGAAGAAGTTCGTCAAGAAGAT
GAAGAAGTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATC
ACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCAAGAGAGAG
GAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAAGGATTTCATCAAGAG
ACAGCTGGTTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA
CAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAGTACGACGAAA
ACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAA
GAGCAAGCTGGTTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTTC
TACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACACGACACG
ACGCATACCTGAACGCAGTCGTTCGGAACAGCACTGATCAA

10

20

30

40

50

GAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTACGGAGAC
TACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG
AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTG
GCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCCTGTGATCGAAACAA
ACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGA
CTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTC
AACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCA
GCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCT
GATCGCAAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA
GGATTTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGCTCG
TCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG
CGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGC
AGCTTCGAAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAAGG
GATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
GAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAGA
ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAAC
TGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGC
AAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCCGGAAGACAAC
GAACAGAAAGCAGCTGTTTCGTGCAACAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAG
AGTCATCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAGGTCCTGAGC
GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGG
CAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACTGACAAACCTGGG
AGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGAC
AGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAA
CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG
AATCGACCTGAGCCAGCTGGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC
GCAGCAGCAAAGAGAAAGTACTTTCGCAGCATAG

338

開始コドンおよび終止コドンを含む、NLS10を含むCas9のオープンリーディングフレーム

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGA
ACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACA
AGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA
CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTG
TTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGA
GAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAGAACAGAAAT
CTGCTACCTGCAGGAAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAG
GTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC
TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTT
CGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTAC
CCGACAATCTACCACTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCA
CAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC
ACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGA
GACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAA
CCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTG
AGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGA
TCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCCG

10

20

30

40

50

AAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCA
GCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC
TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGC
AAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACACCACCAGGACCTG
ACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAA
AGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATA
CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTTC
TACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CAGAAGAACCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCT
GAGAAAGCAGAGAACATTCGACAAACGGAAAGCATCCCGCAC
CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGAC
AGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAA
GATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTC
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGA
AGAAGTCGTGACAAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATC
GAAAGAATGACAAACTTCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAA
AGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC
AGTCTACAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAA
GGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAG
AGGCAATCGTTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGT
CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATC
GAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACA
GATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAAAC
GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
CGCACACCTGTTTCGACGACAAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAG
AGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGC
TGATCAACGGAAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCGAAGG
AAGACATCCAGAAGGCACAGGTTCAGCGGACAGGGAGACAG
CCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCA
ATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACG
AACTGGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAT
CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAACCAGACAACACAGAAG
GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAATCGAAG
AAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACA
CCCGGTCTGAAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTAC
CTGTACTACCTGCAGAACGGAAAGAGACATGTACGTGACCC
AGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGA
CCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTCTCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCTGTCGAAGAAGAT
GAAGAATACTGAGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATC
ACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAG

10

20

30

40

50

G A G G A C T G A G C G A A C T G G A C A A G G C A G G A T T C A T C A A G A G
A C A G C T G G T C G A A A C A A G A C A G A T C A C A A A G C A C G T C G C A
C A G A T C C T G G A C A G C A G A A T G A A C A C A A A G T A C G A C G A A A
A C G A C A A G C T G A T C A G A G A A G T C A A G G T C A T C A C A C T G A A
G A G C A A G C T G G T C A G C G A C T T C A G A A A G G A C T T C C A G T T C
T A C A A G G T C A G A G A A A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C A C A C G
A C G C A T A C C T G A A C G C A G T C G T C G G A A C A G C A C T G A T C A A
G A A G T A C C C G A A G C T G G A A A G C G A A T T C G T C T A C G G A G A C
T A C A A G G T C T A C G A C G T C A G A A A G A T G A T C G C A A A G A G C G
A A C A G G A A A T C G G A A A G G C A A C A G C A A A G T A C T T C T T C T A
C A G C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C A G A A A T C A C A C T G
G C A A A C G G A G A A A T C A G A A A G A G A C C G C T G A T C G A A A C A A
A C G G A G A A A C A G G A G A A A T C G T C T G G G A C A A G G G A A G A G A
C T T C G C A A C A G T C A G A A A G G T C C T G A G C A T G C C G C A G G T C
A A C A T C G T C A A G A A G A C A G A A G T C C A G A C A G G A G G A T T C A
G C A A G G A A A G C A T C C T G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C T
G A T C G C A A G A A A G A A G G A C T G G G A C C C G A A G A A G T A C G G A
G G A T T C G A C A G C C C G A C A G T C G C A T A C A G C G T C C T G G T C G
T C G C A A A G G T C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G
C G T C A A G G A A C T G C T G G G A A T C A C A A T C A T G G A A A G A A G C
A G C T T C G A A A A G A A C C C G A T C G A C T T C C T G G A A G C A A A G G
G A T A C A A G G A A G T C A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C
G A A G T A C A G C C T G T T C G A A C T G G A A A A C G G A A G A A A G A G A
A T G C T G G C A A A G C G C A G G A G A A C T G C A G A A G G G A A A C G A A C
T G G C A C T G C C G A G C A A G T A C G T C A A C T T C C T G T A C C T G G C
A A G C C A C T A C G A A A A G C T G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C
G A A C A G A A G C A G C T G T T C G T C G A A C A G C A C A A G C A C T A C C
T G G A C G A A A T C A T C G A A C A G A T C A G C G A A T T C A G C A A G A G
A G T C A T C C T G G C A G A C G C A A A C C T G G A C A A G G T C C T G A G C
G C A T A C A A C A A G C A C A G A G A C A A A G C C G A T C A G A G A A C A G G
C A G A A A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C A C T G A C A A A C C T G G G
A G C A C C G G C A G C A T T C A A G T A C T T C G A C A C A A C A A T C G A C
A G A A A G A G A T A C A C A A G C A C A A A G G A A G T C C T G G A C G C A A
C A C T G A T C C A C C A G A G C A T C A C A G G A C T G T A C G A A A C A A G
A A T C G A C C T G A G C C A G C T G G G A G G A G A C G G A G G A G G A A G C
A G A G C A G C A A A G A G A A A G G C A T T C G C A G C A T A G

3 3 9

開始コドンおよび終止コドンを有する、N L S 1 1を有するC a s 9のオープンリー
ディングフレーム

A T G G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G A C T G G A C A T C G G A
A C A A A C A G C G T C G G A T G G G C A G T C A T C A C A G A C G A A T A C A
A G G T C C C G A G C A A G A A G T T C A A G G T C C T G G G A A A C A C A G A
C A G A C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G A G C A C T G C T G
T T C G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C T G A A G A
G A A C A G C A A G A A G A A G A T A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A T
C T G C T A C C T G C A G G A A A T C T T C A G C A A C G A A A T G G C A A A G
G T C G A C G A C A G C T T C T T C C A C A G A C T G G A A G A A A G C T T C C
T G G T C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A T C T T
C G G A A A C A T C G T C G A C G A A G T C G C A T A C C A C G A A A A G T A C
C C G A C A A T C T A C C A C C T G A G A A A G A A G C T G G T C G A C A G C A

10

20

30

40

50

CAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC
ACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGA
GACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCA
TCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAA
CCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGGCAATCCTG
AGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGA
TCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAAGAAACGGACTGTTTCGG
AAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTC
AAGAGCAACTTTCGACCTGGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGC
TGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT
GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTTCCTGGCA
GCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC
TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGC
AAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACACCACCGAGGACCTG
ACACTGCTGAAGGCACTGGTTCAGACAGCAGCTGCCGGAAA
AGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATA
CGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTC
TACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAA
CAGAAGAACCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCT
GAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCAC
CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGAC
AGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAA
GATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTC
GGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA
CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGA
AGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATC
GAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAA
AGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC
AGTCTACAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAA
GGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAG
AGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAAAGGT
CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATC
GAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACA
GATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAAC
GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGT
TCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAG
AGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGC
TGATCAACGGAAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAT
CCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAAC
TTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGG
AAGACATCCAGAAGGCGACAGGTTCAGCGGACAGGGAGACAG
CCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCA
ATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACG
AACTGGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAT
CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCAGACAACACAGAAG
GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAATCGAAG
AAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACA
CCCGGTTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTAC

10

20

30

40

50

CTGTACTACCTGCAGAACGGGAAGAGACATGTACGTCGACC
AGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGA
CCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAAGGACGACAGCATC
GACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA
AGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCTGTCAGAAGAT
GAAGAAGTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATC
ACACAGAGAAAGTTGACAAACCTGACAAAGGCAGAGAGAG
GAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAG
ACAGCTGGTTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCA
CAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAA
ACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAA
GAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTT
TACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACG
ACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAA
GAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTACGGAGAC
TACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG
AACAGGAATTCGGAAGGCACAACAGCAAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTG
GCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAA
ACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGA
CTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTC
AACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCA
GCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCT
GATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA
GGATTTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGCTCG
TCGCAAAGGTCGAAAAGGGGAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG
CGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAAGC
AGCTTCGAAAAAGAACCCGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGG
GATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC
GAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAGA
ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCGAGAAGGGAAACGAAC
TGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGC
AAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCCGGAAGACAAC
GAACAGAAAGCAGCTGTTCTGTCGAACAGCACAAAGCACTACC
TGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAG
AGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGC
GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGG
CAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAACCTGGG
AGCACCGGCAGCATTCAGGTACTTTCGACACAACAATCGAC
AGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTTGGACGCAA
CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG
AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC
AGAGCAGCAAAGAGAAAGTACTTTCGCAGTCTAG

340

ヒトにおいて一般的に高い発現を有するコドンを使用した、Cas9 ORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

CCTAAGAAAAAGCGGAAGGTCGACGGGGGATAAGAAAG
TACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGTGGGTT
GGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAA
GTTCAAGGTCCTGGGGAAACACCGATAGACACAGCATCAAG

10

20

30

40

50

AAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAA
CCGCAGAAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACG
CTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAG
ATCTTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTGACGACAGCTTCT
TCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCTGCTGGTGGAGGAGGACAA
GAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTCGAC
GAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATC
TGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAAAGTGAACAAGGCCGACCT
CAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCCATATGATCAAATTC
CGCGGACACTTCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCCTGATA
ACTCCGACGTGGATAAGCTTTTTCATTCAACTGGTGCAGAC
CTACAACCAACTGTTTCGAAGAAAACCCAATCAATGCTAGC
GGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCTGA
AGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGG
AGAGAAAAAGAACGGACTTTTTCGGCAAAGTGTGCTCTC
TCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACC
TGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTA
CGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTTGGCGAT
CAGTACGCGGATCTGTTCTTGCCTAAGAACCTTTTCGG
ACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGA
AATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGG
TACGACGAGCATCACCAAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGC
TCGTGAGACAGCAAAGTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTT
CTTCGACCAAGTCCAAGAATGGGTACGCAAGGGTACATCGAT
GGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTTCATCAAGC
CAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGT
CAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACC
TTTGACAACGGATCCATTTCCCAACCAGATCCATCTGGGTG
AGCTGCACGCCATCTTGCGGCGGCCAGGAGGACTTTTACCC
ATTCCTCAAGGACAACCAGGGAAGAAAGATCGAGAAAATCTG
ACGTTCCGCGATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGCG
GCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGA
AACCATCACTCCTTGGAAATTTTCGAGGAAGTTGTGGATAAG
GGAGCTTCGGCACAAAGCTTTCATCGAACGAATGACCAACT
TCGACAAGAATCTCCCAACGAGAAAGGTGCTTCTTAAGCA
CAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAAGT
ACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGG
CCTTTCTGTCCGGAGAACAGAAAGCAATTGTGATCT
GCTGTTCAAGACCAACCAGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTT
AAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTCGACTCAG
TGGAAATCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCT
GGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAAG
GACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAG
ATATCGTCCCTGACCTTGACCCCTTTTCGAGGATCGCGAGAT
GATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGAC
GATAAGGTCATGAACAACCTCAAGCGCCCGGTACACTG
GTTGGGGGCCGCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTTCG
CGATAAACAGAGCGGTAAAACCTATCCTGGATTTCTCTCAA
TCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACCTTCATGCAATTGATCC
ACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAAGC

10

20

30

40

50

ACAAAGTGTCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATC
GCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAAGAAAGGGAATTC
TGCAAACCTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGGTTCAT
GGGACGGGCACAAACCGGAGAAATATCGTGATTGAAATGGCC
CGAGAAAACAGACTACCCAGAAAGGGCCAGAAAAAACTCCC
GCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCT
GGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAAACACG
CAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAA
ATGGACGGGGACATGTACGTGGACCACAGAGCTGGACATCAA
TCGGTTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAG
TCCTTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGTGTTGA
CTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAAGTCAGATAATGTGCC
ATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGG
CAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTG
ACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGGCGGACTCTCAGAGCT
GGATAAGGCTGGATTTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACT
CGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTGGACTCCC
GCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCG
GGAAGTGAAGGTGATTACCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCTG
GACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTTACAAAGTGAGAGAAA
TCAACAACCTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGC
TGTGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTT
GAATCGGAGTTTGTGTACGGGAGACTACAAGGTCTACGACG
TGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAA
AGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAAC
TTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCA
GGAAGAGGCCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGGCGA
AATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGGACTTCGCAACTGTTTCGC
AAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAA
CCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCT
CCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAA
GACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGA
CTGTCGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAA
GGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTG
GGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTTCGAGAAGAACC
CGATTGATTTCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAA
GAAGGATCTGATCATCAAACCTCCCCAAGTACTCACTGTTTC
GAACTGGAAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCG
GAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAA
GTACGTCAACTTCTCTATCTTGTCTTCGCACTACGAAAAA
CTCAAAGGGTCAACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTT
TCGTGGAGCAGCACAAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGA
ACAAATCTCCGAGTTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGAC
GCCAACCTCGACAAAGTCCTGTCTGGCCTACAATAAGCATA
GAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCA
CTTGTTTCAACCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTC
AAGTACTTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACACGT
CCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCCTGATCCACCAAG
CATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTCTGCAG
CTGGGTGGCGAT

10

20

30

40

50

3 4 1

表4の長い半減期コドンを使用したCas9 ORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

G A C A A G A A G T A C T C T A T C G G T T T G G A C A T C G G T A C C
 A A C T C T G T C G G T T G G G C C G T C A T C A C C G A C G A A T A C A A G G
 T C C C A T C T A A G A A G T T C A A G G T C T T G G G T A A C A C C G A C A G
 A C A C T C T A T C A A G A A G A A C T T G A T C G G T G C C T T G T T G T T C
 G A C T C T G G T G A A A C C G C C G A A G C C A C C A G A T T G A A G A G A A
 C C G C C A G A A G A A G A T A C A C C A G A A G A A A G A A C A G A A T C T G
 C T A C T T G C A A G A A A T C T T C T C T A A C G A A A T G G C C A A G G T C
 G A C G A C T C T T T C T T C C A C A G A T T G G A A G A A T C T T T C T T G G
 T C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C A A T C T T C G G
 T A A C A T C G T C G A C G A A G T C G C C T A C C A C G A A A A G T A C C C A
 A C C A T C T A C C A C T T G A G A A A G A A G T T G G T C G A C T C T A C C G
 A C A A G G C C G A C T T G A G A T T G A T C T A C T T G G C C T T G G C C C A
 C A T G A T C A A G T T C A G A G G T C A C T T C T T G A T C G A A G G T G A C
 T T G A A C C C A G A C A A C T C T G A C G T C G A C A A G T T G T T C A T C C
 A A T T G G T C C A A A C C T A C A A C C A A T T G T T C G A A G A A A A C C C
 A A T C A A C G C C T C T G G T G T C G A C G C C A A G G C C A T C T T G T C T
 G C C A G A T T G T C T A A G A G C A G A A G A T T G G A A A A C T T G A T C G
 C C C A A T T G C C A G G T G A A A A G A A G A A C G G T T T G T T C G G T A A
 C T T G A T C G C C T T G T C T T T G G G T T T G A C C C C A A A C T T C A A G
 T C T A A C T T T C G A C T T G G C C G A A G A C G C C A A G T T G C A A T T G T
 C T A A G G A C A C C T A C G A C G A C G A C T T G G A C A A C T T G T T G G C
 C C A A A T C G G T G A C C A A T A C G C C G A C T T G T T C T T G G C C G C C
 A A G A A C T T G T C T G A C G C C A T C T T G T T G T C T G A C A T C T T G A
 G A G T C A A C A C C G A A A T C A C C A A G G C C C A T T G T C T G C C T C
 T A T G A T C A A G A G A T A C G A C G A A C A C C A C C A A G A C T T G A C C
 T T G T T G A A G G C C T T G G T C A G A C A A C A A T T G C C A G A A A A G T
 A C A A G G A A A T C T T C T T C G A C C A A T C T A A G A A C G G T T A C G C
 C G G T T A C A T C G A C G G T G G T G C C T C T C A A G A A G A A T T C T A C
 A A G T T C A T C A A G C C A A T C T T G G A A A A G A T G G A C G G T A C C G
 A A G A A T T G T T G G T C A A G T T G A A C A G A G A A G A C T T G T T G A G
 A A A G C A A A G A A C C T T C G A C A A C G G T T C T A T C C C A C A C C A A
 A T C C A C T T T G G G T G A A T T G C A C G C C A T C T T G A G A A G A C A A G
 A A G A C T T C T A C C C A T T C T T G A A G G A C A A C A G A G A A A A G A T
 C G A A A A G A T C T T G A C C T T C A G A A T C C C A T A C T A C G T C G G T
 C C A T T G G C C A G A G G T A A C A G C A G A T T C G C C T G G A T G A C C A
 G A A A G T C T G A A G A A A C C A T C A C C C C A T G G A A C T T C G A A G A
 A G T C G T C G A C A A G G G T G C C T C T G C C C A A T C T T T C A T C G A A
 A G A A T G A C C A A C T T C G A C A A G A A C T T G C C A A A C G A A A A G G
 T C T T G C C A A A G C A C T C T T T G T T G T A C G A A T A C T T C A C C G T
 C T A C A A C G A A T T G A C C A A G G T C A A G T A C G T C A C C G A A G G T
 A T G A G A A A G C C A G C C T T C T T G T C T G G T G A A C A A A A G A A G G
 C C A T C G T C G A C T T G T T G T T C A A G A C C A A C A G A A A G G T C A C
 C G T C A A G C A A T T G A A G G A A G A C T A C T T C A A G A A G A T C G A A
 T G C T T C G A C T C T G T C G A A A T C T C T G G T G T C G A A G A C A G A T
 T C A A C G C C T C T T T G G G T A C C T A C C A C G A C T T G T T G A A G A T
 C A T C A A G G A C A A G G A C T T C T T G G A C A A C G A A G A A A A C G A A
 G A C A T C T T G G A A G A C A T C G T C T T G A C C T T G A C C T T G T T C G

10

20

30

40

50

AAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGATTGAAGACCTACGC
C CACTTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAATTGAAGAGA
AGAAGATACACCGGTTGGGGTAGATTGAGCAGAAAGTTGA
TCAACGGGTATCAGAGACAAGCAATCTGGTAAGACCATCTT
GGACTTCTTGAAGTCTGACGGTTTTCGCCAACAGAAACTTC
ATGCAATTGATCCACGACGACTCTTTGACCTTCAAGGAAG
ACATCCAAAAGGCCCAAGTCTCTGGTCAAGGTGACTCTTT
GCACGAACACATCGCCAACTTGGCCGGTCTCCAGCCATC
AAGAAGGGTATCTTGCAAACCGTCAAGGTCGTCGACGAAT
TGGTCAAGGTCAATGGGTAGACACAAGCCAGAAAACATCGT
CATCGAAATGGCCAGAGAAAACCAAACCCAAAAGGGT
CAAAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAG
GTATCAAGGAATTGGGTTCTCAAATCTTGAAGGAACACCC
AGTCGAAAACACCCAAATTGCAAACGAAAAGTTGTACTTG
TACTACTTGCAAACCGGTAGAGACATGTACGTGACCCAAG
AATTGGACATCAACAGATTGTCTGACTACGACGTGACCA
CATCGTCCCACAATCTTTCTTGAAGGACGACTCTATCGAC
AACAAAGGTCTTGACCAGATCTGACAAGAACAGAGGTAAGT
CTGACAACGTCCCATCTGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAA
GAACTACTGGAGACAATTGTTGAACGCCAAGTTGATCACC
CAAAGAAAGTTCGACAACCTTGACCAAGGCCGAAAGAGGTG
GTTTGTCTGAATTGGACAAGGCCGGTTTTCATCAAGAGACA
ATTGGTTCGAAAACCAGACAATCACC AAGCACGTGCCCCAA
ATCTTGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAAAACG
ACAAGTTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACCTTGAAGTC
TAAGTTGGTCTCTGACTTTCAGAAAGGACTTCCAATTCTAC
AAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCAAGCCACGACG
CCTACTTGAACGCCGTCGTGCGGTACCGCCTTGATCAAGAA
GTACCCCAAAGTTGGAATCTGAATTCGTCTACGGTGACTAC
AAGGTCTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAGTCTGAAC
AAGAAATCGGTAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTC
TAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAAATCACCTTGGCC
AACGGTGAAATCAGAAAGAGACCATTGATCGAAACCAACG
GTGAAACCGGTGAAATCGTCTGGGACAAGGGTAGAGACTT
CGCCACCGTCAAGAAAGGTCTTGTCTATGCCACAAGTCAAC
ATCGTCAAGAAAGACCGAAGTCCAAACCGGTGGTTTCTCTA
AGGAATCTATCTTGCCAAAGAGAAAACCTCTGACAAGTTGAT
CGCCAGAAAGAAAGGACTGGGACCCAAAGAAAGTACGGTGGT
TTCGACTCTCCAACCGTCCGCTACTCTGTCTTGGTCTGTCG
CCAAGGTCGAAAAGGGTAAGTCTAAGAAAGTTGAAGTCTGT
CAAGGAATTGTTGGGTATCACCATCATGGAAAGATCTTCT
TTCGAAAAGAACCCAAATCGACTTCTTGGAAAGCCAAGGGTT
ACAAGGAAGTCAAGAAAGGACTTGATCATCAAGTTGCCAAA
GTACTCTTTGTTTGAATTGGAAAACGGTAGAAAGAGAAATG
TTGGCCCTCTGCCGGTGAATTGCAAAAAGGGTAACGAATTGG
CCTTGCCATCTAAGTACGTCAACTTCTTGTACTTGGCCCTC
TCACTACGAAAAGTTGAAGGGTTCTCCAGAAAGACAACGAA
CAAAAGCAATTGTTCTGTCGAACAACACAAGCACTACTTGG
ACGAAATCATCGAACAAATCTCTGAATTCTCTAAGAGAGT
CATCTTGGCCGACGCCAACTTGGACAAGGTCTTGTCTGCC

10

20

30

40

50

T A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C A A T C A G A G A A C A A G C C G
A A A A C A T C A T C C A C T T G T T C A C C T T G A C C A A C T T G G G T G C
C C C A G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C A G A
A A G A G A T A C A C C T C T A C C A A G G A A G T C T T G G A C G C C A C C T
T G A T C C A C C A A T C T A T C A C C G G T T T G T A C G A A A C C A G A A T
C G A C T T G T C T C A A T T G G G T G G T G A C G G T G G T G G T T C T C C A
A A G A A G A A G A G A A A G G T C

3 4 2

表4のUリッチコドンを使用したC a s 9 O R F（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

G A T A A A A A A T A T T C T A T T G G T T T A G A T A T T G G T A C T
A A T T C T G T T G G T T G G G C T G T T A T T A C T G A T G A A T A T A A A G
T T C C T T C T A A A A A A T T T A A A G T T T T A G G T A A T A C T G A T C G
T C A T T C T A T T A A A A A A A T T T A A T T G G T G C T T T A T T A T T T
G A T T C T G G T G A A A C T G C T G A A G C T A C T C G T T T A A A A C G T A
C T G C T C G T C G T C G T T A T A C T C G T C G T A A A A A T C G T A T T T G
T T A T T T A C A A G A A A T T T T T T C T A A T G A A A T G G C T A A A G T T
G A T G A T T C T T T T T T C A T C G T T T A G A A G A A T C T T T T T T A G
T T G A A G A A G A T A A A A A A C A T G A A C G T C A T C C T A T T T T T G G
T A A T A T T G T T G A T G A A G T T G C T T A T C A T G A A A A A T A T C C T
A C T A T T T A T C A T T T A C G T A A A A A A T T A G T T G A T T C T A C T G
A T A A A G C T G A T T T A C G T T T A A T T T A T T T A G C T T T A G C T C A
T A T G A T T A A A T T T C G T G G T C A T T T T T T A A T T G A A G G T G A T
T T A A A T C C T G A T A A T T C T G A T G T T G A T A A A T T A T T T A T T C
A A T T A G T T C A A A C T T A T A A T C A A T T A T T T G A A G A A A A T C C
T A T T A A T G C T T C T G G T G T T G A T G C T A A A G C T A T T T T A T C T
G C T C G T T T A T C T A A A T C T C G T C G T T T A G A A A A T T T A A T T G
C T C A A T T A C C T G G T G A A A A A A A A A A T G G T T T A T T T G G T A A
T T T A A T T G C T T T A T C T T T A G G T T T A A C T C C T A A T T T T A A A
T C T A A T T T T G A T T T A G C T G A A G A T G C T A A A T T A C A A T T A T
C T A A A G A T A C T T A T G A T G A T G A T T T A G A T A A T T T A T T A G C
T C A A A T T G G T G A T C A A T A T G C T G A T T T A T T T T T A G C T G C T
A A A A A T T T A T C T G A T G C T A T T T T A T T A T C T G A T A T T T T A C
G T G T T A A T A C T G A A A T T A C T A A A G C T C C T T T A T C T G C T T C
T A T G A T T A A A C G T T A T G A T G A A C A T C A T C A A G A T T T A A C T
T T A T T A A A A G C T T T A G T T C G T C A A C A A T T A C C T G A A A A A T
A T A A A G A A A T T T T T T T T G A T C A A T C T A A A A A T G G T T A T G C
T G G T T A T A T T G A T G G T G G T G C T T C T C A A G A A G A A T T T T A T
A A A T T T A T T A A A C C T A T T T T A G A A A A A A T G G A T G G T A C T G
A A G A A T T A T T A G T T A A A T T A A A T C G T G A A G A T T T A T T A C G
T A A A C A A C G T A C T T T T G A T A A T G G T T C T A T T C C T C A T C A A
A T T C A T T T A G G T G A A T T A C A T G C T A T T T T A C G T C G T C A A G
A A G A T T T T T A T C C T T T T T T A A A A G A T A A T C G T G A A A A A A T
T G A A A A A A T T T T A A C T T T T C G T A T T C C T T A T T A T G T T G G T
C C T T T A G C T C G T G G T A A T T C T C G T T T T G C T T G G A T G A C T C
G T A A A T C T G A A G A A A C T A T T A C T C C T T G G A A T T T T G A A G A
A G T T G T T G A T A A A G G T G C T T C T G C T C A A T C T T T T A T T G A A
C G T A T G A C T A A T T T T G A T A A A A A T T T A C C T A A T G A A A A A G
T T T T A C C T A A A C A T T C T T T A T T A T A T G A A T A T T T T A C T G T
T T A T A A T G A A T T A A C T A A A G T T A A A T A T G T T A C T G A A G G T

10

20

30

40

50

ATGCGTAAACCTGCTTTTTTATCTGGTGAACAAAAAAG
CTATTGTTGATTTATTATTTAAACTAATCGTAAAGTTAC
TGTTAAACAATTAAAAGAAGATTATTTTAAAAAATTGAA
TGTTTTGATTCTGTTGAAATTTCTGGTGTGTAAGATCGTT
TTAATGCTTCTTTAGGTACTTATCATGATTTATTAAAAAT
TATTAAAGATAAAGATTTTTTTTAGATAATGAAGAAAATGAA
GATATTTTGAAGAATATTGTTTTAACTTTAACTTTATTG
AAGATCGTGAAATGATTGAAGAACGTTTAAAAACTTTATGC
TCATTTATTTGATGATAAAGTTATGAAACAATTAAAACGT
CGTCGTTATACTGGTTGGGGTCGTTTATCTCGTAAATTA
TTAATGGTATTCGTGATAAACAATCTGGTAAAACCTATTTT
AGATTTTTTTAAATCTGATGGTTTTTGCTAATCGTAATTTT
ATGCAATTAATTCATGATGATTCTTTAACTTTTAAAGAAG
ATATTCAAAAAGCTCAAGTTTCTGGTCAAGGTGATTCCTT
ACATGAACATATTGCTAATTTAGCTGGTTCTCCTGCTATT
AAAAAAGGTATTTTACAAACTGTTAAAGTTGTTGATGAAT
TAGTTAAAGTTATGGGTCGTCATAAACCTGAAAATATTGT
TATTGAAATGGCTCGTGAAATCAAACTACTCAAAAAGGT
CAAAAAAATTCTCGTGAAACGTATGAAACGTATTGAAGAAG
GTATTAAAGAATTAGGTTCTCAAATTTTAAAGAACATCC
TGTTGAAAATACTCAATTACAAAATGAAAAATTATATTTA
TATTATTTACAAAATGGTCGTGATATGTATGTTGATCAAG
AATTAGATATTAATCGTTTATCTGATTATGATGTTGATCA
TATTGTTCCCTCAATCTTTTTTTAAAGATGATTCTATTGAT
AATAAAGTTTTTAACTCGTTCTGATAAAAATCGTGGTAAAT
CTGATAATGTTCTCTCTGAAGAAGTTGTTAAAAAATGAA
AAATTATTGGCGTCAATTATTAAATGCTAAATTAATTACT
CAACGTAAATTTGATAATTTAACTAAAGCTGAACGTGGTG
GTTTATCTGAATTAGATAAAGCTGGTTTTTATTAAACGTCA
ATTAGTTGAAACTCGTCAAATTAATAACATGTTGCTCAA
ATTTTAGATTCTCGTATGAATACTAAATATGATGAAAATG
ATAAATTAAATTCGTGAAGTTAAAGTTATTACTTTAAATC
TAAATTAGTTTCTGATTTTTCGTAAAGATTTTCAATTTTAT
AAAGTTCTGTGAATTAATAATTATCATCATGCTCATGATG
CTTATTTAAATGCTGTTGTTGGTACTGCTTTAATTAAAAA
ATATCCTAAATTAGAATCTGAATTTGTTTATGGTGATTAT
AAAGTTTATGATGTTTCGTAAATGATTGCTAAATCTGAAC
AAGAAATTGGTAAAGCTACTGCTAAATATTTTTTTTATTC
TAATATTATGAATTTTTTTTAAAACTGAAATTACTTTAGCT
AATGGTGAAATTCGTAAACGTCCTTTAATTGAAACTAATG
GTGAAACTGGTGAAATTGTTTTGGGATAAAGGTCTGTGATTT
TGCTACTGTTTCGTAAAGTTTTATCTATGCCTCAAGTTAAT
ATTGTTAAAAAACTGAAGTTCAAACTGGTGGTTTTTCTA
AAGAATCTATTTTACCTAAACGTAATTCTGATAAATTAAT
TGCTCGTAAAAAAGATTGGGATCCTAAAAAATATGGTGGT
TTTGATTCTCCTACTGTTGCTTATTCTGTTTTAGTTGTTG
CTAAAGTTGAAAAAGGTAAATCTAAAAAATTAAAAATCTGT
TAAAGAATTATTAGGTATTACTATTATGGAACGTTCTTCT
TTTGAAAAAAATCCTATTGATTTTTTTAGAAAGCTAAAGGTT
ATAAAGAAGTTAAAAAAGATTTAATTATTAAATTACCTAA

10

20

30

40

50

A T A T T C T T T A T T T G A A T T A G A A A A T G G T C G T A A A C G T A T G
 T T A G C T T C T G C T G G T G A A T T A C A A A A A G G T A A T G A A T T A G
 C T T T A C C T T C T A A A T A T G T T A A T T T T T T A T A T T T A G C T T C
 T C A T T A T G A A A A A T T A A A A G G T T C T C C T G A A G A T A A T G A A
 C A A A A A C A A T T A T T T G T T G A A C A A C A T A A A C A T T A T T T A G
 A T G A A A T T A T T G A A C A A A T T T C T G A A T T T T C T A A A C G T G T
 T A T T T T A G C T G A T G C T A A T T T A G A T A A A G T T T T A T C T G C T
 T A T A A T A A A C A T C G T G A T A A A C C T A T T C G T G A A C A A G C T G
 A A A A T A T T A T T C A T T T A T T T A C T T T A A C T A A T T T A G G T G C
 T C C T G C T G C T T T T A A A T A T T T T G A T A C T A C T A T T G A T C G T
 A A A C G T T A T A C T T C T A C T A A A G A A G T T T T A G A T G C T A C T T
 T A A T T C A T C A A T C T A T T A C T G G T T T A T A T G A A A C T C G T A T
 T G A T T T A T C T C A A T T A G G T G G T G A T G G T G G T G G T T C T C C T
 A A A A A A A A A C G T A A A G T T

3 4 3

表4の低Gコドンを使用したC a s 9 O R F（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

G A C A A A A A A T A C T C C A T C G G C C T C G A C A T C G G C A C C
 A A C T C C G T C G G C T G G G C C G T C A T C A C C G A C G A A T A C A A A G
 T C C C C T C C A A A A A A T T C A A A G T C C T C G G C A A C A C C G A C A G
 A C A C T C C A T C A A A A A A A A C C T C A T C G G C G C C C T C C T C T T C
 G A C T C C G G C G A A A C C G C C G A A G C C A C C A G A C T C A A A A G A A
 C C G C C A G A A G A A G A T A C A C C A G A A G A A A A A A C A G A A T C T G
 C T A C C T C C A A G A A A T C T T C T C C A A C G A A A T G G C C A A A G T C
 G A C G A C T C C T T C T T C C A C A G A C T C G A A G A A T C C T T C C T C G
 T C G A A G A A G A C A A A A A A C A C G A A A G A C A C C C C A T C T T C G G
 C A A C A T C G T C G A C G A A G T C G C C T A C C A C G A A A A A T A C C C C
 A C C A T C T A C C A C C T C A G A A A A A A A C T C G T C G A C T C C A C C G
 A C A A A G C C G A C C T C A G A C T C A T C T A C C T C G C C C T C G C C C A
 C A T G A T C A A A T T C A G A G G C C A C T T C C T C A T C G A A G G C G A C
 C T C A A C C C C G A C A A C T C C G A C G T C G A C A A A C T C T T C A T C C
 A A C T C G T C C A A A C C T A C A A C C A A C T C T T C G A A G A A A A C C C
 C A T C A A C G C C T C C G G C G T C G A C G C C A A A G C C A T C C T C T C C
 G C C A G A C T C T C C A A A T C C A G A A G A C T C G A A A A C C T C A T C G
 C C C A A C T C C C C G G C G A A A A A A A A A A C G G C C T C T T C G G C A A
 C C T C A T C G C C C T C T C C C T C G G C C T C A C C C C C A A C T T C A A A
 T C C A A C T T C G A C C T C G C C G A A G A C G C C A A A C T C C A A C T C T
 C C A A A G A C A C C T A C G A C G A C G A C C T C G A C A A C C T C C T C G C
 C C A A A T C G G C G A C C A A T A C G C C G A C C T C T T C C T C G C C G C C
 A A A A A C C T C T C C G A C G C C A T C C T C C T C T C C G A C A T C C T C A
 G A G T C A A C A C C G A A A T C A C C A A A G C C C C C C T C T C C G C C T C
 C A T G A T C A A A A G A T A C G A C G A A C A C C A C C A A G A C C T C A C C
 C T C C T C A A A G C C C T C G T C A G A C A A C A A C T C C C C G A A A A A T
 A C A A A G A A A T C T T C T T C G A C C A A T C C A A A A A C G G C T A C G C
 C G G C T A C A T C G A C G G C G G C G C C T C C C A A G A A G A A T T C T A C
 A A A T T C A T C A A A C C C A T C C T C G A A A A A A T G G A C G G C A C C G
 A A G A A C T C C T C G T C A A A C T C A A C A G A G A A G A C C T C C T C A G
 A A A A C A A A G A A C C T T C G A C A A C G G C T C C A T C C C C C A C C A A
 A T C C A C C T C G G C G A A C T C C A C G C C A T C C T C A G A A G A C A A G
 A A G A C T T C T A C C C C T T C C T C A A A G A C A A C A G A G A A A A A A T

10

20

30

40

50

CGAAAAAATCCTCACCTTCAGAATCCCCTACTACGTCGGC
CCCCTCGCCAGAGGCAACTCCAGATTTCGCCTGGATGACCA
GAAAATCCGAAGAAACCATCACCCCTGGAACCTTCGAAGA
AGTCGTCGACAAAGGCGCCTCCGCCCAATCCTTCATCGAA
AGAATGACCAACTTCGACAAAAAACCTCCCCAACGAAAAAG
TCCTCCCCAAACACTCCCTCCTCTACGAATACTTCACCGT
CTACAACGAACTCACCAAAAGTCAAATACGTCACCGAAGGC
ATGAGAAAAACCCGCCTTCCTCTCCGGCGAACAAAAAAG
CCATCGTCGACCTCCTCTTCAAAACCAACAGAAAAGTCAC
CGTCAAACAACCTCAAAGAAGACTACTTCAAAAAAATCGAA
TGCTTCGACTCCGTCGAAATCTCCGGCGTCGAAGACAGAT
TCAACGCCTCCCTCGGCACCTACCAACGACCTCCTCAAAT
CATCAAAGACAAAGACTTCCTCGACAACGAAGAAAACGAA
GACATCCTCGAAGACATCGTCCCTCACCCCTCACCCCTCTTCG
AAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTCAAAACCTACGC
CCACCTCTTCGACGACAAAGTCAATGAACAACCTCAAAAGA
AGAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTCTCCAGAAAACTCA
TCAACGGCATCAGAGACAAACAATCCGGCAAAACCATCCT
CGACTTCCTCAAATCCGACGGCTTCGCCAACAGAAACTTC
ATGCAACTCATCCACGACGACTCCCTCACCTTCAAAGAAG
ACATCCAAAAAGCCCAAGTCTCCGGCCAAGGCGACTCCCT
CCACGAACACATCGCCAACCTCGCCGGCTCCCCCGCCATC
AAAAAAGGCATCCTCCAAACCGTCAAAGTCGTCGACGAAC
TCGTCAAAGTCATGGGCAGACACAAACCCGAAAAACATCGT
CATCGAAATGGCCAGAGAAAACCAAAACCAACCAAAAAGGC
CAAAAAAACTCCAGAGAAAGAATGAAAAGAATCGAAGAAG
GCATCAAAGAACTCGGCTCCCAAATCCTCAAAGAACACCC
CGTCGAAAAACACCCAACTCCAAAACGAAAAACTCTACCTC
TACTACCTCCAAAACGGCAGAGACATGTACGTCGACCAAG
AACTCGACATCAACAGACTCTCCGACTACGACGTCGACCA
CATCGTCCCCCAATCCTTCTCTCAAAGACGACTCCATCGAC
AACAAAGTCCTCACCCAGATCCGACAAAAACAGAGGCAAT
CCGACAACGTCCCTCCGAAGAAGTCGTCAAAAAAATGAA
AAACTACTGGAGACAACCTCCTCAACGCCAAACTCATCAC
CAAAGAAAAATTGACAAACCTCACCAAGCCGAAAGAGGCG
GCCTCTCCGAACCTCGACAAAGCCGGCTTCATCAAAGACA
ACTCGTCGAAACCAGACAAATCACCAAAACGTCGCCCAA
ATCCTCGACTCCAGAATGAACACCAAAATACGACGAAAAACG
ACAAACTCATCAGAGAAGTCAAAGTCATCACCTCAAATC
CAAACCTCGTCTCCGACTTCAGAAAAAGACTTCCAATTCTAC
AAAGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCAACGCCACGACG
CCTACCTCAACGCCGTCGTGGGCAACGCCCTCATCAAAAA
ATACCCCAAACTCGAATCCGAATTCGTCTACGGCGACTAC
AAAGTCTACGACGTCAGAAAAAATGATCGCCAAATCCGAAC
AAGAAATCGGGCAAAGCCACCGCCAAATACTTCTTCTACTC
CAACATCATGAACTTCTTCAAACCGAAATCACCTCGCC
AACGGCGAAATCAGAAAAAGACCCCTCATCGAAACCAACG
GCGAAACCGGCGAAATCGTCTGGGACAAAGGCGAGAGACTT
CGCCACCGTCAGAAAAGTCCTCTCCATGCCCCAAGTCAAC
ATCGTCAAAAAAACCGAAGTCCAAACCGGCGGCTTCTCCA

10

20

30

40

50

20

表4の低Cコドンを使用したCas9 ORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

50

ATAAGGAGATTTTTTTTTTGATCAGAGTAAGAATGGATATGCT
TGGATATATTGATGGAGGAGCTAGTCAGGAGGAGTTTTAT
AAGTTTTATTAAAGCCTATTTTTGGAGAAGATGGATGGAACAG
AGGAGTTGTTGGTGAAGTTGAATAGAGAGGATTTGTTGAG
AAAGCAGAGAACATTTGATAATGGAAGTATTCCTCATCAG
ATTCATTTGGGAGAGTTGCATGCTATTTTGGAGAAGACAGG
AGGATTTTTTATCCTTTTTTTGAAGGATAATAGAGAGAAGAT
TGAGAAGATTTTTGACATTTAGAAATTCCTTATTATGTGGGA
CCTTTGGCTAGAGGAAATAGTAGATTTGCTTGGATGACAA
GAAAGAGTGAGGAGACAATTACACCTTGGAAATTTTTGAGGA
GGTGGTGGATAAAGGGAGCTAGTGCTCAGAGTTTTTATTGAG
AGAATGACAAATTTTTGATAAGAATTTGCCTAATGAGAAGG
TGTTGCCTAAGCATAGTTTTGTTGTATGAGTATTTTACAGT
GTATAATGAGTTGACAAAGGTGAAGTATGTGACAGAGGGA
ATGAGAAAGCCTGCTTTTTTTGAGTGGAGAGCAGAAGAAGG
CTATTGTGGATTTGTTGTTTAAGACAAATAGAAAGGTGAC
AGTGAAGCAGTTGAAGGAGGATTATTTTAAAGAAGATTGAG
TGTTTTGATAGTGTGGAGATTAGTGGAGTGGAGGATAGAT
TTAATGCTAGTTTGGGAACATATCATGATTTGTTGAAGAT
TATTAAGGATAAAGGATTTTTTTTGGATAATGAGGAGAATGAG
GATATTTTGGAGGATATTGTGTTGACATTGACATTGTTTG
AGGATAGAGAGATGATTGAGGAGAGATTGAAGACATATGC
TCATTTGTTTTGATGATAAGGTGATGAAGCAGTTGAAGAGA
AGAAGATATACAGGATGGGGAAAGATTGAGTAGAAAGTTGA
TTAATGGAATTAGAGATAAGCAGAGTGGAAAGACAATTTT
GGATTTTTTTGAAGAGTGATGGATTTTGCTAATAGAAATTTT
ATGCAGTTGATTCATGATGATAGTTTTGACATTTAAGGAGG
ATATTCAGAAAGGCTCAGGTGAGTGGACAGGGAGATAGTTT
GCATGAGCATATTGCTAATTTGGCTGGAAGTCTCTGCTATT
AAGAAGGGGAATTTTTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGATGAGT
TGGTGAAGGTGATGGGAAGACATAAGCCTGAGAATATTGT
GATTGAGATGGCTAGAGAGAATCAGACAACACAGAAGGGA
CAGAAGAATAGTAGAGAGAGAATGAAGAGAATTGAGGAGG
GAATTAAGGAGTTGGGAAGTCAAGATTTTGAAGGAGCATCC
TGTGGAGAATAACACAGTTGCAGAATGAGAAGTTGTATTTG
TATTATTTGCAGAATGGAAGAGATATGTATGTGGATCAGG
AGTTGGATATTAATAGATTGAGTGATTATGATGTGGATCA
TATTGTGCCCTCAGAGTTTTTTTTGAAGGATGATAGTATTGAT
AATAAGGTGTTGACAAGAAGTGATAAGAATAGAGGAAAGA
GTGATAATGTGCCCTAGTGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA
GAATTATTGGAGACAGTTGTTGAATGCTAAGTTGATTACA
CAGAGAAAGTTTGTATAATTTGACAAAGGCTGAGAGAGGAG
GATTGAGTGAGTTGGATAAAGGCTGGATTTATTAAGAGACA
GTTGGTGGAGACAAGACAGATTACAAAGCATGTGGCTCAG
ATTTTGGATAGTAGAATGAATACAAAGTATGATGAGAATG
ATAAGTTGATTAGAGAGGTGAAGGTGATTACATTGAAGAG
TAAGTTGGTGAAGTGAATTTTAGAAAGGATTTTTCAGTTTTAT
AAGGTGAGAGAGATTAAATAATTATCATCATGCTCATGATG
CTTATTTGAATGCTGTGGTGGGAACAGCTTTGATTAAAGAA
GTATCCTAAGTTGGAGAGTGAGTTTGTGTATGGAGATTAT

10

20

30

40

50

A A G G T G T A T G A T G T G A G A A A G A T G A T T G C T A A G A G T G A G C
 A G G A G A T T G G A A A G G C T A C A G C T A A G T A T T T T T T T A T A G
 T A A T A T T A T G A A T T T T T T T A A G A C A G A G A T T A C A T T G G C T
 A A T G G A G A G A T T A G A A A G A G A C C T T T G A T T G A G A C A A A T G
 G A G A G A C A G G A G A G A T T G T G T G G G A T A A G G G A A G A G A T T T
 T G C T A C A G T G A G A A A G G T G T T G A G T A T G C C T C A G G T G A A T
 A T T G T G A A G A A G A C A G A G G T G C A G A C A G G A G G A T T T A G T A
 A G G A G A G T A T T T T G C C T A A G A G A A A T A G T G A T A A G T T G A T
 T G C T A G A A A G A A G G A T T G G G A T C C T A A G A A G T A T G G A G G A
 T T T G A T A G T C C T A C A G T G G C T T A T A G T G T G T T G G T G G T G G
 C T A A G G T G G A G A A G G G A A A G A G T A A G A A G T T G A A G A G T G T
 G A A G G A G T T G T T G G G A A T T A C A A T T A T G G A G A G A A G T A G T
 T T T G A G A A G A A T C C T A T T G A T T T T T T G G A G G C T A A G G G A T
 A T A A G G A G G T G A A G A A G G A T T T G A T T A T T A A G T T G C C T A A
 G T A T A G T T T T G T T T G A G T T G G A G A A T G G A A G A A A G A G A A T G
 T T G G C T A G T G C T G G A G A G T T G C A G A A G G G A A A T G A G T T G G
 C T T T G C C T A G T A A G T A T G T G A A T T T T T T G T A T T T G G C T A G
 T C A T T A T G A G A A G T T G A A G G G A A G T C C T G A G G A T A A T G A G
 C A G A A G C A G T T G T T T G T G G A G C A G C A T A A G C A T T A T T T G G
 A T G A G A T T A T T G A G C A G A T T A G T G A G T T T A G T A A G A G A G T
 G A T T T T G G C T G A T G C T A A T T T G G A T A A G G T G T T G A G T G C T
 T A T A A T A A G C A T A G A G A T A A G C C T A T T A G A G A G C A G G C T G
 A G A A T A T T A T T C A T T T G T T T A C A T T G A C A A A T T T G G G A G C
 T C C T G C T G C T T T T A A G T A T T T T G A T A C A A C A A T T G A T A G A
 A A G A G A T A T A C A A G T A C A A A G G A G G T G T T G G A T G C T A C A T
 T G A T T C A T C A G A G T A T T A C A G G A T T G T A T G A G A C A A G A A T
 T G A T T T G A G T C A G T T G G G A G G A G A T G G A G G A G G A A G T C C T
 A A G A A G A A G A G A A A G G T G

3 4 5

表4の低Aコドンを使用したC a s 9 O R F（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

G A C A A G A A G T A C T C C A T C G G C C T G G A C A T C G G C A C C
 A A C T C C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A A G G
 T G C C C T C C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A C C G
 G C A C T C C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G T T C
 G A C T C C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C G G A
 C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T C T G
 C T A C C T G C A G G A G A T C T T C T C C A A C G A G A T G G C C A A G G T G
 G A C G A C T C C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G T C C T T C C T G G
 T G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T C G G
 C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A G A A G T A C C C C
 A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C T C C A C C G
 A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C C C A
 C A T G A T C A A G T T C C G G G G C C A C T T C C T G A T C G A G G G C G A C
 C T G A A C C C C G A C A A C T C C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A T C C
 A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A A C C C
 C A T C A A C G C C T C C G G C G T G G A C G C C A A G G C C A T C C T G T C C
 G C C C G G C T G T C C A A G T C C C G G C G G C T G G A G A A C C T G A T C G
 C C C A G C T G C C C G G C G A G A A G A A G A A C G G C C T G T T C G G C A A
 C C T G A T C G C C C T G T C C C T G G G C C T G A C C C C C A A C T T C A A G

10

20

30

40

50

T C C A A C T T C G A C C T G G C C G A G G A C G C C A A G C T G C A G C T G T
C C A A G G A C A C C T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T G G C
C C A G A T C G G C G A C C A G T A C G C C G A C C T G T T C C T G G C C G C C
A A G A A C C T G T C C G A C G C C A T C C T G C T G T C C G A C A T C C T G C
G G G T G A A C A C C G A G A T C A C C A A G G C C C C C C T G T C C G C C T C
C A T G A T C A A G C G G T A C G A C G A G C A C C A C C A G G A C C T G A C C
C T G C T G A A G G C C C T G G T G C G G C A G C A G C T G C C C G A G A A G T
A C A A G G A G A T C T T C T T C G A C C A G T C C A A G A A C G G C T A C G C
C G G C T A C A T C G A C G G C G G C G C C T C C C A G G A G G A G T T C T A C
A A G T T C A T C A A G C C C A T C C T G G A G A A G A T G G A C G G C A C C G
A G G A G C T G C T G G T G A A G C T G A A C C G G G A G G A C C T G C T G C G
G A A G C A G C G G A C C T T C G A C A A C G G C T C C A T C C C C C A C C A G
A T C C A C C T G G G C G A G C T G C A C G C C A T C C T G C G G C G G C A G G
A G G A C T T C T A C C C C T T C C T G A A G G A C A A C C G G G A G A A G A T
C G A G A A G A T C C T G A C C T T C C G G A T C C C C T A C T A C G T G G G C
C C C C T G G C C C G G G G C A A C T C C C G G T T C G C C T G G A T G A C C C
G G A A G T C C G A G G A G A C C A T C A C C C C C T G G A A C T T C G A G G A
G G T G G T G G A C A A G G G C G C C T C C G C C C A G T C C T T C A T C G A G
C G G A T G A C C A A C T T C G A C A A G A A C C T G C C C A A C G A G A A G G
T G C T G C C C A A G C A C T C C C T G C T G T A C G A G T A C T T C A C C G T
G T A C A A C G A G C T G A C C A A G G T G A A G T A C G T G A C C G A G G G C
A T G C G G A A G C C C G C C T T C C T G T C C G G C G A G C A G A A G A A G G
C C A T C G T G G A C C T G C T G T T C A A G A C C A A C C G G A A G G T G A C
C G T G A A G C A G C T G A A G G A G G A C T A C T T C A A G A A G A T C G A G
T G C T T C G A C T C C G T G G A G A T C T C C G G C G T G G A G G A C C G G T
T C A A C G C C T C C C T G G G C A C C T A C C A C G A C C T G C T G A A G A T
C A T C A A G G A C A A G G A C T T C C T G G A C A A C G A G G A G A A C G A G
G A C A T C C T G G A G G A C A T C G T G C T G A C C C T G A C C C T G T T C G
A G G A C C G G G A G A T G A T C G A G G A G C G G C T G A A G A C C T A C G C
C C A C C T G T T C G A C G A C A A G G T G A T G A A G C A G C T G A A G C G G
C G G C G G T A C A C C G G C T G G G G C C G G C T G T C C C G G A A G C T G A
T C A A C G G C A T C C G G G A C A A G C A G T C C G G C A A G A C C A T C C T
G G A C T T C C T G A A G T C C G A C G G C T T C G C C A A C C G G A A C T T C
A T G C A G C T G A T C C A C G A C G A C T C C C T G A C C T T C A A G G A G G
A C A T C C A G A A G G C C C A G G T G T C C G G C C A G G G C G A C T C C C T
G C A C G A G C A C A T C G C C A A C C T G G C C G G C T C C C C C G C C A T C
A A G A A G G G C A T C C T G C A G A C C G T G A A G G T G G T G G A C G A G C
T G G T G A A G G T G A T G G G C C G G C A C A A G C C C G A G A A C A T C G T
G A T C G A G A T G G C C C G G G A G A A C C A G A C C A C C C A G A A G G G C
C A G A A G A A C T C C C G G G A G C G G A T G A A G C G G A T C G A G G A G G
G C A T C A A G G A G C T G G G C T C C C A G A T C C T G A A G G A G C A C C C
C G T G G A G A A C A C C C A G C T G C A G A A C G A G A A G C T G T A C C T G
T A C T A C C T G C A G A A C G G C C G G G A C A T G T A C G T G G A C C A G G
A G C T G G A C A T C A A C C G G C T G T C C G A C T A C G A C G T G G A C C A
C A T C G T G C C C C A G T C C T T C C T G A A G G A C G A C T C C A T C G A C
A A C A A G G T G C T G A C C C G G T C C G A C A A G A A C C G G G G C A A G T
C C G A C A A C G T G C C C T C C G A G G A G G T G G T G A A G A A G A T G A A
G A A C T A C T G G C G G C A G C T G C T G A A C G C C A A G C T G A T C A C C
C A G C G G A A G T T C G A C A A C C T G A C C A A G G C C G A G C G G G G C G
G C C T G T C C G A G C T G G A C A A G G C C G G C T T C A T C A A G C G G C A

10

20

30

40

50

GCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAGCACGTGGCCCCAG
 ATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACG
 ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAAGTC
 CAAGCTGGTGTCCGACTTCCCGGAAGGACTTCCAGTTCTAC
 AAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACACGCCACGACG
 CCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAA
 GTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTGTACGGCGACTAC
 AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGC
 AGGAGATCGGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTC
 CAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCCTGGCC
 AACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACG
 GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTT
 CGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAAC
 ATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCA
 AGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGCTGAT
 CGCCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGC
 TTCGACTCCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGG
 CCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGT
 GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCTC
 TTCGAGAAGAACCCTATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGGGCT
 ACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
 GTACTCCCTGTTCTGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATG
 CTGGCCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGCTGG
 CCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGCCCTC
 CCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAACGAG
 CAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGG
 ACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGT
 GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCC
 TACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCG
 AGAACATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGCGC
 CCCC GCCGCTTCAAGTACTTCTGACACCAACCATCGACCGG
 AAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCC
 TGATCCACCAGTCCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCGGAT
 CGACCTGTCCCAGCTGGGCGGGCGACGGCGGGCTCCCCC
 AAGAAGAAGCGGAAGGTG

3 4 6

表4の低A/Uコドンを使用したCas9 ORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACAGCATCGGCCCTGGACATCGGCCACC
 AACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCAGCAGGTACAAGG
 TGCCCAAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCG
 GCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTC
 GACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA
 CCGCCCCGGCGGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGATCTG
 CTACCTGCAGGAGATCTTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTG
 GACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTCTGG
 TGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGGACCCCATCTTCTGG
 CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC
 ACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCG
 ACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCA

10

20

30

40

50

CATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGGCGAC
CTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCC
CATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGC
GCCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGGCTGGAGAACCTGATCG
CCCAGCTGCCCGGCGAGAAAGAAAGAACGGCCTGTTTCGGCAA
CCTGATCGCCCTGAGCCTGGGGCCTGACCCCCAACCTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
CCAGATCGGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCCTGGCCGCC
AAGAACCCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGC
GGGTGAACACCAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGCCAG
CATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACC
CTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAAGT
ACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGC
CGGCTACATCGACGGCGGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCG
AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACC GGAGGACCTGCTGCG
GAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAG
ATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGGCAGG
AGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAAAGAT
CGAGAAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACGTGGGC
CCCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTTCGCCTGGATGACCC
GGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCCCTGGAACCTTCGAGGA
GGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCCAGAGCTTCATCGAG
CGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGG
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGT
GTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGC
ATGCGGAAGCCCCGCCTTCTCTGAGCGGCGAGCAGAAAGAGG
CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGAC
CGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGAG
TGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGT
TCAACGCCAGCCTGGGGCACCTACCAACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGTGCTGACCCCTGACCCCTGTTTCG
AGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTTACACCGGCTGGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGA
TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGGCAAGACCATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGCTTTCGCCAACCGGAACCTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACC GTGAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCGGGCACAAAGCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAACCAAGACCAACCAGAAAGGGC
CAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGCGAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGG

10

20

30

40

50

```

AGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCA
CATCGTGCCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACC GG G G C A A G A
GCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA
GAACTACTTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACC
CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCG
GCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCA
GCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCC C A G
ATCCTGGACAGCCGGATGAACAACCAAGTACGACGAGAACG
ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAG
CAAGCTGGTGAAGCGACTTCCCGGAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGGAGATCAACAACCTACCAACACGCC C A C G A C G
CCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAA
GTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTGTACGGCGACTAC
AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGC
AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCC
AACGGCGAGATCCGGGAAGCGGCC C C C T G A T C G A G A C C A A C G
GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTT
CGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCC C C A G G T G A A C
ATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCA
AGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGAT
CGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGC
TTCGACAGCCCCACCGTG G C C T A C A G C G T G C T G G T G G T G G
CCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT
GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGC
TTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGGGCT
ACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
GTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGGAAGCGGATG
CTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGGCAACGAGCTGG
CCCTGCC C A G C A A G T A C G T G A A C T T C C T G T A C C T G G C C A G
C C A C T A C G A G A A G C T G A A G G G C A G C C C C G A G G A C A A C G A G
C A G A A G C A G C T G T T C G T G G A G C A G C A C A A G C A C T A C C T G G
A C G A G A T C A T C G A G C A G A T C A G C G A G T T C A G C A A G C G G G T
G A T C C T G G C C G A C G C C A A C C T G G A C A A G G T G C T G A G C G C C
T A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A T C C G G G A G C A G G C C G
A G A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C C C T G A C C A A C C T G G G C G C
C C C C G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C C G G
A A G C G G T A C A C C A G C A C C A A G G A G G T G C T G G A C G C C A C C C
T G A T C C A C C A G A G C A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C C C G G A T
C G A C C T G A G C C A G C T G G G C G G C G A C G G C G G C G G C A G C C C C
A A G A A G A A G C G G A A G G T G

```

3 4 7

2つのC末端NLS配列を有する、表4の低Aコドンを使用したCas9 ORF (開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である)

```

GACAAGAAGTACTCCATCGGCCCTGGACATCGGCACC
AACTCCGTGGGCTGGGCGCGTGATCACCGACGAGTACAAGG
TGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCG
GCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTC
GACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA

```

10

20

30

40

50

CCGCCCGGCGGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGATCTG
CTACCTG CAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTG
GACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCTTCTCTGG
TGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCCACCCCATCTTCTGG
CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC
ACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCG
ACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCA
CATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTCTGATCGAGGGCGAC
CTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTTTCGAGGAGAACCC
CATCAACGCCTCCGGCGGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCC
GCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCCTGATCG
CCCAGCTGCCCGGCGAGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAA
CCTGATCGCCCTGTCCCTGGGGCCTGACCCCCCAACTTCAAG
TCCAACCTTCGACCTGGCCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGT
CCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
CCAGATCGGCGGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCCGCC
AAGAACCCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGC
GGGTGAACACCAGATCACCAAGGCCCCCCCTGTCCGCCCTC
CATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACC
CTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGT
ACAAGGAGATCTTCTTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGC
CGGCTACATCGACGGCGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCG
AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG
GAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCACCAG
ATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGGCAGG
AGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAAAGAT
CGAGAAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACGTGGGC
CCCCCTGGCCCGGGGGCAACTCCCGGTTTCGCCTGGATGACCC
GGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGA
GGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCTTTCATCGAG
CGGATGACCAACTTCGACAAGAACCCTGCCCAACGAGAAGG
TGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCGT
GTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGC
ATGCGGAAGCCCCGCCTTCTCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGG
CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGAC
CGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAG
TGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGT
TCAACGCCTCCCTGGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGTGCTGACCCCTGACCCCTGTTTCG
AGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACC GGCTGGGGGCGGGCTGTCCCGGAAGCTGA
TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCT
GGACTTCTCTGAAGTCCGACGGCTTTCGCCAACC GGAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAGGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATC

10

20

30

40

50

AAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCGGCACAAAGCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAAGACCAACCAGAAAGGGC
CAGAAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGCTCCCAAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGG
AGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACCA
CATCGTGCCTCCAGTCTTCTCTGAAGGACGACTCCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAAGAACCGGGGCAAGT
CCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCC
CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCG
GCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGGCA
GCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAAG
ATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACG
ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTC
CAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCAACCAAGCCACGACG
CCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAA
GTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTGTACGGCGACTAC
AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGC
AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTC
CAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCC
AACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACG
GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTT
CGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAAC
ATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCA
AGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGGAACCTCCGACAAGCTGAT
CGCCCGGAAGAAGGACTGGGGACCCCAAGAAAGTACGGCGGC
TTCGACTCCCCCACCGTGCGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGG
CCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGT
GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCC
TTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGGGCT
ACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
GTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATG
CTGGCCTCCGCCGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGCTGG
CCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGCCTC
CCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAACGAG
CAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGG
ACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGT
GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCC
TACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCG
AGAACATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAACCTGGGCGC
CCCCGCCGCTTCAAGTACTTTCGACACCACCATCGACCGG
AAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCC
TGATCCACCAGTCCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCGGAT
CGACCTGTCCAGCTGGGCGGGCGACGGCTCCGGCTCCCCC
AAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCTCCCCCAAGAAGAAGC
GGAAGGTGGACTCCGGC

10

20

30

40

50

3 4 8

表4の低Aコドンを使用したCas9ニッカーゼORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

G A C A A G A A G T A C T C C A T C G G C C T G G C C A T C G G C A C C
A A C T C C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A A G G
T G C C C T C C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A C C G
G C A C T C C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G T T C
G A C T C C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C G G A
C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T C T G
C T A C C T G C A G G A G A T C T T C T C C A A C G A G A T G G C C A A G G T G
G A C G A C T C C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G T C C T T C C T G G
T G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T C G G
C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A G A A G T A C C C C
A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C T C C A C C G
A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C C C A
C A T G A T C A A G T T C C G G G G C C A C T T C C T G A T C G A G G G C G A C
C T G A A C C C C G A C A A C T C C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A T C C
A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A A C C C
C A T C A A C G C C T C C G G C G T G G A C G C C A A G G C C A T C C T G T C C
G C C C G G C T G T C C A A G T C C C G G C G G C T G G A G A A C C T G A T C G
C C C A G C T G C C C G G C G A G A A G A A G A A C G G C C T G T T C G G C A A
C C T G A T C G C C C T G T C C C T G G G C C T G A C C C C C A A C T T C A A G
T C C A A C T T C G A C C T G G C C G A G G A C G C C A A G C T G C A G C T G T
C C A A G G A C A C C T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T G G C
C C A G A T C G G C G A C C A G T A C G C C G A C C T G T T C C T G G C C G C C
A A G A A C C T G T C C G A C G C C A T C C T G C T G T C C G A C A T C C T G C
G G G T G A A C A C C G A G A T C A C C A A G G C C C C C T G T C C G C C T C
C A T G A T C A A G C G G T A C G A C G A G C A C C A C C A G G A C C T G A C C
C T G C T G A A G G C C C T G G T G C G G C A G C A G C T G C C C G A G A A G T
A C A A G G A G A T C T T C T T C G A C C A G T C C A A G A A C G G C T A C G C
C G G C T A C A T C G A C G G C G G C G C C T C C C A G G A G G A G T T C T A C
A A G T T C A T C A A G C C C A T C C T G G A G A A G A T G G A C G G C A C C G
A G G A G C T G C T G G T G A A G C T G A A C C G G G A G G A C C T G C T G C G
G A A G C A G C G G A C C T T C G A C A A C G G C T C C A T C C C C C A C C A G
A T C C A C C T G G G C G A G C T G C A C G C C A T C C T G C G G C G G C A G G
A G G A C T T C T A C C C C T T C C T G A A G G A C A A C C G G G A G A A G A T
C G A G A A G A T C C T G A C C T T C C G G A T C C C C T A C T A C G T G G G C
C C C C T G G C C C G G G G C A A C T C C C G G T T C G C C T G G A T G A C C C
G G A A G T C C G A G G A G A C C A T C A C C C C C T G G A A C T T C G A G G A
G G T G G T G G A C A A G G G C G C C T C C G C C C A G T C C T T C A T C G A G
C G G A T G A C C A A C T T C G A C A A G A A C C T G C C C A A C G A G A A G G
T G C T G C C C A A G C A C T C C C T G C T G T A C G A G T A C T T C A C C G T
G T A C A A C G A G C T G A C C A A G G T G A A G T A C G T G A C C G A G G G C
A T G C G G A A G C C C G C C T T C C T G T C C G G C G A G C A G A A G A A G G
C C A T C G T G G A C C T G C T G T T C A A G A C C A A C C G G A A G G T G A C
C G T G A A G C A G C T G A A G G A G G A C T A C T T C A A G A A G A T C G A G
T G C T T C G A C T C C G T G G A G A T C T C C G G C G T G G A G G A C C G G T
T C A A C G C C T C C C T G G G C A C C T A C C A C G A C C T G C T G A A G A T
C A T C A A G G A C A A G G A C T T C C T G G A C A A C G A G G A G A A C G A G
G A C A T C C T G G A G G A C A T C G T G C T G A C C C T G A C C C T G T T C G

10

20

30

40

50

AGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGA
TCAACGGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCT
GGACTTCTCTGAAGTCCGACGGCTTTCGCCAACCCGGAACCTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACCGGTGAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCAACCAGAAAGGGC
CAGAAAGAACTCCCGGGAGCGGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGG
AGCTGGACATCAACC GGCTGTCCGACTACGACGTGGACCA
CATCGTGTCCCCAGTCTTCTCTGAAGGACGACTCCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGGCAAGT
CCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAA
GAACTACTTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCC
CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCG
GCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCA
GCTGGTGGAGACCCGGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAAG
ATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACG
ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAAGTC
CAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAAGCCACGACG
CCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAA
GTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTGTACGGCGACTAC
AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGC
AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTC
CAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCC
AACGGCGAGATCCGGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACG
GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGGCCGGGACTT
CGCCACCGTGCAGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAAC
ATCGTGAAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCA
AGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGGAACCTCCGACAAGCTGAT
CGCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCCAAGAAAGTACGGCGGC
TTCGACTCCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGG
CCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAAGCTGAAGTCCGT
GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCTCC
TTCGAGAAAGAACCCCATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGGGCT
ACAAGGAGGTGAAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
GTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATG
CTGGCCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGCTGG
CCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGCCCTC
CCACTACGAGAAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAACGAG
CAGAAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGG
ACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGT
GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCC

10

20

30

40

50

T A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A T C C G G G A G C A G G C C G
A G A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C C C T G A C C A A C C T G G G C G C
C C C C G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C C G G
A A G C G G T A C A C C T C C A C C A A G G A G G T G C T G G A C G C C A C C C
T G A T C C A C C A G T C C A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C C C G G A T
C G A C C T G T C C C A G C T G G G C G G C G A C G G C G G C G G C T C C C C C
A A G A A G A A G C G G A A G G T G

3 4 9

表4の低Aコドンを使用したC a s 9ニッカーゼORF（NLSなし、および開始コ
ドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

G A C A A G A A G T A C T C C A T C G G C C T G G C C A T C G G C A C C
A A C T C C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A A G G
T G C C C T C C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A C C G
G C A C T C C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G T T C
G A C T C C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C G G A
C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T C T G
C T A C C T G C A G G A G A T C T T C T C C A A C G A G A T G G C C A A G G T G
G A C G A C T C C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G T C C T T C C T G G
T G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T C G G
C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A G A A G T A C C C C
A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C T C C A C C G
A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C C C A
C A T G A T C A A G T T C C G G G G C C A C T T C C T G A T C G A G G G C G A C
C T G A A C C C C G A C A A C T C C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A T C C
A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A A C C C
C A T C A A C G C C T C C G G C G T G G A C G C C A A G G C C A T C C T G T C C
G C C C G G C T G T C C A A G T C C C G G C G G C T G G A G A A C C T G A T C G
C C C A G C T G C C C G G C G A G A A G A A G A A C G G C C T G T T C G G C A A
C C T G A T C G C C C T G T C C C T G G G C C T G A C C C C C A A C T T C A A G
T C C A A C T T C G A C C T G G C C G A G G A C G C C A A G C T G C A G C T G T
C C A A G G A C A C C T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T G G C
C C A G A T C G G C G A C C A G T A C G C C G A C C T G T T C C T G G C C G C C
A A G A A C C T G T C C G A C G C C A T C C T G C T G T C C G A C A T C C T G C
G G G T G A A C A C C G A G A T C A C C A A G G C C C C C C T G T C C G C C T C
C A T G A T C A A G C G G T A C G A C G A G C A C C A C C A G G A C C T G A C C
C T G C T G A A G G C C C T G G T G C G G C A G C A G C T G C C C G A G A A G T
A C A A G G A G A T C T T C T T C G A C C A G T C C A A G A A C G G C T A C G C
C G G C T A C A T C G A C G G C G G C G C C T C C C A G G A G G A G T T C T A C
A A G T T C A T C A A G C C C A T C C T G G A G A A G A T G G A C G G C A C C G
A G G A G C T G C T G G T G A A G C T G A A C C G G G A G G A C C T G C T G C G
G A A G C A G C G G A C C T T C G A C A A C G G C T C C A T C C C C C A C C A G
A T C C A C C T G G G C G A G C T G C A C G C C A T C C T G C G G C G G C A G G
A G G A C T T C T A C C C C T T C C T G A A G G A C A A C C G G G A G A A G A T
C G A G A A G A T C C T G A C C T T C C G G A T C C C C T A C T A C G T G G G C
C C C C T G G C C C G G G G C A A C T C C C G G T T C G C C T G G A T G A C C C
G G A A G T C C G A G G A G A C C A T C A C C C C C T G G A A C T T C G A G G A
G G T G G T G G A C A A G G G C G C C T C C G C C C A G T C C T T C A T C G A G
C G G A T G A C C A A C T T C G A C A A G A A C C T G C C C A A C G A G A A G G
T G C T G C C C A A G C A C T C C C T G C T G T A C G A G T A C T T C A C C G T
G T A C A A C G A G C T G A C C A A G G T G A A G T A C G T G A C C G A G G G C

10

20

30

40

50

ATGCGGAAGCCCCGCCTTCTCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGG
CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGAC
CGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAG
TGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGT
TCAACGCCTCCCTGGGACACCTACCAACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGTGCTGACCCCTGACCCCTGTTCTG
AGGACC CGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGA
TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCT
GGACTTCTCTGAAGTCCGACGGCTTTCGCCAACCGGAACCTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAGGCCCAAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCCGGCTCCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACCGGTGAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCCCGGCACAAGCCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAACCCAGACCAACCAGAGGGC
CAGAAGAAGTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGCTCCCAAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGG
AGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACCA
CATCGTGTCCCCAGTCTTCTCTGAAGGACGACTCCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGT
CCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCC
CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCG
GCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTTCATCAAGCGGCA
GCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAG
ATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACG
ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTC
CAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCAACACGCCCCACGACG
CCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAA
GTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTTCGTGTACGGCGACTAC
AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGC
AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTC
CAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCC
AACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACG
GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTT
CGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAAC
ATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCA
AGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGCTGAT
CGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGC
TTCGACTCCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGG
CCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGT
GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCTC
TTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGGGCT
ACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA

10

20

30

40

50

GTACTCCCTGTTCTGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATG
CTGGCCTCCGCGGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGCTGG
CCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGCCTC
CCACTACGAGAAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAACGAG
CAGAAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGG
ACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGT
GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCC
TACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCG
AGAACATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGGCGC
CCCCGCCGCCCTTCAAGTACTTCTGACACCAACCATCGACCCG
AAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCC
TGATCCACCAAGTCCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCGGAT
CGACCTGTCCCAGCTGGGCGGGCGAC

350

2つのC末端NLS配列を有する、表4の低Aコドンを使用したCas9ニックーゼ
ORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適
である）

GACAAGAAGTACTCCATCGGCCCTGGCCATCGGGCACCC
AACTCCGTGGGCTGGGCGCGTGATCACCGACGAGTACAAGG
TGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCG
GCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTT
GACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA
CCGCCCGGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGATCTG
CTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTG
GACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCTTCTCTGG
TGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGGCACCCCATCTTCGG
CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC
ACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCG
ACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCA
CATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGAC
CTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTTATCC
AGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCC
CATCAACGCCTCCGGCGGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCC
GCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCCTGATCG
CCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAA
CCTGATCGCCCTGTCCCTGGGGCCTGACCCCAACTTCAAG
TCCAACCTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGT
CCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
CCAGATCGGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCCGCC
AAGAACCCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGC
GGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGTCCGCCCTC
CATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACCAAGGACCTGACC
CTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAAGT
ACAAGGAGATCTTCTTTCGACCAAGTCCAAGAACGGCTACGC
CGGCTACATCGACGGCGGGCGCCTCCCAAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTTATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCG
AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG
GAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCACCAAG
ATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCGGCAGG
AGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGAT

10

20

30

40

50

CGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACGTGGGC
CCCCCTGGCCCCGGGGCAACTCCC GGTTCCGCCTGGATGACCC
GGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCCCTGGAACCTTCGAGGA
GGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCCTTTCATCGAG
CGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGG
TGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTTCACCGT
GTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGC
ATGCGGAAGCCCCGCCTTCTCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGG
CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACC GGAAAGGTGAC
CGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAG
TGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGT
TCAACGCCTCCCTGGGCACTTACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGTGACCCCTGACCCCTGTTTCG
AGGACCGGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACCGGCTGGGGCGCGGCTGTCCCGGAAGCTGA
TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGGCAAGACCATCCT
GGACTTCTCTGAAGTCCGACGGGCTTCGCCAACCGGAACCTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAGGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCCGGCTCCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCCCGGCACAAGCCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAACCAAGACCAACCAGAAAGGGC
CAGAAGAAGTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGCTCCCAAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGG
AGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACCA
CATCGTGCCTCAGTCTTCTCTGAAGGACGACTCCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACC GGGGCAAGT
CCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAACGCTGATCACCC
CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCG
GCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGGCTTCATCAAGCGGCA
GCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCCAG
ATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACG
ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAAGTC
CAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGGAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAACGCCCAACGACG
CCTACCTGAACGCCCGTGGTGGGCAACCGCCCTGATCAAGAA
GTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTGTACGGCGACTAC
AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGC
AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTC
CAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCTTGGCC
AACGGCGAGATCCGGGAAGCGGCCCCCTGATCGAGACCAACG
GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTT
CGCCACCGTGCAGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAAC
ATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCA

10

20

30

40

50

A G G A G T C C A T C C T G C C C A A G C G G A A C T C C G A C A A G C T G A T
 C G C C C G G A A G A A G G A C T G G G A C C C C A A G A A G T A C G G C G G C
 T T C G A C T C C C C C A C C G T G G C C T A C T C C G T G C T G G T G G T G G
 C C A A G G T G G A G A A G G G C A A G T C C A A G A A G C T G A A G T C C G T
 G A A G G A G C T G C T G G G C A T C A C C A T C A T G G A G C G G T C C T C C
 T T C G A G A A G A A C C C C A T C G A C T T C C T G G A G G C C A A G G G C T
 A C A A G G A G G T G A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C C A A
 G T A C T C C C T G T T C G A G C T G G A G A A C G G C C G G A A G C G G A T G
 C T G G C C T C C G C C G G C G A G C T G C A G A A G G G C A A C G A G C T G G
 C C C T G C C C T C C A A G T A C G T G A A C T T C C T G T A C C T G G C C T C
 C C A C T A C G A G A A G C T G A A G G G C T C C C C C G A G G A C A A C G A G
 C A G A A G C A G C T G T T C G T G G A G C A G C A C A A G C A C T A C C T G G
 A C G A G A T C A T C G A G C A G A T C T C C G A G T T C T C C A A G C G G G T
 G A T C C T G G C C G A C G C C A A C C T G G A C A A G G T G C T G T C C G C C
 T A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A T C C G G G A G C A G G C C G
 A G A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C C C T G A C C A A C C T G G G C G C
 C C C C G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C C G G
 A A G C G G T A C A C C T C C A C C A A G G A G G T G C T G G A C G C C A C C C
 T G A T C C A C C A G T C C A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C C C G G A T
 C G A C C T G T C C C A G C T G G G C G G C G A C G G C T C C G G C T C C C C C
 A A G A A G A A G C G G A A G G T G G A C G G C T C C C C C A A G A A G A A G C
 G G A A G G T G G A C T C C G G C

3 5 1

表4の低Aコドンを使用したd C a s 9 ORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

G A C A A G A A G T A C T C C A T C G G C C T G G C C A T C G G C A C C
 A A C T C C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A A G G
 T G C C C T C C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A C C G
 G C A C T C C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G T T C
 G A C T C C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C G G A
 C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T C T G
 C T A C C T G C A G G A G A T C T T C T C C A A C G A G A T G G C C A A G G T G
 G A C G A C T C C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G T C C T T C C T G G
 T G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T C G G
 C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A G A A G T A C C C C
 A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C T C C A C C G
 A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C C C A
 C A T G A T C A A G T T C C G G G G C C A C T T C C T G A T C G A G G G C G A C
 C T G A A C C C C G A C A A C T C C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A T C C
 A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A A C C C
 C A T C A A C G C C T C C G G C G T G G A C G C C A A G G C C A T C C T G T C C
 G C C C G G C T G T C C A A G T C C C G G C G G C T G G A G A A C C T G A T C G
 C C C A G C T G C C C G G C G A G A A G A A G A A C G G C C T G T T C G G C A A
 C C T G A T C G C C C T G T C C C T G G G C C T G A C C C C C A A C T T C A A G
 T C C A A C T T C G A C C T G G C C G A G G A C G C C A A G C T G C A G C T G T
 C C A A G G A C A C C T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T G G C
 C C A G A T C G G C G A C C A G T A C G C C G A C C T G T T C C T G G C C G C C
 A A G A A C C T G T C C G A C G C C A T C C T G C T G T C C G A C A T C C T G C
 G G G T G A A C A C C G A G A T C A C C A A G G C C C C C C T G T C C G C C T C
 C A T G A T C A A G C G G T A C G A C G A G C A C C A C C A G G A C C T G A C C

10

20

30

40

50

CTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGT
ACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGC
CGGCTACATCGACGGCGGCCTCCCAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGGCACCG
AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG
GAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCACCAG
ATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGG
AGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAAGAT
CGAGAAAGATCCTGACCTTCGGGATCCCCTACTACGTGGGC
CCCCTGGCCCCGGGGCAACTCCCGGTTTCGCCTGGATGACCC
GGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCCCTGGAACCTTCGAGGA
GGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCTTTCATCGAG
CGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGG
TGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGT
GTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGC
ATGCGGAAGCCCCGCCTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAAGG
CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGAC
CGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGAG
TGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGAGGACCGGT
TCAACGCCTCCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCCTGACCCCTGTTTCG
AGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACC GGCTGGGGCGCGGCTGTCCCGGAAGCTGA
TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCT
GGACTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACC GGGAACCTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAGGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACCGGTGAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCAACCAGAAAGGGC
CAGAAGAACTCCCGGGAGCGGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGGCTCCCAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGG
AGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACGC
CATCGTGC CCCAGTCTTCTCTGAAGGACGACTCCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGGCAAGT
CCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCC
CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGGCG
GCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGGCA
GCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCCAG
ATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACG
ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTC
CAAGCTGGTGTCCGACTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAAGCCACGACG
CCTACCTGAACGCCCGTGGTGGGCACCCGCCCTGATCAAGAA

10

20

30

40

50

GTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTGTACGGCGACTAC
 AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGC
 AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTC
 CAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCC
 AACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACG
 GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTT
 CGCCACCGTGCAGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAAC
 ATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCA
 AGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGCTGAT
 CGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGC
 TTCGACTCCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGG
 CCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGT
 GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCTC
 TTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGGGCT
 ACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
 GTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATG
 CTGGCCTCCGCGCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGG
 CCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGCCTC
 CCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAACGAG
 CAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGG
 ACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGT
 GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCC
 TACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCG
 AGAACATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGCGC
 CCCC GCCGCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGG
 AAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCC
 TGATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGAT
 CGACCTGTCCCAGCTGGGGCGGCGACGGCGGGCGGCTCCCC
 AAGAAGAAGCGGAAGGTG

352

表4の低Aコドンを使用したdCas9 ORF（NLSなし、および開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACTCCATCGGCCCTGGCCATCGGGCAACC
 AACTCCGTGGGCTGGGCCCGTGATCACCGACGAGTACAAGG
 TGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCG
 GCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTT
 GACTCCGGCGAGACCGCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA
 CCGCCCGGCGGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGATCTG
 CTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTG
 GACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCCTTCTTGG
 TGGAGGAGGACAAGAAGCAGAGCGGCACCCCATCTTCGG
 CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCAAGAGTACCC
 ACCATCTACCACTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCG
 ACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCA
 CATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGAC
 CTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCC
 AGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTTTCGAGGAGAACC
 CATCAACGCCCTCCGGCGGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCC
 GCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCG
 CCCAGCTGCCCGGCGAGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAA

CCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCTGACCCCCCAACTTCAAG
TCCAACCTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGT
CCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
CCAGATCGGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCCCGCC
AAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGC
GGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGTCCGCCTC
CATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACCAGGACCTGACC
CTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGT
ACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGC
CGGCTACATCGACGGCGGGCGCCTCCCCAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCG
AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG
GAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCACCAG
ATCCACCTGGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCGGCAGG
AGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAAAGT
CGAGAAGATCCTGACCTTCCGGGATCCCCCTACTACGTGGGC
CCCCCTGGCCCCGGGGCAACTCCCGGTTTCGCCTGGATGACCC
GGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCCCTGGAACCTTCGAGGA
GGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCCAGTCTTTCATCGAG
CGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG
TGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCGT
GTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGC
ATGCGGAAGCCCCGCCTTCTCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGG
CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGAC
CGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAG
TGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGAGGAGACCGGT
TCAACGCCTCCCTGGGCACTTACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGTGCTGACCCCTGACCCCTGTTTCG
AGGACCGGGGAGATGATCGAGGAGCGGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACCGGCTGGGGCGGGCTGTCCCGGAAGCTGA
TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGGCAAGACCATCCT
GGACTTCTCTGAAGTCCGACGGCTTTCGCCAACCGGAACCTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAGGCCCAAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGGCTCCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCCGGGACAAGCCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAACCAAGACCCAGAAAGGGC
CAGAAGAACTCCCGGGAGCGGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGGCTCCCAAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGG
AGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACGC
CATCGTGCCCCAGTCTTCTCTGAAGGACGACTCCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGGCAAGT
CCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCC
CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCG

10

20

30

40

50

G C C T G T C C G A G C T G G A C A A G G C C G G C T T C A T C A A G C G G C A
 G C T G G T G G A G A C C C G G C A G A T C A C C A A G C A C G T G G C C C A G
 A T C C T G G A C T C C C G G A T G A A C A C C A A G T A C G A C G A G A A C G
 A C A A G C T G A T C C G G G A G G T G A A G G T G A T C A C C C T G A A G T C
 C A A G C T G G T G T C C G A C T T C C G G A A G G A C T T C C A G T T C T A C
 A A G G T G C G G G A G A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C C C A C G A C G
 C C T A C C T G A A C G C C G T G G T G G G C A C C G C C C T G A T C A A G A A
 G T A C C C C A A G C T G G A G T C C G A G T T C G T G T A C G G C G A C T A C
 A A G G T G T A C G A C G T G C G G A A G A T G A T C G C C A A G T C C G A G C
 A G G A G A T C G G C A A G G C C A C C G C C A A G T A C T T C T T C T A C T C
 C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C C G A G A T C A C C C T G G C C
 A A C G G C G A G A T C C G G A A G C G G C C C C T G A T C G A G A C C A A C G
 G C G A G A C C G G C G A G A T C G T G T G G G A C A A G G G C C G G G A C T T
 C G C C A C C G T G C G G A A G G T G C T G T C C A T G C C C C A G G T G A A C
 A T C G T G A A G A A G A C C G A G G T G C A G A C C G G C G G C T T C T C C A
 A G G A G T C C A T C C T G C C C A A G C G G A A C T C C G A C A A G C T G A T
 C G C C C G G A A G A A G G A C T G G G A C C C C A A G A A G T A C G G C G G C
 T T C G A C T C C C C C A C C G T G G C C T A C T C C G T G C T G G T G G T G G
 C C A A G G T G G A G A A G G G C A A G T C C A A G A A G C T G A A G T C C G T
 G A A G G A G C T G C T G G G C A T C A C C A T C A T G G A G C G G T C C T C C
 T T C G A G A A G A A C C C C A T C G A C T T C C T G G A G G C C A A G G G C T
 A C A A G G A G G T G A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C C A A
 G T A C T C C C T G T T C G A G C T G G A G A A C G G C C G G A A G C G G A T G
 C T G G C C T C C G C C G G C G A G C T G C A G A A G G G C A A C G A G C T G G
 C C C T G C C C T C C A A G T A C G T G A A C T T C C T G T A C C T G G C C T C
 C C A C T A C G A G A A G C T G A A G G G C T C C C C C G A G G A C A A C G A G
 C A G A A G C A G C T G T T C G T G G A G C A G C A C A A G C A C T A C C T G G
 A C G A G A T C A T C G A G C A G A T C T C C G A G T T C T C C A A G C G G G T
 G A T C C T G G C C G A C G C C A A C C T G G A C A A G G T G C T G T C C G C C
 T A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A T C C G G G A G C A G G C C G
 A G A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C C C T G A C C A A C C T G G G C G C
 C C C C G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C C G G
 A A G C G G T A C A C C T C C A C C A A G G A G G T G C T G G A C G C C A C C C
 T G A T C C A C C A G T C C A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C C C G G A T
 C G A C C T G T C C C A G C T G G G C G G C G A C

3 5 3

2つのC末端NLS配列を有する、表4の低Aコドンを使用したdCas9 ORF
(開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である)

G A C A A G A A G T A C T C C A T C G G C C T G G C C A T C G G C A C C
 A A C T C C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A A G G
 T G C C C T C C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A C C G
 G C A C T C C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G T T C
 G A C T C C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C G G A
 C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T C T G
 C T A C C T G C A G G A G A T C T T C T C C A A C G A G A T G G C C A A G G T G
 G A C G A C T C C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G T C C T T C C T G G
 T G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T C G G
 C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A G A A G T A C C C C
 A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C T C C A C C G
 A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C C C A

10

20

30

40

50

CATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGGCGAC
CTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCC
CATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCC
GCCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGGCGGCTGGAGAACCTGATCG
CCCAGCTGCCCGGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAA
CCTGATCGCCCTGTCCCTGGGGCCTGACCCCCCAACTTCAAG
TCCAACCTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGT
CCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
CCAGATCGGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCCCTGGCCGCC
AAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGC
GGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGTCCGCCCTC
CATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACC
CTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGT
ACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGC
CGGCTACATCGACGGCGGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCG
AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG
GAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCACCAG
ATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGGCAGG
AGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGAT
CGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCCTACTACGTGGGC
CCCCCTGGCCCCGGGGCAACTCCCGGTTTCGCCTGGATGACCC
GGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCCCTGGAACCTTCGAGGA
GGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCTTTCATCGAG
CGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG
TGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCGT
GTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGC
ATGCGGAAGCCCCGCCTTCTCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGG
CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGAC
CGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAG
TGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGT
TCAACGCCTCCCTGGGGCACCTACCAACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGTGCTGACCCCTGACCCCTGTTTCG
AGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACCGGGCTGGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGA
TCAACGGCATCCGGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCT
GGACTTCTCTGAAGTCCGACGGCTTTCGCCAACC GGAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAGGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCCGGGCACAAGCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAACCAAGACCAACCAGAAAGGGC
CAGAAGAACTCCCGGGAGCGGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGGCTCCCAAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAGAACGGCCGGGGACATGTACGTGGACCAGG

10

20

30

40

50

AGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACGC
CATCGTGCCCCAGTCCTTCTCTGAAGGACGACTCCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACC GG GCAAGT
CCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCC
CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCG
GCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCA
GCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCAG
ATCCTGGACTCCCGGATGAACAACCAAGTACGACGAGAACG
ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTC
CAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAAGCCACGACG
CCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAA
GTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTGTACGGCGACTAC
AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGC
AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTC
CAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCC
AACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACG
GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTT
CGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAAC
ATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCA
AGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGCTGAT
CGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGC
TTCGACTCCCCCACCGTGCCCTACTCCGTGCTGGTGGTGG
CCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGT
GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCC
TTCGAGAAGAACCCTCATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGGGCT
ACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
GTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATG
CTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGG
CCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGCCTC
CCTACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAACGAG
CAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGG
ACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGT
GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCC
TACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCG
AGAACATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAACCTGGGCGC
CCCCGCCGCCCTTCAAGTACTTTCGACACCAACCATCGACCGG
AAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCC
TGATCCACCAGTCCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCGGAT
CGACCTGTCCCAGCTGGGCGGGCGACGGCTCCGGCTCCCCC
AAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCTCCCCCAAGAAGAAGC
GGAAGGTGGACTCCGGC

354

2つのC末端NLS配列を有する、表4の低A/Uコドンを使用したCas9 ORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACAGCATCGGCCCTGGACATCGGCCACC
AACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGG
TGCCCAAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCG

10

20

30

40

50

GCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTC
GACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA
CCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGATCTG
CTACCTGTCAGGAGATCTTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGGTG
GACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTCTGG
TGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCCACCCCATCTTTCGG
CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCC
ACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCG
ACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCA
CATGATCAAGTTCGCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGAC
CTGAACCCCGACAACAGCGACGCTGGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTTTCGAGGAGAACCC
CATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGC
GCCC GGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCG
CCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAA
CCTGATCGCCCTGAGCCTGGGGCCTGACCCCAACTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
CCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCCGCC
AAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCG
GGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAG
CATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACC
CTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAAGT
ACAAGGAGATCTTCTTTCGACCAAGAGCAAGAAGCGGCTACGC
CGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCG
AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG
GAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAG
ATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGGCAGG
AGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAAAGAT
CGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGC
CCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTTCGCCTGGATGACCC
GGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGA
GGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTTCATCGAG
CGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCGT
GTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGC
ATGCGGAAGCCCCGCCTTCTCTGAGCGGCGAGCAGAAAGAGG
CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGAC
CGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAG
TGCTTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGT
TCAACGCCAGCCTGGGCACTACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGTGCTGACCCCTGACCCCTGTTTCG
AGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACCGGCTGGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGA
TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGCTTTCGCCAACCGGAACCTT
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG

10

20

30

40

50

ACATCCAGAAAGGCCCAAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACC GTGAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCCGGGCACAAGCCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCACCCAGAAAGGGC
CAGAAGAACAGCCGGGAGCGGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGG
AGCTGGACATCAACC GGCTGAGCGACTACGACGTGGACCA
CATCGTGC C C CAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAAGAACCGGGGGCAAGA
GCGACAACGTGCC CAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACCC
CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAAGGCCGAGCGGGGGCG
GCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCTATCAAGCGGGCA
GCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAAGCACGTGGCCCCAG
ATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAAGTACGACGAGAACG
ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAG
CAAGCTGGTGAAGCGACTTTCGGGAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGGAGATCAACAACCTACCACCAAGCCCCACGACG
CCTACCTGAACGCCCGTGGTGGGCACCCGCCCTGATCAAGAA
GTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTGTACGGCGACTAC
AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGGAGC
AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGAAC TTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCC
AACGGCGAGATCCGGGAAGCGGGCCCCCTGATCGAGACCAACG
GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGGCCGGGACTT
CGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAAC
ATCGTGAAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAAGCA
AGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGGAACAGCGACAAGCTGAT
CGCCCCGGAAGAAAGGACTGGGACCCCAAGAAAGTACGGCGGC
TTCGACAGCCCCACCGTGGCCCTACAGCGTGCTGGTGGTGG
CCAAGGTGGAGAAGGGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGT
GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGC
TTCGAGAAGAAACCCCATCGACTTCTCTGGAGGGCCAAGGGCT
ACAAGGAGGTGAAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
GTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATG
CTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGCTGG
CCCTGCC CAGCAAGTACGTGAAC TTCTGTACCTGGCCAG
C CACTACGAGAAGCTGAAGGGGAGCCCCGAGGACAACGAG
CAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGG
ACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTT CAGCAAGCGGGT
GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCC
TACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCG
AGAACATCATCCACCTGTTTACCCCTGACCAACCTGGGCGC
CCCCGCCCGCCTTCAAGTACTTTCGACACCAACCATCGACCCG
AAGCGGTACAC CAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCC
TGATCCACCAGAGCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCGGAT
CGACCTGAGCCAGCTGGGCGGGCGACGGCAGCGGCAGCCCC

10

20

30

40

50

A A G A A G A A G C G G A A G G T G G A C G G C A G C C C C A A G A A G A A G C
G G A A G G T G G A C A G C G G C

3 5 5

表4の低A/Uコドンを使用したCas9 ORF (NLSなし、および開始コドン
または終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である)

G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G C C T G G A C A T C G G C A C C
A A C A G C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A A G G
T G C C C A G C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A C C G
G C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G T T C
G A C A G C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C G G A
C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T C T G
C T A C C T G C A G G A G A T C T T C A G C A A C G A G A T G G C C A A G G T G
G A C G A C A G C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G A G C T T C C T G G
T G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T C G G
C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A G A A G T A C C C C
A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C A G C A C C G
A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C C C A
C A T G A T C A A G T T C C G G G G C C A C T T C C T G A T C G A G G G C G A C
C T G A A C C C C G A C A A C A G C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A T C C
A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A A C C C
C A T C A A C G C C A G C G G C G T G G A C G C C A A G G C C A T C C T G A G C
G C C C G G C T G A G C A A G A G C C G G C G G C T G G A G A A C C T G A T C G
C C C A G C T G C C C G G C G A G A A G A A G A A C G G C C T G T T C G G C A A
C C T G A T C G C C C T G A G C C T G G G C C T G A C C C C C A A C T T C A A G
A G C A A C T T C G A C C T G G C C G A G G A C G C C A A G C T G C A G C T G A
G C A A G G A C A C C T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T G G C
C C A G A T C G G C G A C C A G T A C G C C G A C C T G T T C C T G G C C G C C
A A G A A C C T G A G C G A C G C C A T C C T G C T G A G C G A C A T C C T G C
G G G T G A A C A C C G A G A T C A C C A A G G C C C C C C T G A G C G C C A G
C A T G A T C A A G C G G T A C G A C G A G C A C C A C C A G G A C C T G A C C
C T G C T G A A G G C C C T G G T G C G G C A G C A G C T G C C C G A G A A G T
A C A A G G A G A T C T T C T T C G A C C A G A G C A A G A A C G G C T A C G C
C G G C T A C A T C G A C G G C G G C G C C A G C C A G G A G G A G T T C T A C
A A G T T C A T C A A G C C C A T C C T G G A G A A G A T G G A C G G C A C C G
A G G A G C T G C T G G T G A A G C T G A A C C G G G A G G A C C T G C T G C G
G A A G C A G C G G A C C T T C G A C A A C G G C A G C A T C C C C C A C C A G
A T C C A C C T G G G C G A G C T G C A C G C C A T C C T G C G G C G G C A G G
A G G A C T T C T A C C C C T T C C T G A A G G A C A A C C G G G A G A A G A T
C G A G A A G A T C C T G A C C T T C C G G A T C C C C T A C T A C G T G G G C
C C C C T G G C C C G G G G C A A C A G C C G G T T C G C C T G G A T G A C C C
G G A A G A G C G A G G A G A C C A T C A C C C C C T G G A A C T T C G A G G A
G G T G G T G G A C A A G G G C G C C A G C G C C C A G A G C T T C A T C G A G
C G G A T G A C C A A C T T C G A C A A G A A C C T G C C C A A C G A G A A G G
T G C T G C C C A A G C A C A G C C T G C T G T A C G A G T A C T T C A C C G T
G T A C A A C G A G C T G A C C A A G G T G A A G T A C G T G A C C G A G G G C
A T G C G G A A G C C C G C C T T C C T G A G C G G C G A G C A G A A G A A G G
C C A T C G T G G A C C T G C T G T T C A A G A C C A A C C G G A A G G T G A C
C G T G A A G C A G C T G A A G G A G G A C T A C T T C A A G A A G A T C G A G
T G C T T C G A C A G C G T G G A G A T C A G C G G C G T G G A G G A C C G G T
T C A A C G C C A G C C T G G G C A C C T A C C A C G A C C T G C T G A A G A T

10

20

30

40

50

CATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCCTGACCCCTGTTTCG
AGGACC GGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGA
TCAACGGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCT
GGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTTCGCCAACCGGAACCTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCCGG CAGCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACC GTGAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCCGGGCACAAGCCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCACCCAGAAAGGGC
CAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGG
AGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCA
CATCGTGC CCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGA
GCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACC
CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCG
GCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCCGGCTTCATCAAGCGGGCA
GCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCCAG
ATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACG
ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAG
CAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAAGCCCCACGACG
CCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCCGCCCTGATCAAGAA
GTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTTCGTGTACGGCGACTAC
AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGC
AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCC
AACGGCGAGATCCGGAAGCGGGCCCCCTGATCGAGACCAACG
GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGGCCGGGACTT
CGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAAC
ATCGTGAAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCA
AGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGGAACAGCGACAAGCTGAT
CGCCCCGGAAGAAAGGACTGGGGACCCCAAGAAAGTACGGCGGC
TTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGTGGTGGTGG
CCAAGGTGGAGAAAGGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGT
GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGC
TTCGAGAAAGAACCCCATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGGGCT
ACAAGGAGGTGAAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
GTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATG
CTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGCTGG
CCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGCCAG
CCACTACGAGAAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAG
CAGAAAGCAGCTGTTTCGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGG

10

20

30

40

50

ACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTTCAGCAAGCGGGT
GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCC
TACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCG
AGAACATCATCCACCTGTTCAACCTGACCAACCTGGGGCGC
CCCCGCCGCCCTTCAAGTACTTTCGACACCAACCATCGACCCG
AAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCC
TGATCCACCAGAGCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCGGAT
CGACCTGAGCCAGCTGGGCGGGCGAC

356

表4の低A／Uコドンを使用したCas9ニックーゼORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACAGCATCGGCCCTGGCCATCGGCCACC
AACAGCGTGGGCTGGGCCCGTGATCACCGACGAGTACAAGG
TGCCCAAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCG
GCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTC
GACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA
CCGCCCGGCGGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGATCTG
CTACCTGCAAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTG
GACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTCTGG
TGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGG
CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC
ACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCG
ACAAGGCCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCA
CATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCTCTGATCGAGGGGCGAC
CTGAACCCCGACAAACAGCGACGCTGGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCC
CATCAACGCCAGCGGCGTGAGACGCCAAGGCCATCCTGAGC
GCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCG
CCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAA
CCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCGCTGACCCCAACTTCAAG
AGCAAACTTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
CCAGATCGGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCCGCC
AAGAACCCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCG
GGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAG
CATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACC
CTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGT
ACAAGGAGATCTTCTTTCGACCAAGAGCAAGAAGGGCTACGC
CGGCTACATCGACGGCGGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGGCACCG
AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG
GAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAG
ATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGGCAGG
AGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAAAGAT
CGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCTACTACGTGGGC
CCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTTCGCCTGGATGACCC
GGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGA
GGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGGCCAGAGCTTTCATCGAG
CGGATGACCAACTTTCGACAAGAACCCTGCCCAACGAGAAGG
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCGT

10

20

30

40

50

GTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGC
ATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGG
CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGAC
CGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAG
TGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGT
TCAACGCCAGCCTGGGACACCTACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGTGACCCCTGACCCCTGTTTCG
AGGACCGGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACCGGCTGGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGA
TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCT
GGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACCCTGTAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCCGGGCACAAGCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCAACCAGAAAGGGC
CAGAAGAACAGCCGGGAGCGGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGCGAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAGAACGGCCGGGGACATGTACGTGGACCAGG
AGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCA
CATCGTGC CCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACC GGGGCAAGA
GCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAACGCTGATCACCC
CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGGCG
GCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCA
GCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCCAG
ATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACG
ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAG
CAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGGAGATCAACAACCTACCACCAACGCCACGACG
CCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAA
GTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTTCGTGTACGGCGACTAC
AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGC
AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCC
AACGGCGAGATCCGGAAAGCGGGCCCCCTGATCGAGACCAACG
GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTT
CGCCACCGTGC GGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAAC
ATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCA
AGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAAACAGCGACAAGCTGAT
CGCCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGC
TTCGACAGCCCCACCGTGGCCCTACAGCGTGTGGTGGTGG
CCAAGGTGGAGAAGGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT
GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGC
TTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCCTGGAGGGCCAAGGGCT

10

20

30

40

50

ACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
GTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATG
CTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGG
CCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGCCAG
CCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAG
CAGAAGCAGCTGTTTCGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGG
ACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTTCAGCAAGCGGGT
GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCC
TACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCG
AGAACATCATCCACCTGTTTACCCCTGACCAACCTGGGCGC
CCCCGCCGCTTCAAGTACTTTCGACACCACCATCGACCGG
AAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCC
TGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGAT
CGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGCAGCCCC
AAGAAGAAGCGGAAGGTG

357

2つのC末端NLS配列を有する、表4の低A/Uコドンを使用したCas9ニッケアゼORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACAGCATCGGCCCTGGCCATCGGCCACC
AACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGG
TGCCCAAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCG
GCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTC
GACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA
CCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGATCTG
CTACCTGCAGGAGATCTTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTG
GACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTCTGG
TGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCCACCCCATCTTTCGG
CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC
ACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCG
ACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCA
CATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTCTGATCGAGGGCGAC
CTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTTTCGAGGAGAACCC
CATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGC
GCCCGGCTGAGCAAGAGCGCGGCGGCTGGAGAACCTGATCG
CCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAA
CCTGATCGCCCTGAGCCTGGGGCCTGACCCCCAACCTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
CCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCCGCC
AAGAACCCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGC
GGGTGAACACCAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGCCAG
CATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACC
CTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGT
ACAAGGAGATCTTCTTTCGACCAAGAGCAAGAACGGCTACGC
CGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCG
AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG
GAAGCAGCGGACCTTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAG

10

20

30

40

50

ATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCGAGG
AGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAAAGAT
CGAGAAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGC
CCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCC
GGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCCCTGGAACCTTCGAGGA
GGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTTCATCGAG
CGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAAGG
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCGT
GTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGC
ATGCGGAAGCCCCGCCTTCTCTGAGCGGCGAGCAGAAAGAAAGG
CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGAC
CGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGAG
TGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGT
TCAACGCCAGCCTGGGCGACCTACCAACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGTGCTGACCCCTGACCCCTGTTTCG
AGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGA
TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAGGCCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACCCTGAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCGGGCACAAAGCCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCACCCAGAAAGGGC
CAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGCGAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCGAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGG
AGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCA
CATCGTGCCTCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAAGAACCGGGGCAAGA
GCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCGAGCTGCTGAACGCCCAAGCTGATCACCC
CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCG
GCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTTCATCAAGCGGCA
GCTGGTGGAGACCCGGCGAGATCACCAAGCACGTGGCCCCAG
ATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACG
ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAG
CAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCAACCAACGCCACGACG
CCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCAACCGCCCTGATCAAGAA
GTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTGTACGGCGACTAC
AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGC
AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCC
AACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACG
GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTT

10

20

30

40

50

CGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAAC
 ATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCA
 AGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGAT
 CGCCCGGAAGAAGGACTGGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGC
 TTCGACAGCCCCACCGTGCGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGG
 CCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT
 GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGC
 TTCGAGAAGAACCCTATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGGGCT
 ACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
 GTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATG
 CTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGG
 CCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGCCAG
 CCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAG
 CAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGG
 ACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAAGCAAGCGGGT
 GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCC
 TACAACAAGCACCGGGACAAGCCCCATCCGGGAGCAGGCCG
 AGAACATCATCCACCTGTTCACCCCTGACCAACCTGGGGCG
 CCCC GCCGCTTCAAGTACTTTCGACACCACCATCGACCCG
 AAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCC
 TGATCCACCAGAGCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCGGAT
 CGACCTGAGCCAGCTGGGGCGGCGACGGCAGCGGCAGCCCC
 AAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCAGCCCCAAGAAGAAGC
 GGAAGGTGGACAGCGGC

358

表4の低A/Uコドンを使用したCas9ニッカーゼORF（NLSなし、および開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACAGCATCGGCCCTGGCCATCGGGCACCC
 AACAGCGTGGGCTGGGCCCGTGATCACCGACGAGTACAAGG
 TGCCCAAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCG
 GCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTC
 GACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA
 CCGCCCGGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGATCTG
 CTACCTGCAAGGAGATCTTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTG
 GACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTCTGG
 TGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGGCACCCCATCTTCGG
 CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC
 ACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCG
 ACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCA
 CATGATCAAGTTCCGGGGGCCACTTCTCTGATCGAGGGCGAC
 CTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCC
 AGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTTTCGAGGAGAACCC
 CATCAACGCCAGCGGCGTGGAACGCCAAGGCCATCCTGAGC
 GCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCCTGATCG
 CCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAA
 CCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCTGACCCCAACTTCAAG
 AGCAACTTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGA
 GCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
 CCAGATCGGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCCGCC
 AAGAACCCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGC

10

20

30

40

50

GGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAG
CATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACC
CTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGT
ACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGC
CGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCG
AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG
GAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAAG
ATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGGCAGG
AGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAAAGAT
CGAGAAGATCCTGACCTTCCGGGATCCCCTACTACGTGGGC
CCCCTGGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTTCGCCTGGATGACCC
GGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGA
GGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAG
CGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGT
GTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGC
ATGCGGAAGCCCGCCTTCTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGG
CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGAC
CGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAG
TGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGT
TCAACGCCAGCCTGGGCACTACCAACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGTGCTGACCCCTGACCCCTGTTTCG
AGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACCGGCTGGGGCGGGCTGAGCCGGAAGCTGA
TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGCTTTCGCCAACCGGAACCTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAGGCCCGAGGTGAGCGGCGAGGGCGACAGCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCCCGGCACAAGCCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCACCCAGAAGGGC
CAGAAGAACAGCCGGGAGCGGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCGAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAG
AGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCA
CATCGTGTCCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGGCAAGA
GCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCC
CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCG
GCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTTCATCAAGCGGCA
GCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAAG
ATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACG
ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAG
CAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGGAAGGACTTCCAGTTCTAC

10

20

30

40

50

A A G G T G C G G G A G A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C C C A C G A C G
 C C T A C C T G A A C G C C G T G G T G G G C A C C G C C C T G A T C A A G A A
 G T A C C C C A A G C T G G A G A G C G A G T T C G T G T A C G G C G A C T A C
 A A G G T G T A C G A C G T G C G G A A G A T G A T C G C C A A G A G C G A G C
 A G G A G A T C G G C A A G G C C A C C G C C A A G T A C T T C T T C T A C A G
 C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C C G A G A T C A C C C T G G C C
 A A C G G C G A G A T C C G G A A G C G G C C C C T G A T C G A G A C C A A C G
 G C G A G A C C G G C G A G A T C G T G T G G G A C A A G G G C C G G G A C T T
 C G C C A C C G T G C G G A A G G T G C T G A G C A T G C C C C A G G T G A A C
 A T C G T G A A G A A G A C C G A G G T G C A G A C C G G C G G C T T C A G C A
 A G G A G A G C A T C C T G C C C A A G C G G A A C A G C G A C A A G C T G A T
 C G C C C G G A A G A A G G A C T G G G A C C C C A A G A A G T A C G G C G G C
 T T C G A C A G C C C C A C C G T G G C C T A C A G C G T G C T G G T G G T G G
 C C A A G G T G G A G A A G G G C A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G C G T
 G A A G G A G C T G C T G G G C A T C A C C A T C A T G G A G C G G A G C A G C
 T T C G A G A A G A A C C C C A T C G A C T T C C T G G A G G C C A A G G G C T
 A C A A G G A G G T G A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C C A A
 G T A C A G C C T G T T C G A G C T G G A G A A C G G C C G G A A G C G G A T G
 C T G G C C A G C G C C G G C G A G C T G C A G A A G G G C A A C G A G C T G G
 C C C T G C C C A G C A A G T A C G T G A A C T T C C T G T A C C T G G C C A G
 C C A C T A C G A G A A G C T G A A G G G C A G C C C C G A G G A C A A C G A G
 C A G A A G C A G C T G T T C G T G G A G C A G C A C A A G C A C T A C C T G G
 A C G A G A T C A T C G A G C A G A T C A G C G A G T T C A G C A A G C G G G T
 G A T C C T G G C C G A C G C C A A C C T G G A C A A G G T G C T G A G C G C C
 T A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A T C C G G G A G C A G G C C G
 A G A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C C C T G A C C A A C C T G G G C G C
 C C C C G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C C G G
 A A G C G G T A C A C C A G C A C C A A G G A G G T G C T G G A C G C C A C C C
 T G A T C C A C C A G A G C A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C C C G G A T
 C G A C C T G A G C C A G C T G G G C G G C G A C

10

20

30

3 5 9

表4の低A／Uコドンを使用したdCas9 ORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G C C T G G C C A T C G G C A C C
 A A C A G C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A A G G
 T G C C C A G C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A C C G
 G C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G T T C
 G A C A G C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C G G A
 C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T C T G
 C T A C C T G C A G G A G A T C T T C A G C A A C G A G A T G G C C A A G G T G
 G A C G A C A G C T T C T T C C A C C G G C T G G A G G A G A G C T T C C T G G
 T G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T C G G
 C A A C A T C G T G G A C G A G G T G G C C T A C C A C G A G A A G T A C C C C
 A C C A T C T A C C A C C T G C G G A A G A A G C T G G T G G A C A G C A C C G
 A C A A G G C C G A C C T G C G G C T G A T C T A C C T G G C C C T G G C C C A
 C A T G A T C A A G T T C C G G G G C C A C T T C C T G A T C G A G G G C G A C
 C T G A A C C C C G A C A A C A G C G A C G T G G A C A A G C T G T T C A T C C
 A G C T G G T G C A G A C C T A C A A C C A G C T G T T C G A G G A G A A C C C
 C A T C A A C G C C A G C G G C G T G G A C G C C A A G G C C A T C C T G A G C
 G C C C G G C T G A G C A A G A G C C G G C G G C T G G A G A A C C T G A T C G

40

50

CCCAGCTGCCCGGCGAGAAAGAAAGAACGGCCTGTTTCGGCAA
CCTGATCGCCCTGAGCCTGGGGCCTGACCCCAACTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
CCAGATCGGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCCGCC
AAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGC
GGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAG
CATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACC
CTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGT
ACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGC
CGGCTACATCGACGGCGGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCG
AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACC GGAGGACCTGCTGCG
GAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAG
ATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGG
AGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGAT
CGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGC
CCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTTCGCCTGGATGACCC
GGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGA
GGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAG
CGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGT
GTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGC
ATGCGGAAGCCCCGCCTTCTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAAG
CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGAC
CGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAAGATCGAG
TGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGT
TCAACGCCAGCCTGGGCGACCTACCAACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGTGCTGACCCCTGACCCCTGTTTCG
AGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACCGGCTGGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGA
TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGCTTTCGCCAACCGGAACCTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAGGCCCAAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCCGGGCACAAGCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCAACCAGAAAGGGC
CAGAAGAACAGCCGGGAGCGGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGCGAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCGAAGACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAG
AGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACgc
CATCGTGGCCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGGCAAGA
GCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCC

10

20

30

40

50

C A G C G G A A G T T C G A C A A C C T G A C C A A G G C C G A G C G G G G C G
 G C C T G A G C G A G C T G G A C A A G G C C G G C T T C A T C A A G C G G C A
 G C T G G T G G A G A C C C G G C A G A T C A C C A A G C A C G T G G C C C A G
 A T C C T G G A C A G C C G G A T G A A C A C C A A G T A C G A C G A G A A C G
 A C A A G C T G A T C C G G G A G G T G A A G G T G A T C A C C C T G A A G A G
 C A A G C T G G T G A G C G A C T T C C G G A A G G A C T T C C A G T T C T A C
 A A G G T G C G G G A G A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C C C A C G A C G
 C C T A C C T G A A C G C C G T G G T G G G C A C C G C C C T G A T C A A G A A
 G T A C C C C A A G C T G G A G A G C G A G T T C G T G T A C G G C G A C T A C
 A A G G T G T A C G A C G T G C G G A A G A T G A T C G C C A A G A G C G A G C
 A G G A G A T C G G C A A G G C C A C C G C C A A G T A C T T C T T C T A C A G
 C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C C G A G A T C A C C C T G G C C
 A A C G G C G A G A T C C G G A A G C G G C C C C T G A T C G A G A C C A A C G
 G C G A G A C C G G C G A G A T C G T G T G G G A C A A G G G C C G G G A C T T
 C G C C A C C G T G C G G A A G G T G C T G A G C A T G C C C C A G G T G A A C
 A T C G T G A A G A A G A C C G A G G T G C A G A C C G G C G G C T T C A G C A
 A G G A G A G C A T C C T G C C C A A G C G G A A C A G C G A C A A G C T G A T
 C G C C C G G A A G A A G G A C T G G G A C C C C A A G A A G T A C G G C G G C
 T T C G A C A G C C C C A C C G T G G C C T A C A G C G T G C T G G T G G T G G
 C C A A G G T G G A G A A G G G C A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G C G T
 G A A G G A G C T G C T G G G C A T C A C C A T C A T G G A G C G G A G C A G C
 T T C G A G A A G A A C C C C A T C G A C T T C C T G G A G G C C A A G G G C T
 A C A A G G A G G T G A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C C A A
 G T A C A G C C T G T T C G A G C T G G A G A A C G G C C G G A A G C G G A T G
 C T G G C C A G C G C C G G C G A G C T G C A G A A G G G C A A C G A G C T G G
 C C C T G C C C A G C A A G T A C G T G A A C T T C C T G T A C C T G G C C A G
 C C A C T A C G A G A A G C T G A A G G G C A G C C C C G A G G A C A A C G A G
 C A G A A G C A G C T G T T C G T G G A G C A G C A C A A G C A C T A C C T G G
 A C G A G A T C A T C G A G C A G A T C A G C G A G T T C A G C A A G C G G G T
 G A T C C T G G C C G A C G C C A A C C T G G A C A A G G T G C T G A G C G C C
 T A C A A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A T C C G G G A G C A G G C C G
 A G A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C C C T G A C C A A C C T G G G C G C
 C C C C G C C G C C T T C A A G T A C T T C G A C A C C A C C A T C G A C C G G
 A A G C G G T A C A C C A G C A C C A A G G A G G T G C T G G A C G C C A C C C
 T G A T C C A C C A G A G C A T C A C C G G C C T G T A C G A G A C C C G G A T
 C G A C C T G A G C C A G C T G G G C G G C G A C G G C G G C G G C A G C C C C
 A A G A A G A A G C G G A A G G T G

360

2つのC末端NLS配列を有する、表4の低A/Uコドンを使用したdCas9 ORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G C C T G G C C A T C G G C A C C
 A A C A G C G T G G G C T G G G C C G T G A T C A C C G A C G A G T A C A A G G
 T G C C C A G C A A G A A G T T C A A G G T G C T G G G C A A C A C C G A C C G
 G C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G C G C C C T G C T G T T C
 G A C A G C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C T G A A G C G G A
 C C G C C C G G C G G C G G T A C A C C C G G C G G A A G A A C C G G A T C T G
 C T A C C T G C A G G A G A T C T T C A G C A A C G A G A T G G C C A A G G T G
 G A C G A C A G C T T C T T C A C C G G C T G G A G G A G A G C T T C C T G G
 T G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A T C T T C G G

10

20

30

40

50

CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCC
ACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCG
ACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCA
CATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGAC
CTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTATCC
AGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCC
CATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGC
GCCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCG
CCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAA
CCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCTGACCCCCAACCTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
CCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCC
AAGAACCCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGC
GGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGCCAG
CATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAAGGACCTGACC
CTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGT
ACAAGGAGATCTTCTTCGACCAAGAGCAAGAACGGCTACGC
CGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTTATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCG
AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG
GAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAG
ATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGGCAGG
AGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAAAGT
CGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGC
CCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTTCGCCTGGATGACCC
GGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCCCTGGAACCTTCGAGGA
GGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTTCATCGAG
CGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCGT
GTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGC
ATGCGGAAGCCCGCCTTCTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGG
CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGAC
CGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAG
TGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGT
TCAACGCCAGCCTGGGCACTTACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGTGCTGACCCCTGACCCCTGTTTCG
AGGACC GGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACCGGCTGGGGCGGGCTGAGCCGGAAGCTGA
TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGCTTTCGCCAACCGGAACCTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAGGCCCAAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCCGGGCAACAAGCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAACCAAGACCAACCAGAAAGGGC
CAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGG

10

20

30

40

50

GCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCC
 CGTGGAGAACAACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTG
 TACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGG
 AGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACGC
 CATCGTGTCCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
 AACAAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCAGGGGCAAGA
 GCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA
 GAACTACTTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCC
 CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCG
 GCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTTCATCAAGCGGGCA
 GCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAAG
 ATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACG
 ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAG
 CAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAAGGACTTCCAGTTCTAC
 AAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAAGCCACGACG
 CCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCCGCCCTGATCAAGAA
 GTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGACTAC
 AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGC
 AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAG
 CAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCC
 AACGGCGAGATCCGGAAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACG
 GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTT
 CGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAAC
 ATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTTCAGCA
 AGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGAT
 CGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGC
 TTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGG
 CCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT
 GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGC
 TTCGAGAAGAACCCTCATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGGGCT
 ACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
 GTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATG
 CTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGCTGG
 CCCTGCCCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGCCAG
 CCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAG
 CAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGG
 ACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTTCAGCAAGCGGGT
 GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCC
 TACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCG
 AGAACATCATCCACCTGTTTACCCCTGACCAACCTGGGCGC
 CCCC GCCCTTCAAGTACTTTCGACACCAACCATCGACCGG
 AAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCC
 TGATCCACCAGAGCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCGGAT
 CGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCAGCGGCAGCCCC
 AAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCAGCCCCAAGAAGAAGC
 GGAAGGTGGACAGCGGC

361

表4の低A/Uコドンを使用したdCas9 ORF (NLSなし、および開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である)

GACAAGAAGTACAGCATCGGCCCTGGcCATCGGCCACC

10

20

30

40

50

AACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGG
TGCCCAAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCG
GCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTC
GACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGA
CCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACC GGATCTG
CTACCTGCAAGGAGATCTTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTG
GACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTCTGG
TGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTTCGG
CAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC
ACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCG
ACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCA
CATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTCTGATCGAGGGCGAC
CTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACC
CATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGC
GCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCG
CCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAA
CCTGATCGCCCTGAGCCTGGGGCCTGACCCCAACTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
CCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCCGCC
AAGAACCCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGC
GGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAG
CATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACCAAGGACCTGACC
CTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGT
ACAAGGAGATCTTCTTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGC
CGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCG
AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG
GAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAG
ATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCGAGG
AGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGACAACCGGGAGAAAGAT
CGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGC
CCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTTCGCCTGGATGACCC
GGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGA
GGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAAGAGCTTTCATCGAG
CGGATGACCAACTTCGACAAGAACCCTGCCCAACGAGAAGG
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCGT
GTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGC
ATGCGGAAGCCCGCCTTCTCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGG
CCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGAC
CGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAG
TGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGT
TCAACGCCAGCCTGGGCACTTACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAGGAGAACGAG
GACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCCTGACCCCTGTTTCG
AGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGC
CCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG
CGGCGGTACACCGGCTGGGGCGGCTGAGCCGGAAGCTGA
TCAACGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCT

10

20

30

40

50

GGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCCGGAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG
ACATCCAGAAGGCCCAAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCT
GCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATC
AAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGC
TGGTGAAGGTGATGGGCCCGGCACAAAGCCCGAGAACATCGT
GATCGAGATGGCCCCGGGAGAAACCAGACCAACCAGAAAGGGC
CAGAAGAACAGCCGGGAGCGGGATGAAGCGGATCGAGGAGG
GCATCAAGGAGCTGGGCGAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCC
CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCGAGAACGGCCCGGGACATGTACGTGGACCAGG
AGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACg c
CATCGTGTCCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAAGAACCGGGGGCAAGA
GCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACC
CAGCGGAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCG
GCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCCGGCTTCATCAAGCGGCA
GCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCCAG
ATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACG
ACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAG
CAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCAAGCCACGACG
CCTACCTGAACGCCCGTGGTGGGCACCCGCCCTGATCAAGAA
GTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTGTACGGCGACTAC
AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGC
AGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCC
AACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCCTGATCGAGACCAACG
GCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCCGGGACTT
CGCCACCGGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAAC
ATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCA
AGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGAT
CGCCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAAGTACGGCGGC
TTCGACAGCCCCACCGTGGCCCTACAGCGTGCTGGTGGTGG
CCAAGGTGGAGAAGGGGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGT
GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGC
TTCGAGAAAGAACCCCATCGACTTCTCTGGAGGCCAAGGGCT
ACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
GTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAAGCGGATG
CTGGCCAGCGGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGCTGG
CCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCTGTACCTGGCCAG
CCACTACGAGAAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAG
CAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGG
ACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTTCAAGCAAGCGGGT
GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCC
TACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCG
AGAACATCATCCACCTGTTTCAACCTGACCAACCTGGGCGC
CCCCGCCGCTTCAAGTACTTTCGACACCACCATCGACCGG
AAGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCC

10

20

30

40

50

TGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGAT
CGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGAC

362

表4の低Aコドンを使用したNme Cas9 ORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GCCGCGCTTCAAGCCCAACTCCATCAACTACATCCTG
GGCCTGGACATCGGCATCGCCTCCGTGGGCTGGGCCATGG
TGGAGATCGACGAGGAGGAGAACCCCATCCGGCTGATCGA
CCTGGGCGGTGCGGGTGTTCGAGCGGGCCGAGGTGCCCAAG
ACCGGCGACTCCCTGGCCATGGCCCGGCGGCTGGCCCGGT
CCGTGCGGCGGGCTGACCCGGCGGGCGGGCCACCGGCTGCT
GCGGACCCGGCGGGCTGCTGAAGCGGGAGGGCGTGTGCTGCAG
GCCGCCAACTTCGACGAGAACGGCCTGATCAAGTCCCTGC
CCAACACCCCTTGGCAGCTGCGGGCCGCCGCCCTGGACCG
GAAGCTGACCCCCCTGGAGTGGTCCGCCGTGTGTGCTGCAC
CTGATCAAGCACCGGGGCTACCTGTCCAGCGGAAGAAGC
AGGGCGAGACCGCCGACAAAGGAGCTGGGCGCCCTGTGAA
GGGCGTGGCCGGCAACGCCCAAGCCCTGCAGACCGGCGAC
TTCCGGACCCCCCGCCGAGCTGGCCCTGAACAAGTTCGAGA
AGGAGTCCGGCCACATCCGGAACCAGCGGTCCGACTACTC
CCACACCTTCTCCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATC
CTGCTGTTCGAGAAGCAGAAGGAGTTCGGCAACCCCCACG
TGTCCGGCGGGCCTGAAGGAGGGCATCGAGACCCCTGTGAT
GACCCAGCGGGCCCGCCCTGTCCGGCGACGCCGTGCAGAAAG
ATGCTGGGCCACTGCACCTTCGAGCCCGCCGAGCCCAAGG
CCGCCAAGAACACCTACACCGCCGAGCGGTTCATCTGGCT
GACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGGCTCC
GAGCGGGCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCCCTGATGG
ACGAGCCCTACCGGAAGTCCAAGCTGACCTACGCCCCAGGC
CCGGAAAGCTGCTGGGCTGTGGAGGACACCGCCTTCTTCAAG
GGCCTGCGGTAACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCTCCACCC
TGATGGAGATGAAGGCCTACCAAGCCATCTCCCGGGCCCT
GGAGAAGGAGGGCCTGAAGGACAAGAAAGTCCCCCTGAAC
CTGTCCCCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGGACCGCCTTCT
CCCTGTTCAGAACCGACGAGGACATCACCGGCCGGGCTGAA
GGACCGGATCCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGTGTGAAG
CACATCTCCTTCGACAAGTTCGTGCAGATCTCCCTGAAGG
CCCTGCGGCGGATCGTGCCTCTGATGGAGCAGGGCAAGCG
GTACGACGAGGCCTGCGCCGAGATCTACGGCGACCACTAC
GGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAAGATCTACCTGCCCCCA
TCCCCGCCGACGAGATCCGGAAACCCCGTGGTGCTGCGGGC
CCTGTCCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGCGTGGTGCGG
CGGTACGGCTCCCCCGCCCGGATCCACATCGAGACCGCCC
GGGAGGTGGGCAAGTCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGA
GAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAAGGCC
GCCGCCAAGTTCCGGGAGTACTTCCCCAACTTCGTGGGCG
AGCCCAAGTCCAAGGACATCCTGAAGCTGCGGGCTGTACGA
GCAGCAGCACGGCAAGTGCCTGTACTCCGGCAAGGAGATC
AACCTGGGCGCGGCTGAACGAGAAAGGGCTACGTGGAGATCG
ACCACGCCCTGCCCCCTTCTCCCGGACCTGGGACGACTCCTT

10

20

30

40

50

C A A C A A C A A G G T G C T G G T G C T G G G C T C C G A G A A C C A G A A C
 A A G G G C A A C C A G A C C C C T A C G A G T A C T T C A A C G G C A A G G
 A C A A C T C C C G G G A G T G G C A G G A G T T C A A G G C C C G G G T G G A
 G A C C T C C C G G T T C C C C C G G T C C A A G A A G C A G C G G A T C C T G
 C T G C A G A A G T T C G A C G A G G A C G G C T T C A A G G A G C G G A A C C
 T G A A C G A C A C C C G G T A C G T G A A C C G G T T C C T G T G C C A G T T
 C G T G G C C G A C C G G A T G C G G C T G A C C G G C A A G G G C A A G A A G
 C G G G T G T T C G C C T C C A A C G G C C A G A T C A C C A A C C T G C T G C
 G G G G C T T C T G G G G C C T G C G G A A G G T G C G G G C C G A G A A C G A
 C C G G C A C C A C G C C C T G G A C G C C G T G G T G G T G G C C T G C T C C
 A C C G T G G C C A T G C A G C A G A A G A T C A C C C G G T T C G T G C G G T
 A C A A G G A G A T G A A C G C C T T C G A C G G C A A G A C C A T C G A C A A
 G G A G A C C G G C G A G G T G C T G C A C C A G A A G A C C C A C T T C C C C
 C A G C C C T G G G A G T T C T T C G C C C A G G A G G T G A T G A T C C G G G
 T G T T C G G C A A G C C C G A C G G C A A G C C C G A G T T C G A G G A G G C
 C G A C A C C C T G G A G A A G C T G C G G A C C C T G C T G G C C G A G A A G
 C T G T C C T C C C G G C C C G A G G C C G T G C A C G A G T A C G T G A C C C
 C C C T G T T C G T G T C C C G G G C C C C A A C C G G A A G A T G T C C G G
 C C A G G G C C A C A T G G A G A C C G T G A A G T C C G C C A A G C G G C T G
 G A C G A G G G C G T G T C C G T G C T G C G G G T G C C C C T G A C C C A G C
 T G A A G C T G A A G G A C C T G G A G A A G A T G G T G A A C C G G G A G C G
 G G A G C C C A A G C T G T A C G A G G C C C T G A A G G C C C G G C T G G A G
 G C C C A C A A G G A C G A C C C C G C C A A G G C C T T C G C C G A G C C C T
 T C T A C A A G T A C G A C A A G G C C G G C A A C C G G A C C C A G C A G G T
 G A A G G C C G T G C G G G T G G A G C A G G T G C A G A A G A C C G G C G T G
 T G G G T G C G G A A C C A C A A C G G C A T C G C C G A C A A C G C C A C C A
 T G G T G C G G G T G G A C G T G T T C G A G A A G G G C G A C A A G T A C T A
 C C T G G T G C C C A T C T A C T C C T G G C A G G T G G C C A A G G G C A T C
 C T G C C C G A C C G G G C C G T G G T G C A G G G C A A G G A C G A G G A G G
 A C T G G C A G C T G A T C G A C G A C T C C T T C A A C T T C A A G T T C T C
 C C T G C A C C C C A A C G A C C T G G T G G A G G T G A T C A C C A A G A A G
 G C C C G G A T G T T C G G C T A C T T C G C C T C C T G C C A C C G G G G C A
 C C G G C A A C A T C A A C A T C C G G A T C C A C G A C C T G G A C C A C A A
 G A T C G G C A A G A A C G G C A T C C T G G A G G G C A T C G G C G T G A A G
 A C C G C C C T G T C C T T C C A G A A G T A C C A G A T C G A C G A G C T G G
 G C A A G G A G A T C C G G C C C T G C C G G C T G A A G A A G C G G C C C C C
 C G T G C G G T C C G G C A A G C G G A C C G C C G A C G G C T C C G A G T T C
 G A G T C C C C C A A G A A G A A G C G G A A G G T G G A G

10

20

30

3 6 3

表4の低A/Uコドンを使用したNme Cas9 ORF（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

40

G C C G C C T T C A A G C C C A A C A G C A T C A A C T A C A T C C T G
 G G C C T G G A C A T C G G C A T C G C C A G C G T G G G C T G G G C C A T G G
 T G G A G A T C G A C G A G G A G G A G A A C C C C A T C C G G C T G A T C G A
 C C T G G G C G T G C G G G T G T T C G A G C G G G C C G A G G T G C C C A A G
 A C C G G C G A C A G C C T G G C C A T G G C C C G G C G G C T G G C C C G G A
 G C G T G C G G C G G C T G A C C C G G C G G C G G G C C C A C C G G C T G C T
 G C G G A C C C G G C G G C T G C T G A A G C G G G A G G G C G T G C T G C A G
 G C C G C C A A C T T C G A C G A G A A C G G C C T G A T C A A G A G C C T G C
 C C A A C A C C C C C T G G C A G C T G C G G G C C G C C G C C C T G G A C C G

50

GAAGCTGACCCCCCTGGAGTGGAGCGCCGTGCTGCTGCAC
CTGATCAAGCACCGGGGCTACCTGAGCCAGCGGAAGAACG
AGGGCGAGACCGCCGACAAGGAGCTGGGCGCCCTGCTGAA
GGGCGTGGCCGGCAACGCCCAACGCCCTGCAGACCGGGCGAC
TTCCGGACCCCCCGCCGAGCTGGGCCCTGAACAAGTTTCGAGA
AGGAGAGCGGGCCACATCCGGGAACCAGCGGAGCGACTACAG
CCACACCTTTCAGCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATC
CTGCTGTTTCGAGAAGCAGAAGGAGTTTCGGCAACCCCCACG
TGAGCGGGCGGGCCTGAAGGAGGGCATCGAGACCCCTGCTGAT
GACCCAGCGGGCCCGCCCTGAGCGGGCGACGCCGTGCAGAAAG
ATGCTGGGGCCACTGCACCTTCGAGCCCCGCCGAGCCCCAAGG
CCGCCAAGAACAACCTACACCGCCGAGCGGTTTCATCTGGCT
GACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGGGCAGC
GAGCGGGCCCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCCCTGATGG
ACGAGCCCTACCGGAAGAGCAAGCTGACCTACGCCCCAGGC
CCGGAAAGCTGCTGGGGCCTGGAGGACACCGCCTTCTTCAAG
GGCCTGCGGTTACGGCAAGGACAACGCCGAGGCCAGCACCC
TGATGGAGATGAAGGCCCTACCAACGCCATCAGCCGGGGCCCT
GGAGAAGGAGGGGCCTGAAGGACAAGAAGAGCCCCCTGAAC
CTGAGCCCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCCACCGCCTTCA
GCCTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACCGGGCCGGCTGAA
GGACCGGATCCAGCCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTGAAG
CACATCAGCTTTCGACAAGTTTCGTGCAGATCAGCCTGAAGG
CCCTGCGGGCGGATCGTGCCTCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCG
GTACGACGAGGGCCTGCGCCGAGATCTACGGCGACCACTAC
GGCAAGAAGAACACCGAGGAGAAAGATCTACCTGCCCCCCCA
TCCCCGCCGACGAGATCCGGGAACCCCGTGGTGCTGCGGGC
CCTGAGCCAGGCCCCGGAAAGGTGATCAACGGCGTGTTGCGG
CGGTACGGCAGCCCCCGCCCGGATCCACATCGAGACCGGCC
GGGAGGTGGGGCAAGAGCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGA
GAAGCGGCAGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAAGGCC
GCCGCCAAGTTCCGGGAGTACTTCCCCAACTTCGTGGGCG
AGCCCAAGAGCAAGGACATCCTGAAGCTGCGGGCTGTACGA
GCAGCAGCACGGCAAGTGCCCTGTACAGCGGCAAGGAGATC
AACCTGGGGCCGGCTGAACGAGAAGGGCTACGTGGAGATCG
ACCACGCCCTGCCCTTTCAGCCGGACCTGGGACGACAGCTT
CAACAACAAGGTGCTGGTGCTGGGGCAGCGAGAACCAGAAC
AAGGGCAACCAGACCCCCCTACGAGTACTTCAACGGCAAGG
ACAACAGCCGGGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCCCGGGTGGA
GACCAGCCGGTTCCCCCGGAGCAAGAAGCAGCGGATCCTG
CTGCAGAAAGTTTCGACGAGGACGGCTTCAAGGAGCGGGAACC
TGAAACGACACCCGGTACGTGAACCGGTTCTGTGCCAGTT
CGTGGCCGACCGGATGCGGGCTGACCGGCAAGGGCAAGAAAG
CGGGTGTTTCGCCAGCAACGGGCCAGATCACCAACCTGCTGC
GGGGCTTCTGGGGCCTGCGGGAAGGTGCGGGCCGAGAACGA
CCGGCACCAACGCCCTGGACGCCCGTGGTGTTGGCCTGCAGC
ACCGTGGCCATGCAGCAGAAGATCACCCGGTTTCGTGCGGT
ACAAGGAGATGAACGCCCTTCGACGGCAAGACCATCGACAA
GGAGACCGGGCGAGGTGCTGCACCAGAAGACCCACTTCCCC
CAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCCAGGAGGTGATGATCCGGG

10

20

30

40

50

TGTTCTGGCAAGCCCCGACGGGCAAGCCCCGAGTTCTGAGGAGGCG
CGACACCCCTGGAGAAGCTGCGGACCCCTGCTGGCCCGAGAAAG
CTGAGCAGCCGGCCCCGAGGCGGTGCACGAGTACGTGACCC
CCCTGTTCGTGAGCCGGGCCCCCAACCGGAAGATGAGCGG
CCAGGGGCCACATGGAGACCCTGAAGAGCGCCAAGCGGCTG
GACGAGGGCGTGAGCGTGCTGCGGGTGCCCCCTGACCCAGC
TGAAGCTGAAGGACCTGGAGAAGATGGTGAACCGGGAGCG
GGAGCCCCAAGCTGTACGAGGCCCCCTGAAGGCCCGGCTGGAG
GCCCCACAAGGACGACCCCCGCCAAGGCCCTTCGCCCGAGCCCT
TCTACAAGTACGACAAGGCCCGGCAACCGGACCCAGCAGGT
GAAGGCCGTGCGGGTGGAGCAGGTGCAGAAGACCGGCGTG
TGGGTGCGGGAACCAACAACGGGCATCGCCGACAACGCCACCA
TGGTGCGGGTGGACGTGTTCTGAGAAGGGCGACAAGTACTA
CCTGGTGCCCATCTACAGCTGGCAGGTGGCCAAGGGCATC
CTGCCCGACCCGGGCGGTGGTGCAAGGGCAAGGACGAGGAGG
ACTGGCAGCTGATCGACGACAGCTTCAACTTCAAGTTTCAG
CCTGCACCCCAACGACCTGGTGGAGGTGATCACCAAGAAG
GCCCCGGATGTTCTGGCTACTTCTGCCAGCTGCCACCGGGGCA
CCGGCAACATCAACATCCGGATCCACGACCTGGACCAACAA
GATCGGCAAGAACGGCATCCTGGAGGGCATCGGCGTGAAAG
ACCGCCCTGAGCTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAGCTGG
GCAAGGAGATCCGGCCCCCTGCCGGCTGAAGAAGCGGCCCCC
CGTGCGGAGCGGCAAGCGGACCGCCGACGGCAGCGAGTTC
GAGAGCCCCAAGAAGAAGCGGGAAGGTGGAG

364

NLS1を有するCas9のオープンリーディングフレーム（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGGAACA
AACAGCGTTCGGATGGGCAGTCAATCACAGACGAATACAAGG
TCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAG
ACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTT
GACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAA
CAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAATCTG
CTACCTGCAAGGAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGGTC
GACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTCTGG
TCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCTGG
AAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCG
ACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAG
ACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACA
CATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGAC
CTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTCCAGACATACAACCCAGCTGTTCTGAAGAAAACCC
GATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGGCAATCCTGAGC
GCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCG
CACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCTGGAAA
CCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
ACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCA
AAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGA

10

20

30

40

50

GAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCAACCGCTGAGCGCAAG
CATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACA
CTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGT
ACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGC
AGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAG
AAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG
AAAGCAGAGAACATTCGACAAACGGAAGCATCCCGCACCCAG
ATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACAGG
AAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGAT
CGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGA
CCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCCTGGAACTTCGAAGA
AGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAA
AGAATGACAAACTTCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAAAGG
TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGT
CTACAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGA
ATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAGAGG
CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTAC
AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAA
TGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGAT
TCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAA
GACATCCTGGAAAGACATCGTCTCTGACACTGTTCG
AAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC
ACACCTGTTTCGACGACAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGA
AGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGA
TCAACGGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAGGGAAG
ACATCCAGAAGGGCACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAGCCT
GCACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATC
AAGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAAC
TGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGT
CATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAACACAGAAGGGA
CAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAAG
GAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC
GGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCGAAGACGGAAGAGACATGTACGTGACCCAGG
AACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCA
CATCGTCCCGCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTCTCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
GCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCTGTCAGAAGATGAA
GAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAGCTGATCACA
CAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAGGAG
GACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACA
GCTGGTTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAG
ATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAGGTACGACGAAAACG
ACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCAACACTGAAGAG
CAAGCTGGTCAAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTAC

10

20

30

40

50

A A G G T C A G A G A A A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C A C A C G A C G
 C A T A C C T G A A C G C A G T C G T C G G A A C A G C A C T G A T C A A G A A
 G T A C C C G A A G C T G G A A A G C G A A T T C G T C T A C G G A G A C T A C
 A A G G T C T A C G A C G T C A G A A A G A T G A T C G C A A A G A G C G A A C
 A G G A A A T C G G A A A G G C A A C A G C A A A G T A C T T C T T C T A C A G
 C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C A G A A A T C A C A C T G G C A
 A A C G G A G A A A T C A G A A A G A G A C C G C T G A T C G A A A C A A A C G
 G A G A A A C A G G A G A A A T C G T C T G G G A C A A G G G A A G A G A C T T
 C G C A A C A G T C A G A A A G G T C C T G A G C A T G C C G C A G G T C A A C
 A T C G T C A A G A A G A C A G A A G T C C A G A C A G G A G G A T T C A G C A
 A G G A A A G C A T C C T G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C T G A T
 C G C A A G A A A G A A G G A C T G G G A C C C G A A G A A G T A C G G A G G A
 T T C G A C A G C C C G A C A G T C G C A T A C A G C G T C C T G G T C G T C G
 C A A A G G T C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G C G T
 C A A G G A A C T G C T G G G A A T C A C A A T C A T G G A A A G A A G C A G C
 T T C G A A A A G A A C C C G A T C G A C T T C C T G G A A G C A A A G G G A T
 A C A A G G A A G T C A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C G A A
 G T A C A G C C T G T T C G A A C T G G A A A A C G G A A G A A A G A G A A T G
 C T G G C A A G C G C A G G A G A A C T G C A G A A G G G A A A C G A A C T G G
 C A C T G C C G A G C A A G T A C G T C A A C T T C C T G T A C C T G G C A A G
 C C A C T A C G A A A A G C T G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C G A A
 C A G A A G C A G C T G T T C G T C G A A C A G C A C A A G C A C T A C C T G G
 A C G A A A T C A T C G A A C A G A T C A G C G A A T T C A G C A A G A G A G T
 C A T C C T G G C A G A C G C A A A C C T G G A C A A G G T C C T G A G C G C A
 T A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A T C A G A G A A C A G G C A G
 A A A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C A C T G A C A A A C C T G G G A G C
 A C C G G C A G C A T T C A A G T A C T T C G A C A C A A C A A T C G A C A G A
 A A G A G A T A C A C A A G C A C A A A G G A A G T C C T G G A C G C A A C A C
 T G A T C C A C C A G A G C A T C A C A G G A C T G T A C G A A A C A A G A A T
 C G A C C T G A G C C A G C T G G G A G G A G A C G G A G G A G G A A G C C T G
 G C A G C A A A G A G A A G C A G A A C A A C A

3 6 5

N L S 2を有するC a s 9のオープンリーディングフレーム（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G A C T G G A C A T C G G A A C A
 A A C A G C G T C G G A T G G G C A G T C A T C A C A G A C G A A T A C A A G G
 T C C C G A G C A A G A A G T T C A A G G T C C T G G G A A A C A C A G A C A G
 A C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G A G C A C T G C T G T T C
 G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C T G A A G A G A A
 C A G C A A G A A G A A G A T A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A T C T G
 C T A C C T G C A G G A A A T C T T C A G C A A C G A A A T G G C A A A G G T C
 G A C G A C A G C T T C T T C C A C A G A C T G G A A G A A A G C T T C C T G G
 T C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A T C T T C G G
 A A A C A T C G T C G A C G A A G T C G C A T A C C A C G A A A A G T A C C C G
 A C A A T C T A C C A C C T G A G A A A G A A G C T G G T C G A C A G C A C A G
 A C A A G G C A G A C C T G A G A C T G A T C T A C C T G G C A C T G G C A C A
 C A T G A T C A A G T T C A G A G G A C A C T T C C T G A T C G A A G G A G A C
 C T G A A C C C G G A C A A C A G C G A C G T C G A C A A G C T G T T C A T C C
 A G C T G G T C C A G A C A T A C A A C C A G C T G T T C G A A G A A A A C C C
 G A T C A A C G C A A G C G G A G T C G A C G C A A A G G C A A T C C T G A G C

10

20

30

40

50

G C A A G A C T G A G C A A G A G C A G A A G A C T G G A A A A C C T G A T C G
C A C A G C T G C C G G G A G A A A A G A A G A A C G G A C T G T T C G G A A A
C C T G A T C G C A C T G A G C C T G G G A C T G A C A C C G A A C T T C A A G
A G C A A C T T T C G A C C T G G C A G A A G A C G C A A A G C T G C A G C T G A
G C A A G G A C A C A T A C G A C G A C G A C C T G G A C A A C C T G C T G G C
A C A G A T C G G A G A C C A G T A C G C A G A C C T G T T C C T G G C A G C A
A A G A A C C T G A G C G A C G C A A T C C T G C T G A G C G A C A T C C T G A
G A G T C A A C A C A G A A A T C A C A A A G G C A C C G C T G A G C G C A A G
C A T G A T C A A G A G A T A C G A C G A A C A C C A C C A G G A C C T G A C A
C T G C T G A A G G C A C T G G T C A G A C A G C A G C T G C C G G A A A A G T
A C A A G G A A A T C T T C T T C G A C C A G A G C A A G A A C G G A T A C G C
A G G A T A C A T C G A C G G A G G A G C A A G C C A G G A A G A A T T C T A C
A A G T T C A T C A A G C C G A T C C T G G A A A A G A T G G A C G G A A C A G
A A G A A C T G C T G G T C A A G C T G A A C A G A G A A G A C C T G C T G A G
A A A G C A G A G A A C A T T C G A C A A C G G A A G C A T C C C G C A C C A G
A T C C A C C T G G G A G A A C T G C A C G C A A T C C T G A G A A G A C A G G
A A G A C T T C T A C C C G T T C C T G A A G G A C A A C A G A G A A A A G A T
C G A A A A G A T C C T G A C A T T C A G A A T C C C G T A C T A C G T C G G A
C C G C T G G C A A G A G G A A A C A G C A G A T T C G C A T G G A T G A C A A
G A A A G A G C G A A G A A A C A A T C A C A C C G T G G A A C T T C G A A G A
A G T C G T C G A C A A G G G A G C A A G C G C A C A G A G C T T C A T C G A A
A G A A T G A C A A A C T T C G A C A A G A A C C T G C C G A A C G A A A A G G
T C C T G C C G A A G C A C A G C C T G C T G T A C G A A T A C T T C A C A G T
C T A C A A C G A A C T G A C A A A G G T C A A G T A C G T C A C A G A A G G A
A T G A G A A A G C C G G C A T T C C T G A G C G G A G A A C A G A A G A A G G
C A A T C G T C G A C C T G C T G T T C A A G A C A A A C A G A A A G G T C A C
A G T C A A G C A G C T G A A G G A A G A C T A C T T C A A G A A G A T C G A A
T G C T T C G A C A G C G T C G A A A T C A G C G G A G T C G A A G A C A G A T
T C A A C G C A A G C C T G G G A A C A T A C C A C G A C C T G C T G A A G A T
C A T C A A G G A C A A G G A C T T C C T G G A C A A C G A A G A A A A C G A A
G A C A T C C T G G A A G A C A T C G T C C T G A C A C T G A C A C T G T T C G
A A G A C A G A G A A A T G A T C G A A G A A A G A C T G A A G A C A T A C G C
A C A C C T G T T C G A C G A C A A G G T C A T G A A G C A G C T G A A G A G A
A G A A G A T A C A C A G G A T G G G G A A G A C T G A G C A G A A A G C T G A
T C A A C G G A A T C A G A G A C A A G C A G A G C G G A A A G A C A A T C C T
G G A C T T C C T G A A G A G C G A C G G A T T C G C A A A C A G A A A C T T C
A T G C A G C T G A T C C A C G A C G A C A G C C T G A C A T T C A A G G A A G
A C A T C C A G A A G G C A C A G G T C A G C G G A C A G G G A G A C A G C C T
G C A C G A A C A C A T C G C A A A C C T G G C A G G A A G C C C G G C A A T C
A A G A A G G G A A T C C T G C A G A C A G T C A A G G T C G T C G A C G A A C
T G G T C A A G G T C A T G G G A A G A C A C A A G C C G G A A A A C A T C G T
C A T C G A A A T G G C A A G A G A A A A C C A G A C A A C A C A G A A G G G A
C A G A A G A A C A G C A G A G A A A G A A T G A A G A G A A T C G A A G A A G
G A A T C A A G G A A C T G G G A A G C C A G A T C C T G A A G G A A C A C C C
G G T C G A A A A C A C A C A G C T G C A G A A C G A A A A G C T G T A C C T G
T A C T A C C T G C A G A A C G G A A G A G A C A T G T A C G T C G A C C A G G
A A C T G G A C A T C A A C A G A C T G A G C G A C T A C G A C G T C G A C C A
C A T C G T C C C G C A G A G C T T C C T G A A G G A C G A C A G C A T C G A C
A A C A A G G T C C T G A C A A G A A G C G A C A A G A A C A G A G G A A A G A
G C G A C A A C G T C C C G A G C G A A G A A G T C G T C A A G A A G A T G A A

10

20

30

40

50

G A A C T A C T G G A G A C A G C T G C T G A A C G C A A A G C T G A T C A C A
C A G A G A A A G T T C G A C A A C C T G A C A A A G G C A G A G A G A G G A G
G A C T G A G C G A A C T G G A C A A G G C A G G A T T C A T C A A G A G A C A
G C T G G T C G A A A C A A G A C A G A T C A C A A A G C A C G T C G C A C A G
A T C C T G G A C A G C A G A A T G A A C A C A A A G T A C G A C G A A A A C G
A C A A G C T G A T C A G A G A A G T C A A G G T C A T C A C A C T G A A G A G
C A A G C T G G T C A G C G A C T T C A G A A A G G A C T T C C A G T T C T A C
A A G G T C A G A G A A A T C A A C A A C T A C C A C C A C G C A C A C G A C G
C A T A C C T G A A C G C A G T C G T C G G A A C A G C A C T G A T C A A G A A
G T A C C C G A A G C T G G A A A G C G A A T T C G T C T A C G G A G A C T A C
A A G G T C T A C G A C G T C A G A A A G A T G A T C G C A A A G A G C G A A C
A G G A A A T C G G A A A G G C A A C A G C A A A G T A C T T C T T C T A C A G
C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C A G A A A T C A C A C T G G C A
A A C G G A G A A A T C A G A A A G A G A C C G C T G A T C G A A A C A A A C G
G A G A A A C A G G A G A A A T C G T C T G G G A C A A G G G A A G A G A C T T
C G C A A C A G T C A G A A A G G T C C T G A G C A T G C C G C A G G T C A A C
A T C G T C A A G A A G A C A G A A G T C C A G A C A G G A G G A T T C A G C A
A G G A A A G C A T C C T G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C T G A T
C G C A A G A A A G A A G G A C T G G G A C C C G A A G A A G T A C G G A G G A
T T C G A C A G C C C G A C A G T C G C A T A C A G C G T C C T G G T C G T C G
C A A A G G T C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G C G T
C A A G G A A C T G C T G G G A A T C A C A A T C A T G G A A A G A A G C A G C
T T C G A A A A G A A C C C G A T C G A C T T C C T G G A A G C A A A G G G A T
A C A A G G A A G T C A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C G A A
G T A C A G C C T G T T C G A A C T G G A A A A C G G A A G A A A G A G A A T G
C T G G C A A G C G C A G G A G A A C T G C A G A A G G G A A A C G A A C T G G
C A C T G C C G A G C A A G T A C G T C A A C T T C C T G T A C C T G G C A A G
C C A C T A C G A A A A G C T G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C G A A
C A G A A G C A G C T G T T C G T C G A A C A G C A C A A G C A C T A C C T G G
A C G A A A T C A T C G A A C A G A T C A G C G A A T T C A G C A A G A G A G T
C A T C C T G G C A G A C G C A A A C C T G G A C A A G G T C C T G A G C G C A
T A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A T C A G A G A A C A G G C A G
A A A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C A C T G A C A A A C C T G G G A G C
A C C G G C A G C A T T C A A G T A C T T C G A C A C A A C A A T C G A C A G A
A A G A G A T A C A C A A G C A C A A A G G A A G T C C T G G A C G C A A C A C
T G A T C C A C C A G A G C A T C A C A G G A C T G T A C G A A A C A A G A A T
C G A C C T G A G C C A G C T G G G A G G A G A C G G A G G A G G A A G C C A G
G C A G C A A A G A G A A G C A G A A C A A C A

3 6 6

N L S 3を有するC a s 9のオープンリーディングフレーム（開始コドンまたは終止
コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

G A C A A G A A G T A C A G C A T C G G A C T G G A C A T C G G A A C A
A A C A G C G T C G G A T G G G C A G T C A T C A C A G A C G A A T A C A A G G
T C C C G A G C A A G A A G T T C A A G G T C C T G G G A A A C A C A G A C A G
A C A C A G C A T C A A G A A G A A C C T G A T C G G A G C A C T G C T G T T C
G A C A G C G G A G A A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C T G A A G A G A A
C A G C A A G A A G A A G A T A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A T C T G
C T A C C T G C A G G A A A T C T T C A G C A A C G A A A T G G C A A A G G T C
G A C G A C A G C T T C T T C C A C A G A C T G G A A G A A A G C T T C C T G G
T C G A A G A A G A C A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A T C T T C G G

AAACATCGTTCGACGAAGTTCGCATACCACGAAAAGTACCCG
ACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAG
ACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACA
CATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGAC
CTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCC
GATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGC
GCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCG
CACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAA
CCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACCTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
ACAGATCGGAGACCAGTACGCGAGACCTGTTCTTGGCAGCA
AAGAACCCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGA
GAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCAACCGCTGAGCGCAAG
CATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACA
CTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGT
ACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGC
AGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAG
AAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG
AAAGCAGAGAAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCCAG
ATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACAGG
AAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGAT
CGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGA
CCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCCTGGAACTTTCGAAGA
AGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATCGAA
AGAATGACAAAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGG
TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCACAGT
CTACAACGAACCTGACAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGA
ATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAGAGG
CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAAAGGTCAC
AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAA
TGCTTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGAT
TCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAA
GACATCCTGGAAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGTTTCG
AAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC
ACACCCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAGAGA
AGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGA
TCAACGGAAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAGGAAG
ACATCCAGAAAGGCACAGGTTCAGCGGACAGGGAGACAGCCT
GCACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATC
AAGAAGGGAAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAAC
TGGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGT
CATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAACACAGAAAGGGA
CAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAAG

10

20

30

40

50

GAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGGAACACCC
 GGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTG
 TACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTGACCAAGG
 AACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCA
 CATCGTCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
 AACAAAGGTCTCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
 GCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCTGTAAGAAGATGAA
 GAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACA
 CAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCGAGAGAGAGGAG
 GACTGAGCGAACTGGACAAGGCGAGGATTTCATCAAGAGACA
 GCTGGTTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAG
 ATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACG
 ACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAG
 CAAGCTGGTTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTAC
 AAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACACGCGACACGACG
 CATACCTGAACGCGAGTCGTGCGGAACAGCACTGATCAAGAA
 GTACCCGAAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTAC
 AAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAAC
 AGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAG
 CAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA
 AACGGAGAAATCAGAAAGAGAACCGCTGATCGAAACAAACG
 GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTT
 CGCAAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTCAAC
 ATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCA
 AGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT
 CGCAAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGA
 TTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTCTGTCG
 CAAAGGTTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT
 CAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGC
 TTCGAAAAGAACCCTGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGGGAT
 ACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA
 GTACAGCCTGTTTCGAACCTGGAAAACGGAAAGAAAGAGAATG
 CTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAACCTGG
 CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTCTGTACCTGGCAAG
 CCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCCGGAAGACAACGAA
 CAGAAGCAGCTGTTTCGTGCAACAGCACAAGCACTACCTGG
 ACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGT
 CATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCA
 TACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG
 AAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAACCTGGGAGC
 ACCGGCAGCATTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGA
 AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTGGACGCAACAC
 TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAAAT
 CGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCG
 GCACCCGGCAAAGAGAGAAAGAACAACA

3 6 7

NLS4を有するCas9のオープンリーディングフレーム（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACA
 AACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGG

10

20

30

40

50

TCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAG
ACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTC
GACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAA
CAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTG
CTACCTGCAAGGAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTC
GACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTCTGG
TCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGG
AAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCG
ACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAG
ACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACA
CATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGAC
CTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCC
GATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGC
GCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCG
CACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAA
CCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
ACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCA
AAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGA
GAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAG
CATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCGGACCTGACA
CTGCTGAAGGCACTGGTTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGT
ACAAGGAAATCTTCTTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGC
AGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTTAC
AAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAG
AAGAACCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG
AAAGCAGAGAAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCCAG
ATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGG
AAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGAT
CGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGA
CCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCCGTGGAACTTCGAAGA
AGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATCGAA
AGAATGACAAAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGG
TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCACAGT
CTACAACGAACTGACAAAAGGTC AAGTACGTCACAGAAAGGA
ATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAGG
CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAAAGGTCAC
AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAA
TGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGAT
TCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAA
GACATCCTGGAAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGTTTCG
AAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC
ACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGA
AGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGA
TCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTC

10

20

30

40

50

ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTTCAAGGAAG
ACATCCAGAAGGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCT
GCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATC
AAGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAAC
TGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAAACATCGT
CATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCAGACAACACAGAAGGGA
CAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAG
GAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC
GGTCGAAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCGAGAACGGAAAGAGACATGTACGTGACCCAGG
AACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCA
CATCGTCCCAGAGGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
GCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAA
GAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACA
CAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAGGAG
GACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACA
GCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAG
ATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAGGTACGACGAAAACG
ACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAG
CAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGACG
CATACCTGAACGCAGTCGTGGAACAGCACTGATCAAGAA
GTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTAC
AAGGTCTACGACGTGAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAAC
AGGAAATCGGAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA
AACGGAGAAATCAGAAAGAGACCCTGATCGAAACAACG
GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGACTT
CGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTCAAC
ATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCA
AGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT
CGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGA
TTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCTCG
CAAAGGTCGAAAAGGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT
CAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGC
TTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGGGAT
ACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA
GTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAAATG
CTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAACTGG
CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAG
CCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAA
CAGAAGCAGCTGTTCTGTGCAACAGCACAAGCACTACCTGG
ACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGT
CATCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCA
TACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG
AAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAACCTGGGGAGC
ACCGGCAGCATTTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGA
AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACAC
TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAAT

10

20

30

40

50

CGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCAG
GCAGCAAAGAGACCGAGAACAAACA

368

NLS5を有するCas9のオープンリーディングフレーム（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACA
AACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGG
TCCCGAGCAAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAG
ACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTC
GACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGAGAA
CAGCAAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTG
CTACCTGCAGGAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTC
GACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTCTGG
TCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGG
AAACATCGTTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCG
ACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAG
ACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACA
CATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGAC
CTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCC
GATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGC
GCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGATCG
CACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAA
CCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
ACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCA
AAGAACCCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGA
GAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCAACCGCTGAGCGCAAG
CATGATCAAGAGATACGACGAACACCACAGGACCTGACA
CTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGT
ACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGC
AGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTTAC
AAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAG
AAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG
AAAGCAGAGAAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCA
ATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGG
AAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGAT
CGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGA
CCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCCTGGAACTTTCGAAGA
AGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATCGAA
AGAATGACAAAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGG
TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCACAGT
CTACAACGAACCTGACAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGA
ATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAGG
CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAAAGGTCAC
AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAA
TGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGAT
TCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGAT

10

20

30

40

50

CATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAAGAAAACGAA
GACATCCTGGAAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTTCG
AAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC
ACACCTGTTCGACGACAAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGA
AGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGA
TCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCT
GGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAG
ACATCCAGAAGGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCT
GCACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATC
AAGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAAC
TGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGT
CATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGA
CAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAG
GAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC
GGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAGAACGGAAAGAGACATGTACGTGACCCAGG
AACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCA
CATCGTCCCAGAGGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
GCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAA
GAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACA
CAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAGGAG
GACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACA
GCTGGTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTGCGACAG
ATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACG
ACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAG
CAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACACGACACGACG
CATACCTGAACGCGAGTCGTGCGAACAGCACTGATCAAGAA
GTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTAC
AAGGTCTACGACGTGAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAAC
AGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA
AACGGAGAAATCAGAAAGAGACCCTGATCGAAACAAACG
GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGACTT
CGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTCAAC
ATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCA
AGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT
CGCAAGAAAGAAGGACTGGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGA
TTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTCTGTCG
CAAAGGTCGAAAAGGGGAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT
CAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAAGCAGC
TTCGAAAAGAACCCTGATCGACTTCTGGAAGCAAAGGGAT
ACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA
GTACAGCCTGTTTGAACCTGGAAAACGGAAAGAAAGAGAAATG
CTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAACTGG
CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAG
CCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAA
CAGAAGCAGCTGTTTCGTGCAACAGCACAAAGCACTACCTGG

10

20

30

40

50

ACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAGAGT
CATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCA
TACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG
AAAACATCATCCACCTGTTTCACTGACAAACCTGGGAGC
ACCGGCAGCATTTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGA
AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACAC
TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAAT
CGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCAGA
GCAGCAAAGAGACCGAGAAACAACA

369

10

NLS6を有するCas9のオープンリーディングフレーム（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACA
AACAGCGTTCGGATGGGCAGTCAACAGACGAATACAAGG
TCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAACACAGACAG
ACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTT
GACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGAGAA
CAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTG
CTACCTGCAGGAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTC
GACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTCTGG
TCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGG
AAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCG
ACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAG
ACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACA
CATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGAC
CTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCC
GATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGC
GCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGATCG
CACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAA
CCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
ACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCA
AAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGA
GAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAG
CATGATCAAGAGATACGACGAACACCACAGGACCTGACA
CTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGT
ACAAGGAAATCTTCTTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGC
AGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAG
AAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG
AAAGCAGAGAACATTCGACAAACGGAAAGCATCCCGCACACAG
ATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGG
AAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGAT
CGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGA
CCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGA
AGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATCGAA
AGAATGACAAACTTTCGACAAGAACCCTGCCGAACGAAAAGG

20

30

40

50

TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTACAGT
CTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGA
ATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAGG
CAATCGTTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTAC
AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAA
TGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGAT
TCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAA
GACATCCTGGAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGTTTCG
AAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC
ACACCTGTTTCGACGACAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGA
AGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGA
TCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTTCAAGGAAG
ACATCCAGAAAGGCACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAGCCT
GCACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATC
AAGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAAC
TGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGT
CATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAAGGGA
CAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAAG
GAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC
GGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCGAGAACGGAAAGAGACATGTACGTGACCCAGG
AACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCA
CATCGTCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
GCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCTGTCAGAAGATGAA
GAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACA
CAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAGGAG
GACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACA
GCTGGTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTGCGACAG
ATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAGGTACGACGAAAACG
ACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAG
CAAGCTGGTTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCAACGACACGACG
CATACCTGAACGCGAGTCGTGGAACAGCACTGATCAAGAA
GTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTAC
AAGGTCTACGACGTGAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAAC
AGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA
AACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAAACAACG
GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGACTT
CGCAACAGTCAGAAAGGTCTCTGAGCATGCCGCGAGGTCAAC
ATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCA
AGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT
CGCAAGAAAGAAGGACTGGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGA
TTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTCTGTCG
CAAAGGTCTGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT
CAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGC

10

20

30

40

50

TTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGGGGAT
ACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA
GTACAGCCTGTTTGAACCTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATG
CTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAAGAGGGAAACGAACCTGG
CACTGCCGAGCAAAGTACGTCAACTTCTCTGTACCTGGCAAAG
CCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAA
CAGAAGCAGCTGTTTGTCTGAACAGCACAAAGCACTACCTGG
ACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAGAGT
CATCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCA
TACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAAACAGGCGAG
AAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAAACCTGGGAGC
ACCGGCAGCATTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGA
AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTTGGACGCAACAC
TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAAAT
CGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCGCA
GCAGCAAAGAGAAGCTGGAGCATGGCAGCA

370

NLS7を有するCas9のオープンリーディングフレーム（開始コドンまたは終止
コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACA
AACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGG
TCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAACACAGACAG
ACACAGCATCAAGAAGAAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTT
GACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAAACAAGACTGAAGAGAA
CAGCAAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTG
CTACCTGCAGGAATCTTTCAGCAAACGAAATGGCAAAGGTC
GACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTCTGG
TCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTTCGG
AAACATCGTTCGACGAAGTCGCATACCAACGAAAAGTACCCG
ACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAG
ACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACA
CATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGAC
CTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCC
GATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGC
GCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAAACCTGATCG
CACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAA
CCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAG
AGCAAACCTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
ACAGATCGGAGACCAGTACGACAGACCTGTTCTCTGGCAGCA
AAGAAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGA
GAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCAACCGCTGAGCGCAAG
CATGATCAAGAGATACGACGAACACCACAGGACCTGACA
CTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGT
ACAAGGAAATCTTCTTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGC
AGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGGAACAG
AAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG
AAAGCAGAGAACATTCGACAAACGGAAAGCATCCCGCACCAAG

10

20

30

40

50

ATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGG
AAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGAT
CGAAAAGATCCTGACATTTCAGAATCCCGTACTACGTCGGA
CCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGA
AGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATCGAA
AGAATGACAAACTTTCGACAAGA AACCTGCCGAACGAAAAGG
TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCACAGT
CTACAACGAACTGACAAAGGTC AAGTACGTCACAGAAGGA
ATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAAGG
CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACA AACAGAAAGGTCAC
AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAA
TGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGAT
TCAACGCAAGCCTGGGAACATA CCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAA
GACATCCTGGAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGTTTCG
AAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC
ACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGA
AGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGA
TCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAGACAATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTTC AAGGAAG
ACATCCAGAAGGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCT
GCACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATC
AAGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAAC
TGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGT
CATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGA
CAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAAG
GAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC
GGTCGAAAACACACAGCTGCAGAAACGAAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCGAGAACGGAAAGAGACATGTACGTCGACCAAGG
AACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCA
CATCGTCCCGCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
GCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCGTCAAGAAAGATGAA
GAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACA
CAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACA AAAGGCAGAGAGAGGAG
GACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTTCATCAAGAGACA
GCTGGTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAG
ATCCTGGACAGCAGAAATGAACACA AAAGTACGACGAAAACG
ACAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAG
CAAGCTGGTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTCAGAGAAATCAACA ACTACCACACGCACACGACG
CATACCTGAACGCAGTCGTGGAACAGCACTGATCAAGAA
GTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTAC
AAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAAC
AGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGA ACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA
AACGGAGAAATCAGAAAGAGACC GCTGATCGAAACAAACG
GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAAGAGACTT

10

20

30

40

50

CGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAAC
ATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCA
AGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT
CGCAAGAAAGAAGGACTGGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGA
TTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCTGTCG
CAAAGGTTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT
CAAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGC
TTCGAAAAGAACCCTGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGGGAT
ACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA
GTACAGCCTGTTCGAACCTGGAAAACGGAAAGAAAGAGAATG
CTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAAGAAGGGAAACGAACCTGG
CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTCTGTACCTGGCAAG
CCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCCGGAAGACAACGAA
CAGAAGCAGCTGTTCGTTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGG
ACGAAATCATTCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAGAGT
CATCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAGGTCTCTGAGCGCA
TACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG
AAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGC
ACCGGCAGCATTCAGTACTTCGACACAACAATCGACAGA
AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTCTGGACGCAACAC
TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAAT
CGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCGCA
GCAGCAAAGAGAGTCTGGAGCATGGCATTCT

371

NLS8を有するCas9のオープンリーディングフレーム（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACA
AACAGCGTTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGG
TCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCTCTGGGAACACAGACAG
ACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTC
GACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGAGAA
CAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTG
CTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTC
GACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTCTGG
TCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGG
AAACATCGTTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCG
ACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAG
ACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACA
CATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGAC
CTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCC
GATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGC
GCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGATCG
CACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAA
CCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
ACAGATCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCA
AAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGA
GAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAG

10

20

30

40

50

CATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACA
CTGCTGAAGGCCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGT
ACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGC
AGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAG
AAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG
AAAGCAGAGAAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCCAG
ATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGG
AAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGAT
CGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGA
CCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCCTGGAACTTTCGAAGA
AGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAA
AGAATGACAAAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGG
TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGT
CTACAACGAACTGACAAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGA
ATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAAGG
CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAAC
AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAA
TGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGAT
TCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAA
GACATCCTGGAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGTTTCG
AAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC
ACACCTGTTTCGACGACAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGA
AGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGA
TCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGGAAG
ACATCCAGAAGGCCACAGGTCAAGCGGACAGGGAGACAGCCT
GCACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATC
AAGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAAC
TGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGT
CATCGAAATGGCAAGAGAAACCAAGACAACACAGAAGGGA
CAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAAG
GAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC
GGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCCAGG
AACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCA
CATCGTCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTCTCTGACAAGAAAGCGACAAGAACAGAGGAAGA
GCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCTGTC AAGAAAGATGAA
GAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACA
CAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAAAGGCAGAGAGAGGAG
GACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACA
GCTGGTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAG
ATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAGGTACGACGAAAACG
ACAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCACTCACTG AAGAG
CAAGCTGGTTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTCAAGAGAAATCAACAACCTACCACCAACGCACACGACG

10

20

30

40

50

CATACCTGAACGCGAGTCGTGCGGAACAGCACTGATCAAGAA
GTACCCCGAAGCTGGAAAGCGGAATTCTGTCTACGGAGACTAC
AAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAAC
AGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA
AACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACG
GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGACTT
CGCAACAGTCAAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAAC
ATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCA
AGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT
CGCAAGAAAGAAGGACTGGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGA
TTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTTGGTCTCG
CAAAGGTTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT
CAAGGAACCTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGC
TTCGAAAAGAACCCTGATCGACTTCTTGGAAAGCAAAGGGAT
ACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA
GTACAGCCTGTTTGAACCTGGAAACGGAAAGAGAAATG
CTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAACTGG
CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAG
CCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAA
CAGAAGCAGCTGTTCTGTGCAACAGCACAAAGCACTACCTGG
ACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGT
CATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCTTGAGCGCA
TACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG
AAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAACCTGGGAGC
ACCGGCAGCATTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGA
AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTTGACGCAACAC
TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAAT
CGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCGCA
GCAGCAAAGAGAAAGCTGGAGCATGGCATTCT

10

20

30

372

NLS9を有するCas9のオープンリーディングフレーム（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACAGCATCGGCACTGGACATCGGAACA
AACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGG
TCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCTTGGGAAACACAGACAG
ACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCT
GACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGAGAA
CAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTG
CTACCTGCAGGAAATCTTTCAGCAAACGAAATGGCAAAGGTC
GACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTTGG
TCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTTCGG
AAACATCGTTCGACGAAGTCGCATACCAACGAAAAGTACCCG
ACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAG
ACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACA
CATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGAC
CTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCC
GATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGC
GCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCG

40

50

CACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAA
CCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
ACAGATCGGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCA
AAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGA
GAGTCAACACAGAAATCACAAAGGGCACCGCTGAGCGCAAG
CATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACA
CTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGT
ACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGC
AGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAG
AAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG
AAAGCAGAGAAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCCAG
ATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGG
AAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGAT
CGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGA
CCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGA
AGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAA
AGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGG
TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAACAGT
CTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGA
ATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAGGAAGG
CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAAC
AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAA
TGCTTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGAT
TCAACGCAAGCCTGGGAAACATAACACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAA
GACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTTCG
AAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC
ACACCTGTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAGAGA
AGAAGATACACAGGATGGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGA
TCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGGAAG
ACATCCAGAAGGCCACAGGTTCAGCGGACAGGGAGACAGCCT
GCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATC
AAGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAAC
TGGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGT
CATCGAAATGGCAAGAGAGAAAACAGACAACACAGAAGGGA
CAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGGAAG
GAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC
GGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCGAGAACGGAAAGAGACATGTACGTCGACCAGG
AACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCA
CATCGTCCCGCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTCTCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAGA
GCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCTGTC AAGAAGATGAA
GAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACA

10

20

30

40

50

CAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAG
GACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACA
GCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAG
ATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACG
ACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAG
CAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACACGCACACGACG
CATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAA
GTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTACGGAGACTAC
AAGGTCCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAAC
AGGAAATCGGAAAGGC AACAGCAAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA
AACGGAGAAATCAGAAAGAGACCCTGATCGAAACAAACG
GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGACTT
CGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAAC
ATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCA
AGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT
CGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGA
TTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTTGGTCTCG
CAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT
CAAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGC
TTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTTGGAAAGCAAAGGGAT
ACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA
GTACAGCCTGTTTCGAACCTGGAAAAACGGAAGAAAGAGAATG
CTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAAGAAGGGAAACGAACCTGG
CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAG
CCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCCGGAAGACAACGAA
CAGAAGCAGCTGTTTCGTTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGG
ACGAAATCATTCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGT
CATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCA
TACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG
AAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAACCTGGGAGC
ACCGGCAGCATTC AAGTACTTCGACACAACAATCGACAGA
AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTTGGACGCAACAC
TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAAT
CGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCGCA
GCAGCAAAGAGAGAAAGTACTTTCGCAGCA

373

NLS10を有するCas9のオープンリーディングフレーム（開始コドンまたは終
止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACA
AACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGG
TCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAG
ACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTC
GACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAA
CAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTG
CTACCTGCAAGGAAATCTTCAGCAAACGAAATGGCAAAGGTC
GACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTCTGG
TCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGG
AAACATCGTTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCG

10

20

30

40

50

ACAATCTACCACTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAG
ACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACA
CATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGAC
CTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTCCAGACATACAACCAAGCTGTTTCGAAGAAAACCC
GATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGC
GCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCG
CACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAA
CCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAGGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
ACAGATCGGAGACCAGTACGACAGACCTGTTCTCTGGCAGCA
AAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGA
GAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCAACCGCTGAGCGCAAG
CATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAAGGACCTGACA
CTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGT
ACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGC
AGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAG
AAGAACCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG
AAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCCAG
ATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGG
AAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGAT
CGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGA
CCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGA
AGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAA
AGAATGACAAAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGG
TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAACAGT
CTACAACGAACTGACAAGGTTCAAGTACGTACACAGAAGGA
ATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAGAGG
CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAC
AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAA
TGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGAT
TCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAA
GACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTTCG
AAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC
ACACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAGAGA
AGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGA
TCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGGAAG
ACATCCAGAAGGCACAGGTTCAGCGGACAGGGAGACAGCCT
GCACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATC
AAGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAAC
TGGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGT
CATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAAGACAACACAGAAGGGA
CAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAG
GAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC

10

20

30

40

50

GGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGT
TACTACCTGTCAGAACGGAAAGAGACATGTACGTCGACCAGG
AACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCA
CATCGTCCC GCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTCTCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGA
GCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAA
GAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAGCTGATCACA
CAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAG
GACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACA
GCTGGTTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAG
ATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACG
ACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAG
CAAGCTGGTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCAACGCACACGACG
CATACCTGAACGCGAGTCGTGGAACAGCACTGATCAAGAA
GTACCCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTACGGAGACTAC
AAGGTCCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAAC
AGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA
AACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACG
GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGACTT
CGCAACAGTCAAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAAC
ATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCA
AGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT
CGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGA
TTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTTGGTCTCG
CAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT
CAAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGC
TTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGGGAT
ACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA
GTACAGCCTGTTTGAACCTGGAAAAACGGAAGAAAGAGAAATG
CTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAACCTGG
CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTCTGTACCTGGCAAG
CCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAA
CAGAAGCAGCTGTTCTGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGG
ACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAGAGT
CATCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCA
TACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG
AAAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAAACCTGGGAGC
ACCGGCAGCATTTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGA
AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTTGGACGCAACAC
TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAAT
CGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCAGA
GCAGCAAAGAGAAAGGCATTCGCAGCA

374

NLS11を有するCas9のオープンリーディングフレーム（開始コドンまたは終止コドンなし、融合タンパク質コード配列に含めるのに好適である）

GACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACA
AACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGG
TCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAG

10

20

30

40

50

ACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTC
GACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAA
CAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTG
CTACCTGTCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTC
GACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTCTGG
TCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCTGG
AAACATCGTTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCG
ACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAG
ACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACA
CATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGAC
CTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCC
AGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCC
GATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGC
GCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCG
CACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCTGGAAA
CCTGATCGCACTGAGCCTGGGGACTGACACCGAACTTCAAG
AGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAGCTGCAGCTGA
GCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGC
ACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCA
AAGAACCCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGA
GAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCCACCGCTGAGCGCAAG
CATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACA
CTGCTGAAGGCCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGT
ACAAGGAAATCTTCTTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGC
AGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTAC
AAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAG
AAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG
AAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCCAG
ATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGG
AAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGAT
CGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGA
CCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAATCACACC GTGGAAC TTCGAAGA
AGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATCGAA
AGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGG
TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCACAGT
CTACAACGAACTGACAAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGA
ATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGG
CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAC
AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAA
TGCTTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGAT
TCAACGCAAGCCTGGGAAACATACCACGACCTGCTGAAGAT
CATCAAGGACAAAGGACTTCTCTGGACAACGAAAGAAAACGAA
GACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTCTG
AAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC
ACACCTGTTTCGACGACAAGGT CATGAAGCAGCTGAAGAGA
AGAAGATACACAGGATGGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGA
TCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCT
GGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGGAAG

10

20

30

40

50

ACATCCAGAAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCT
GCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATC
AAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGACGAAC
TGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGT
CATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAACACAGAAGGGA
CAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAG
GAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC
GGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTG
TACTACCTGCGAAGACGGAAAGAGACATGTACGTGACCCAGG
AACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCA
CATCGTCCCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGAC
AACAAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAAGAACAGAGGAAGA
GCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAA
GAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACA
CAGAGAAAGTTGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAG
GACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACA
GCTGGTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTGCGACAG
ATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAGTACGACGAAAACG
ACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAG
CAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTAC
AAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACACGACACGACG
CATACCTGAACGCGAGTCGTGGAACAGCACTGATCAAGAA
GTACCCGAAAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTACGGAGACTAC
AAGGTCTACGACGTGAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAAC
AGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAG
CAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA
AACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAACG
GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGACTT
CGCAAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTCAAC
ATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCA
AGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT
CGCAAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGA
TTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTTCGTG
CAAAGGTCGAAAAGGGGAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT
CAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGC
TTCGAAAAGAACC CGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGGGAT
ACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA
GTACAGCCTGTTGAACTGGAAACGGAAGAAAGAGAAATG
CTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAACTGG
CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAG
CCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAA
CAGAAGCAGCTGTTCTGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGG
ACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGT
CATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCA
TACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG
AAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGC
ACCGGCAGCATTCAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGA
AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACAC
TGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAAT
CGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCAGA

10

20

30

40

50

GCAGCAAAGAGAAAGTACTTCGCAGTC

375

XBG UTRおよび表4の低U1コドンをもつCas9 ORFをもつmRNA転写産物

GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAU
CUGCCACCAUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGCCUGGACA
CGGCACCAACAGCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAG
UACAAGGUGCCCAGCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACA
CCGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCU
GCUGUUCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCGAGACUG
AAGAGAACC GCCAGAAAGAAUAACACCGAAGAAAGAAACA
GAAUCUGCUAACCUAGGAGAUUUAGCAACGAGAUUGGC
CAAGGUGGACGACAGCUUCUUCACAGACUGGAGGAGAGC
UUCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCAGAGAGACACCCCA
UCUUCGGCAACAUCUGGACGAGGUGGCCUACCAACGAGAA
GUACCCCAACCAUCUACCAACCUAGAGAAAGAACUGGUGGAC
AGCACCGACAAAGGCCGACCUAGAGACUGAUUCUACCUGGCCC
UGGCCCAACAUGAUCAAGUUCAGAGGCCACUUCUGAUUGA
GGGCGACCUGAACCCCGACAACAGCGACGUGGACAAGCUG
UUCAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACAGCUGUUCGAGG
AGAACCCCAUCAACGCCAGCGGCGUGGACGCCAAGGCCAU
CCUGAGCGCCAGACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAGAAC
CUGAUUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAAGAAAGAACGGCCUGU
UCGGCAACCUGAUUCGCCCUAGGCCUGGGCCUGACCCCCCAA
CUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUG
CAGCUGAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACC
UGCUGGCCCAGAUUCGGCGACCAAGUACGCCGACCUGUUCCU
GGCCGCCAAGAAACCUAGCGACGCCAUCCUGCUGAGCGAC
AUCCUGAGAGUGAACAACCGAGAUCAACCAAGGCCCCCUGA
GCGCCAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAGCACCAACAGGA
CCUGACCCUGCUGAAGGCCCUUGGUGAGACAGCAGCUGCCC
GAGAAGUACAAGGAGAUUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACG
GCUACGCCCGGCUACAUCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGA
GUUCUACAAGUUAUCAAGGCCAUCCUGGAGAAAGAUUGGAC
GGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACAGAGAGGACC
UGCUGAGAAAGCAGAGAAACCUUCGACAACGGCAGCAUCCC
CCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGAGA
AGACAGGAGGACUUCUACCCCUUCUGAAGGACAACAGAG
AGAAGAUUCGAGAAAGAUCCUGACCUUCAGAAUCCCCUACUA
CGUGGGGCCCCCUGGCCAGAGGCAACAGCAGAUUCGCCUGG
AUGACCAAGAAAGAGCGAGGAGACCAUACCCCCUGGAACU
UCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCUU
CAUCGAGAGAAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAAC
GAGAAGGUGCUGCCCAAGCACAGCCUGCUGUACGAGUACU
UCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGAC
CGAGGGCAUGAGAAAGCCCGCCUUCUGAGCGGCGAGCAG
AAGAAAGGCCAUUCUGGACCUUGCUGUUAAGACCAACAGAA
AGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUAAGAA
GAUCGAGUGCUUCGACAGCGUGGAGAUACGCGGCGUGGAG
GACAGAUUCAACGCCAGCCUGGGCAACCUACCAACGACCUGC

10

20

30

40

50

UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUC CUGGACAACGAGGA
GAACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACC
CUGUUCGAGGACAGAGAGAUGAUCGAGGAGAGACUGAAGA
CCUACGCCCAACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCU
GAAGAGAAAGAAUAACACCGGCUUGGGGCAGACUGAGCAGA
AAGCUGAUAACGGCAUCAGAGACAAGCAGAGCGGGCAAGA
CCAUCCUGGACUUC CUGAAGAGCGACGGCUUCGCCAACAG
AAACUUCAUGCAGCUGAUC CACGACGACAGCCUGACCUC
AAGGAGGACAUCCAGAAAGGCCCAAGGUGAGCGGCCAGGGCG
ACAGCCUGCACGAGCACAUUCGCCAAC CUGGCCCGGCAGCCC
CGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCUGUAAGGUGGUG
GACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCAGACACAAGCCCCGAGA
ACAUCGUGAUCGAGAUGGCCAGAGAGAAACCAGACCACCCA
GAAGGGGCCAGAAAGAACAGCAGAGAGAGAAUGAAGAGAAUC
GAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAGG
AGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAAGCU
GUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCAGAGACAUGUACGUG
GACCAGGAGCUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACG
UGGACCAACAUCGUGCCCCAGAGCUUC CUGAAGGACGACAG
CAUCGACAACAAGGUGCUGACCAGAAAGCGACAAGAACAGA
GGCAAGAGCGACAACGUGCCCCAGCGAGGAGGUGGUGAAGA
AGAUGAAGAAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCCAAGCU
GAUCACCCAGAGAAAGUUCGACAACCUGACC AAGGCCGAG
AGAGGGCGGCCUGAGCGAGCUGGACAAGGCCCGGCUUCAUCA
AGAGACAGCUGGUGGAGACCAGACAGAUCAACCAAGCACGU
GGCCCAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACCAAGUACGAC
GAGAACGACAAGCUGAUCAGAGAGGUGAAGGUGAUCACCC
UGAAGAGCAAGCUGGUGAGCGACUUCAGAAAGGACUUC CA
GUUCUACAAGGUGAGAGAGAUCAACAACUACCACCAACGCC
CACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCCGCCCUGA
UCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGAGCGAGUUCGUGUACGG
CGACUACAAGGUGUACGACGUGAGAAAGAUGAUCGCCAAG
AGCGAGCAGGAGAUCCGGCAAGGCCACCCGCCAAGUACUUCU
UCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUC AAGACCAGGAUCAC
CCUGGCCAACGGCGAGAUCAAGAAAGAGACCC CUGAUCGAG
ACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCCUGUGUGGGACAAGGGCA
GAGACUUCGCCACCGUGAGAAAGGUGCUGAGCAUGCCCCA
GGUGAACAUCCUGAAGAAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGC
UUCAGCAAGGAGAGCAUCCUGCCCCAAGAGAAACAGCGACA
AGCUGAUCGCCAGAAAGAAAGGACUGGGACCCCAAGAAAGUA
CGGCGGCUUCGACAGCCCCACCGUGGCCUACAGCGUGCUG
GUGGUGGCCAAGGUGGAGAAAGGGCAAGAGCAAGAAAGCUGA
AGAGCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCAACCAUCAUGGAGAG
AAGCAGCUUCGAGAAAGAACCCCAUCGACUUC CUGGAGGCC
AAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAAGGACCUGAUCAUCAAGC
UGCCCAAGUACAGCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCAGAAA
GAGAAUGCUGGCCAGCGCCGGCGAGCUGCAGAAAGGGCAAC
GAGCUGGCCCUGCCAGCAAGUACGUGAACUUC CUGUACC
UGGCCAGCCACUACGAGAAAGCUGAAGGGCAGCCCCGAGGA
CAACGAGCAGAAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAAGCAC

10

20

30

40

50

U A C C U G G A C G A G A U C A U C G A G C A G A U C A G C G A G U U C A G C A
 A G A G A G U G A U C C U G G C C G A C G C C A A C C U G G A C A A G G U G C U
 G A G C G C C U A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C C A U C A G A G A G
 C A G G C C G A G A A C A U C A U C C A C C U G U U C A C C C U G A C C A A C C
 U G G G C G C C C C C G C C G C C U U C A A G U A C U U C G A C A C C A C C A U
 C G A C A G A A A G A G A U A C A C C A G C A C C A A G G A G G U G C U G G A C
 G C C A C C C U G A U C C A C C A G A G C A U C A C C G G C C U G U A C G A G A
 C C A G A A U C G A C C U G A G C C A G C U G G G C G G C G A C G G C G G C G G
 C A G C C C C A A G A A G A A G A G A A A G G U G U G A C U A G C A C C A G C C
 U C A A G A A C A C C C G A A U G G A G U C U C U A A G C U A C A U A A U A C C
 A A C U U A C A C U U U A C A A A A U G U U G U C C C C C A A A A A U G U A G C C
 A U U C G U A U C U G C U C C U A A U A A A A A G A A A G U U U C U U C A C A U
 U C U C U C G A G A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
 A A A A A A A A A A

3 7 6

X B G U T R および表 4 の低 A コドン を有する C a s 9 O R F を有する m R N A
 転写産物

G G G A A G C U C A G A A U A A A C G C U C A A C U U U G G C C G G A U
 C U G C C A C C A U G G A C A A G A A G U A C U C C A U C G G C C U G G A C A U
 C G G C A C C A A C U C C G U G G G C U G G G C C G U G A U C A C C G A C G A G
 U A C A A G G U G C C C U C C A A G A A G U U C A A G G U G C U G G G C A A C A
 C C G A C C G G C A C U C C A U C A A G A A G A A C C U G A U C G G C G C C C U
 G C U G U U C G A C U C C G G C G A G A C C G C C G A G G C C A C C C G G C U G
 A A G C G G A C C G C C C G G C G G C G G U A C A C C C G G C G G A A G A A C C
 G G A U C U G C U A C C U G C A G G A G A U C U U C U C C A A C G A G A U G G C
 C A A G G U G G A C G A C U C C U U C U U C C A C C G G C U G G A G G A G U C C
 U U C C U G G U G G A G G A G G A C A A G A A G C A C G A G C G G C A C C C C A
 U C U U C G G C A A C A U C G U G G A C G A G G U G G C C U A C C A C G A G A A
 G U A C C C C A C C A U C U A C C A C C U G C G G A A G A A G C U G G U G G A C
 U C C A C C G A C A A G G C C G A C C U G C G G C U G A U C U A C C U G G C C C
 U G G C C C A C A U G A U C A A G U U C C G G G G C C A C U U C C U G A U C G A
 G G G C G A C C U G A A C C C C G A C A A C U C C G A C G U G G A C A A G C U G
 U U C A U C C A G C U G G U G C A G A C C U A C A A C C A G C U G U U C G A G G
 A G A A C C C C A U C A A C G C C U C C G G C G U G G A C G C C A A G G C C A U
 C C U G U C C G C C C G G C U G U C C A A G U C C C G G C G G C U G G A G A A C
 C U G A U C G C C C A G C U G C C C G G C G A G A A G A A G A A C G G C C U G U
 U C G G C A A C C U G A U C G C C C U G U C C C U G G G C C U G A C C C C C A A
 C U U C A A G U C C A A C U U C G A C C U G G C C G A G G A C G C C A A G C U G
 C A G C U G U C C A A G G A C A C C U A C G A C G A C G A C C U G G A C A A C C
 U G C U G G C C C A G A U C G G C G A C C A G U A C G C C G A C C U G U U C C U
 G G C C G C C A A G A A C C U G U C C G A C G C C A U C C U G C U G U C C G A C
 A U C C U G C G G G U G A A C A C C G A G A U C A C C A A G G C C C C C C U G U
 C C G C C U C C A U G A U C A A G C G G U A C G A C G A G C A C C A C C A G G A
 C C U G A C C C U G C U G A A G G C C C U G G U G C G G C A G C A G C U G C C C
 G A G A A G U A C A A G G A G A U C U U C U U C G A C C A G U C C A A G A A C G
 G C U A C G C C G G C U A C A U C G A C G G C G G C G C C U C C C A G G A G G A
 G U U C U A C A A G U U C A U C A A G C C C A U C C U G G A G A A G A U G G A C
 G G C A C C G A G G A G C U G C U G G U G A A G C U G A A C C G G G A G G A C C
 U G C U G C G G A A G C A G C G G A C C U U C G A C A A C G G C U C C A U C C C

10

20

30

40

50

CCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUC CUGCGG
CGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGG
AGAAGAU CGAGAGAUCCUGACC UUC CGGAUCCCCUACUA
CGUGGGGCCCCUGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGG
AUGACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUACCCCCUGGAACU
UCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUU
CAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAAC
GAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCCCUGCUGUACGAGUACU
UCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGAC
CGAGGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUC CUGUCCGGCGAGCAG
AAGAAGGCCAU CGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGA
AGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAA
GAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAU CUC CGGCUGGAG
GACCGGUUCAACGCCUCC CUGGGCACCUACCAACGACCUGC
UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUC CUGGACAACGAGGA
GAACGAGGACAUC CUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACC
CUGUUCGAGGACCGGGAGAU GAUCGAGGAGCGGCUGAAGA
CCUACGCCCAAC CUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCU
GAAGCGGC GGC GGUACACCGGCUGGGGCGGCUGUCCCGG
AAGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGA
CCAUCCUGGACUUC CUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCG
GAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCC CUGACC UUC
AAGGAGGACAUC CAGAAGGCC CAGGUGUCCGGCCAGGGCG
ACUCC CUGCACGAGCACAU CGCCAAAC CUGGCCGGCUC CCG
CGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACC GUGAAGGUGGUG
GACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAAGCCCGAGA
ACAUCGUGAU CGAGAU GGCCCGGGAGAAC CAGACCACCCA
GAAGGGGCCAGAAAGAACUCCCGGGGAGCGGAUGAAGCGGAUC
GAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCC CAGAUC CUGAAGG
AGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAAGCU
GUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUG
GACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACG
UGGACCAACAUCGUGCCCCAGUCCUUC CUGAAGGACGACUC
CAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAAACCGG
GGCAAGUCCGACAACGUGCCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGA
AGAUGAAGAAACUACUGGC GGCAGCUGCUGAACGCCAAGCU
GAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAAC CUGACCAAGGCCGAG
CGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCA
AGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUCAACCAAGCACGU
GGCCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACCAAGUACGAC
GAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCAACC
UGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUC CCGGAAGGACUUC CA
GUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCAACCAACGCC
CACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCC CUGA
UCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGG
CGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAG
UCCGAGCAGGAGAU CGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCU
UCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAGAUAC
CCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAAGCGGCCCCUGAU CGAG
ACCAACGGCGAGACCGGC GAGAU CGUGUGGGACAAGGGCC

10

20

30

40

50

GGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCA
GGUGAACAUUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGC
UUCUCCAAGGAGUCCAUCUGCCCAAGCGGAACUCCGACA
AGCUGAUUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAAGUA
CGGCGGCUUCGACUCCCCCACCGUGGCUACUCCGUGCUG
GUGGUGGCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGA
AGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUACCAUCAUGGAGCG
GUCCUCCUUCGAGAAGAACCACAUCGACUUCUGGAGGCC
AAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUAAGC
UGCCCAAGUACUCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAA
GCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAAC
GAGCUGGCCCUGCCCUCCAAGUACGUGAACUUCUGUACC
UGGCCUCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCCGAGGA
CAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAAGCAC
UACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCCGAGUUCUCCA
AGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCU
GUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGGGAG
CAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACC
UGGGCGCCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAU
CGACC GGAAAGCGGUACACCUCACCAAGGAGGUGCUGGAC
GCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUACCCGGCCUGUACGAGA
CCCCGGAUCGACCUGUCCAGCUGGGCGGCGACGGCGGCGG
CUCCCCCAAGAAAGAGCGGAAGGUGUGACUAGCACCAAGCC
UCAAGAACACCCGA AUGGAGUCUCUAAGCUACAUAUAUACC
AACUUAACACUUAACAAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCC
AUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAAGAAAGUUUCUUCACAU
UCUCUCGAGAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA

377

XBG UTRおよび表4の低U／Aコドンを含むCas9 ORFを有するmRNA転写産物

GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCCGGAU
CUGCCACCAUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGCCUGGACA
CGGCACCAACAGCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAG
UACAAGGUGCCAGCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACA
CCGACC GGACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCU
GUGUUCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCUG
AAGCGGACCGCCCGGCGGCGGUACACC CGGCGGAAGAACC
GGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUUCUUCAGCAACGAGAUGGC
CAAGGUGGACGACAGCUUCUUCACCGGCUGGAGGAGAGC
UUCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCCACCCCA
UCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAA
GUACCCCAACCAUCUACCAACCUUGC GGAAGAAGCUGGUGGAC
AGCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCC
UGGCCCAACAUGAUCAAGUUCGGGGCCACUUCUGAUCGA
GGGCGACCUGAACCCCGACAACAGCGACGUGGACAAGCUG
UUCAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAAGCUGUUCGAGG
AGAACCCCAUCAACGCCAGCGGCGUGGACGCCAAGGCCAU
CCUGAGCGCCCCGGCUGAGCAAGAGCCGGCGGCGUGGAGAAC

CUGAUCGCCAGCUGCCCGGCGAGAGAAGAAACGGCCUGU
UCGGCAACCUGAUCGCCUGAGCCUGGGCCUGACCCCAA
CUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUG
CAGCUGAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACC
UGCUGGCCCAGAUCGGCGACCAAGUACGCCGACCUGUUCU
GGCCGCCAAGAACCUGAGCGACGCCAUCCUGCUGAGCGAC
AUCUGCGGGUGAACACCGAGAUAACCAAGGCCCCCCUGA
GCGCCAGCAUGAUAAGCGGUACGACGAGCACCAACAGGA
CCUGACCCUGCUGAAGGCCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCC
GAGAAGUAACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACG
GCUACGCCCGGCUAUAUCGACGGCGGCAGCCAGGAGGA
GUUCUAACAAGUUAUAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUUGGAC
GGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACC
UGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCAGCAUCCC
CCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGG
CGGCAGGAGGACUUCUAACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGG
AGAAGAUUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUA
CGUGGGCCCCCUGGCCCGGGGCAACAGCCGGUUCGCCUGG
AUGACCCGGGAAGAGCGAGGAGACCAUACCCCCUGGAACU
UCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCUU
CAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAAC
GAGAAGGUGCUGCCCAAGCACAGCCUGCUGUACGAGUACU
UCACCGUGUAACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGAC
CGAGGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCUGAGCGGCAGCAG
AAGAAGGCCAUUCGUGGACCUGCUGUUAAGACCAACCGGA
AGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUAAGAA
GAUCGAGUGCUUCGACAGCGUGGAGAUACAGCGGCUGGAG
GACCGGUUCAACGCCAGCCUGGGCACCUACCAACGACCUGC
UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAGGA
GAACGAGGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACC
CUGUUCGAGGACC GGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGA
CCUACGCCCAACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCU
GAAGCGGCGGC GGUACACCGGCUGGGGCGGCUGAGCCGG
AAGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGA
CCAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGCUUCGCCAACCG
GAACUUAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACCUUC
AAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCAAGGUGAGCGGCCAGGGCG
ACAGCCUGCACGAGCACAUUCGCCAACCUUGGCCGGCAGCCC
CGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCUGUAAGGUGGUG
GACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAAGCCCGAGA
ACAUCGUGAUUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAAGACCAACA
GAAGGGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUC
GAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCUGAAGG
AGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAAGCU
GUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUG
GACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGAGCGACUACGACG
UGGACCAACAUCGUGCCCCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAG
CAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGAGCGACAAGAACCGG
GGCAAGAGCGACAACGUGCCCAGCGAGGAGGUGGUGAAGA
AGAUGAAGAACUACUGGC GGCAGCUGCUGAACGCCAAGCU

10

20

30

40

50

40

50

CCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGA
CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCG
ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAAC
AGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAATCTGC
TACCTGCAGGAAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTTCG
ACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTCTGGT
CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAGAAGACACCCGATCTTCGGA
AACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGA
CAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTTCGACAGCACAGA
CAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACAC
ATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGACC
TGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCA
GCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCG
ATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGCG
CAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGC
ACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAAC
CTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGA
GCAACTTTCGACCCTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAG
CAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCA
CAGATCGGAGACCAGTACGACAGACCTGTTCTCTGGCAGCAA
AGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAG
AGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGC
ATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCGGACCTGACAC
TGCTGAAGGCACTGGTTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTA
CAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCA
GGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACA
AGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGA
AGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGA
AAGCAGAGAAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCCAGA
TCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGA
AGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATC
GAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGAC
CGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAG
AAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAA
GTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTTCATCGAAA
GAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGT
CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTTCACAGTC
TACAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAA
TGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAGAGGC
AATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCA
GTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAAT
GCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT
CAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATC
ATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAAG
ACATCCTGGAAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTTCA
AGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCA
CACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAGAGAA
GAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGAT
CAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG
GACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAACTTCA

10

20

30

40

50

TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGA
CATCCAGAAGGACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTG
CACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA
AGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAAC
GGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAAACATCGTC
ATCGAAATGGCAAGAGAAAAACCAGACAACACAGAAGGGAC
AGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGG
AATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCG
GTCGAAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAAGCTGTACCTGT
ACTACCTGCGAGAACGGAAAGAGACATGTACGTCGACCAGGA
ACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCAC
ATCGTCCCGCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGACA
ACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAG
CGACAACGTTCCCGAGCGAAGAAGTCTGTCAGAAGATGAAG
AACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACAC
AGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCGAGAGAGAGGAGG
ACTGAGCGAACTGGACAAGGCGAGGATTTCATCAAGAGACAG
CTGGTCGAAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGA
TCCTGGACAGCAGAATGAACACAAGGTACGACGAAAAACGA
CAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGC
AAGCTGGTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACA
AGGTTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCGCACACGACGC
ATACCTGAACGCGAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAG
TACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACA
AGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACA
GGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGC
AACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAA
ACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGG
AGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGACTTC
GCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCGAGGTCAACA
TCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAA
GGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATC
GCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGAT
TCGACAGCCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGCTCGTCGC
AAAGGTCGAAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTC
AAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGCT
TCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTCTGGAAGCAAAGGGATA
CAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAG
TACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAAACGGAAGAAAGAGAAATGC
TGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGGAAACGAACTGGC
ACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGC
CACTACGAAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAAC
AGAAGCAGCTGTTCTGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGA
CGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTTC
ATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCAT
ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGA
AAACATCATCCACCTGTTTCACACTGACAACCTGGGGAGCA
CCGGCAGCATTCAAGTACTTTCGACACAACAATCGACAGAA
AGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTGAGCGCAACACT
GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATC

10

20

30

40

50

GACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCCGA
AGAAGAAGAGAAAGGTCAGCGAAAGCGCAACACCGGAAG
CGTCAGCGGATGGAGACTGTTCAAGAAGATCAGCTAGCTA
GCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATA
AGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTTCATCTCTTT
TTCTTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAAACACCCTGTCTAAAAA
ACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGC
TTCAATTAAATAAAAAAATGGAAAGAACCTCGAGAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

10

379

H i B i T タグ、CMV-1 5' UTR およびヒトALB 3' UTR を有するCas
9 をコードするORF を有するmRNA 転写産物

GGGCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTT
GACCTCCATCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGA
CTGGACATCGGAACAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCA
CAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCT
GGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATC
GGAGCACTGCTGTTGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAA
CAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAG
AAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAAC
GAAATGGCAAAGGTGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGG
AAGAAAGCTTCTGCTGGAAGAACATCGTTCGACGAAGT
ACACCCCGATCTTTCGGAAACATCGTTCGACGAAGT
CACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACTGAGAAAGAAGC
TGGTCGACAGCACAGACAAAGGCAGACCTGAGACTGATCTA
CCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTC
CTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCG
ACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAAGCT
GTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCA
AAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGAC
TGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAA
CGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTG
ACACCGAACTTCAAGAGCAACTTTCGACCTGGCAGAAGACG
CAAAGCTGCGAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCT
GGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGAC
CTGTTCTCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGC
TGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGC
ACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACAC
CACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGC
AGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGAG
CAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGC
CAGGAAGAATTCTACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAA
AGATGGACGGAAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAG
AGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAAACGGA
AGCATCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAA
TCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGA
CAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATC
CCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGAT
TCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAACAATCACACC

20

30

40

50

GTGGAAC T TCGAAGAAGTCGTCGACAAAGGGAGCAAGCGCA
CAGAGCTTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAAGAACC
TGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTA
CGAATACTTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTC AAG
TACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTTCCTGAGCG
GAGAACAGAAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGAC
AAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTAC
TTCAAGAAGATCGAATGCTTTCGACAGCGTCGAAATCAGCG
GAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCA
CGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTTCCTGGAC
AACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGA
CACTGACACTGTTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAG
ACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATG
AAGCAGCTGAAGAGAAGAAAGATACACAGGATGGGGAAAGAC
TGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAG
CGGAAGAGACAATCCTGGACTTTCCTGAAGAGCGACGGATTTC
GCAAACAGAAAAC T TCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCC
TGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCCACAGGTCAGCGG
ACAGGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCA
GGAAGCCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCA
AGGTCGTCGACGAAC TGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAA
GCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAG
ACAACACAGAAAGGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGA
AGAGAAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGAT
CCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAAC
GAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAAGAACGGAAGAGACA
TGTACGTCGACCAGGAAC TGGACATCAACAGACTGAGCGA
CTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTTCCTGAAG
GACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACA
AGAACAGAGGAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAAGT
CGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAAC
GCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAA
AGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGG
ATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAAACAAGACAGATCACA
AAGCACGTTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAA
AGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGT
CATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTTCAGAAAG
GACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAAC TACC
ACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAAC
AGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTC
GTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGA
TCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAGGCCAACAGCAAA
GTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACA
GAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGC
TGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGA
CAAGGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGC
ATGCCGCGAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGA
CAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAA
CAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCG
AAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACA

10

20

30

40

50

GCGTCCTGGTCGTCGCAAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAA
GAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATC
ATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCC
TGGAAAGCAAAGGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGAT
CATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAAC
GGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGA
AGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTT
CCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGC
CCGGAAGACAACGAACAGAAAGCAGCTGTTTCGTGCAACAGC
ACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGA
ATTCAGCAAGAGAGTCAATCCTGGCAGACGCAAACCTGGAC
AAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGA
TCAGAGAACAGGCGAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACT
GACAAACCTGGGAGCACCCGGCAGCATTCAGTACTTTCGAC
ACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAG
TCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACT
GTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGAC
GGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCAGCGAAA
GCGCAACACCCGGAAGCGTCAGCGGATGGAGACTGTTCAA
GAAGATCAGCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCA
GCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATA
GCTTATTTCATCTCTTTTTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCA
ACACCCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTG
CCTCTTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGA
ACCTCGAGAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAA

380

HiBiTタグ、CMV-2 5' UTRおよびヒトALB 3' UTRを有するCas
9をコードするORFを有するmRNA転写産物

GGGAGAAAGACACCCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGGC
CGGGAAACGGCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGA
CTGGACATCGGAACAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCA
CAGACGAATACAAGGTCCCAGGCAAGAAGTTCAAGGTCCT
GGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATC
GGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAA
CAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAG
AAAGAACAGAAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAAC
GAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGG
AAGAAAGCTTCTCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAG
ACACCCGATCTTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATAC
CACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGC
TGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTA
CCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTC
CTGATCGAAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCG
ACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCT
GTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCA
AAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGAC
TGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAA
CGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTG

10

20

30

40

50

ACACCGAACTTCAAGAGCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACG
CAAAGCTGCGAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCT
GGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGAC
CTGTTCTCTGGCAGCAAAGAACCCTGAGCGACGCAATCCTGC
TGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGC
ACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACAC
CACCAAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGC
AGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAG
CAAGAACGGATACGCGAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGC
CAGGAAGAATTCTACAAGTTTCAATCAAGCCGATCCTGGAAA
AGATGGACGGAAACAGAAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAG
AGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGA
AGCATCCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAA
TCCTGAGAAAGACAGGAAGAACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGA
CAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATC
CCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGAT
TCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACC
GTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCA
CAGAGCTTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAAGAAC
TGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTA
CGAATACTTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAG
TACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCG
GAGAACAGAAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGAC
AAACAGAAAGGTCAACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTAC
TTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCG
GAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCA
CGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGAC
AACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGA
CACTGACACTGTTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAG
ACTGAAGACATACGCAACACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATG
AAGCAGCTGAAGAGAAGAAAGATACACAGGATGGGGAAAGAC
TGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAG
CGGAAGACAAATCCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATT
GCAAACAGAAAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCC
TGACATTCGAAGGAAGACATCCAGAAGGACACAGGTTCAGCGG
ACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCA
GGAAGCCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCA
AGGTCTGTCGACGAACCTGGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAA
GCCGGAAAACATCGTTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAAG
ACAACACAGAAGGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAATGA
AGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGAT
CCTGAAGGAACACCCGGTTCGAAAACACACAGCTGCAGAAC
GAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCGAAGACGGAAGAGACA
TGTACGTCGACCAAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGA
CTACGACGTCGACCAACATCGTCCCAGAGCTTCTCTGAAG
GACGACAGCATCGACAACAAGGTCTCTGACAAGAAGCGACA
AGAACAGAGGAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAAGT
CGTCAAGAAGATGAAGAAGTACTGGAGACAGCTGCTGAAC
GCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTTCGACAAACCTGACAA
AGGCAGAGAGAGGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGG

10

20

30

40

50

ATT CATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACA
AAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAA
AGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGT
CATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTTCAGAAAG
GACTTCCAGTTCTACAAGGTTCAGAGAAATCAACAACCTACC
ACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAAC
AGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTC
GTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGA
TCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAA
GTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACA
GAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGC
TGATCGAAACAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGA
CAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTCTGAGC
ATGCCGCGAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGA
CAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAA
CAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGGACCCG
AAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACA
GCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTTCGAAAAGGGAAAGAGCAA
GAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACCTGCTGGGAATCACAATC
ATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACC CGATCGACTTCC
TGGAAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGAT
CATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTCGAACCTGGAA AAC
GGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGA
AGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTT
CCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGC
CCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTTCGTCGAACAGC
ACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGA
ATTCAGCAAGAGAGTCAATCCTGGCAGACGCAAACCTGGAC
AAGGTCTCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGA
TCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACACT
GACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTTCGAC
ACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAG
TCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACT
GTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGAC
GGAGGAGGAAGCCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTTCAGCGAAA
GCGCAACACCGGAAGCGTTCAGCGGATGGAGACTGTTCAA
GAAGATCAGCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCA
GCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAATGAAGATCAATA
GCTTATTATCTCTTTTTTCTTTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCA
ACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTG
CCTCTTTTTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAAATGGAAAGA
ACCTCGAGAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAA
381

HiBiTタグ、CMV-3' 5' UTRおよびヒトALB 3' UTRを有するCas
9をコードするORFを有するmRNA転写産物

GGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGT
GACTCACCGCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGA
CTGGACATCGGAACAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCA

10

20

30

40

50

CAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCTCT
GGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATC
GGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAA
CAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAG
AAAGAACAGAATCTGCTACCTGTCAGGAATCTTTCAGCAAC
GAAATGGCAAAGGTTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGG
AAGAAAGCTTCTCTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAG
ACACCCGATCTTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATAC
CACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGC
TGGTTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTA
CCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTC
CTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCG
ACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCT
GTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCA
AAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGAC
TGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCCAGGAGAAAAGAAGAA
CGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTG
ACACCGAACTTCAAGAGCAACTTTCGACCTGGCAGAAGACG
CAAAGCTGTCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCT
GGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGAC
CTGTTCTCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGC
TGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGC
ACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACAC
CACCAAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTTCAGACAGC
AGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAG
CAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGC
CAGGAAGAATTCTACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAA
AGATGGACGGAAACAGAAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAG
AGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGA
AGCATCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAA
TCCTGAGAAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGA
CAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATC
CCGTACTACGTCCGACCCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGAT
TCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACC
GTGGAACTTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCA
CAGAGCTTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAAGAAC
TGCCGAACGAAAAGGTCTCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTA
CGAATACTTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAG
TACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCG
GAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGAC
AAACAGAAAGGTCAACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTAC
TTCAAGAAGATCGAATGCTTTCGACAGCGTCGAAATCAGCG
GAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCA
CGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGAC
AACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCCTGA
CACTGACACTGTTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAG
ACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATG
AAGCAGCTGAAGAGAAAGAAAGATACACAGGATGGGGAAAGAC
TGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAG
CGGAAAGACAATCCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTC

10

20

30

40

50

G C A A A C A G A A A C T T C A T G C A G C T G A T C C A C G A C G A C A G C C
T G A C A T T C A A G G A A G A C A T C C A G A A G G C A C A G G T C A G C G G
A C A G G G A G A C A G C C T G C A C G A A C A C A T C G C A A A C C T G G C A
G G A A G C C C G G C A A T C A A G A A G G G A A T C C T G C A G A C A G T C A
A G G T C G T C G A C G A A C T G G T C A A G G T C A T G G G A A G A C A C A A
G C C G G A A A A C A T C G T C A T C G A A A T G G C A A G A G A A A A C C A G
A C A A C A C A G A A G G G A C A G A A G A A C A G C A G A G A A A G A A T G A
A G A G A A T C G A A G A A G G A A T C A A G G A A C T G G G A A G C C A G A T
C C T G A A G G A A C A C C C G G T C G A A A A C A C A C A G C T G C A G A A C
G A A A A G C T G T A C C T G T A C T A C C T G C A G A A C G G A A G A G A C A
T G T A C G T C G A C C A G G A A C T G G A C A T C A A C A G A C T G A G C G A
C T A C G A C G T C G A C C A C A T C G T C C C G C A G A G C T T C C T G A A G
G A C G A C A G C A T C G A C A A C A A G G T C C T G A C A A G A A G C G A C A
A G A A C A G A G G A A A G A G C G A C A A C G T C C C G A G C G A A G A A G T
C G T C A A G A A G A T G A A G A A C T A C T G G A G A C A G C T G C T G A A C
G C A A A G C T G A T C A C A C A G A G A A A G T T C G A C A A C C T G A C A A
A G G C A G A G A G A G G A G G A C T G A G C G A A C T G G A C A A G G C A G G
A T T C A T C A A G A G A C A G C T G G T C G A A A C A A G A C A G A T C A C A
A A G C A C G T C G C A C A G A T C C T G G A C A G C A G A A T G A A C A C A A
A G T A C G A C G A A A A C G A C A A G C T G A T C A G A G A A G T C A A G G T
C A T C A C A C T G A A G A G C A A G C T G G T C A G C G A C T T C A G A A A G
G A C T T C C A G T T C T A C A A G G T C A G A G A A A T C A A C A A C T A C C
A C C A C G C A C A C G A C G C A T A C C T G A A C G C A G T C G T C G G A A C
A G C A C T G A T C A A G A A G T A C C C G A A G C T G G A A A G C G A A T T C
G T C T A C G G A G A C T A C A A G G T C T A C G A C G T C A G A A A G A T G A
T C G C A A A G A G C G A A C A G G A A A T C G G A A A G G C A A C A G C A A A
G T A C T T C T T C T A C A G C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C A
G A A A T C A C A C T G G C A A A C G G A G A A A T C A G A A A G A G A C C G C
T G A T C G A A A C A A A C G G A G A A A C A G G A G A A A T C G T C T G G G A
C A A G G G A A G A G A C T T C G C A A C A G T C A G A A A G G T C C T G A G C
A T G C C G C A G G T C A A C A T C G T C A A G A A G A C A G A A G T C C A G A
C A G G A G G A T T C A G C A A G G A A A G C A T C C T G C C G A A G A G A A A
C A G C G A C A A G C T G A T C G C A A G A A A G A A G G A C T G G G A C C C G
A A G A A G T A C G G A G G A T T C G A C A G C C C G A C A G T C G C A T A C A
G C G T C C T G G T C G T C G C A A A G G T C G A A A A G G G A A A G A G C A A
G A A G C T G A A G A G C G T C A A G G A A C T G C T G G G A A T C A C A A T C
A T G G A A A G A A G C A G C T T C G A A A A G A A C C C G A T C G A C T T C C
T G G A A G C A A A G G G A T A C A A G G A A G T C A A G A A G G A C C T G A T
C A T C A A G C T G C C G A A G T A C A G C C T G T T C G A A C T G G A A A A C
G G A A G A A A G A G A A T G C T G G C A A G C G C A G G A G A A C T G C A G A
A G G G A A A C G A A C T G G C A C T G C C G A G C A A G T A C G T C A A C T T
C C T G T A C C T G G C A A G C C A C T A C G A A A A G C T G A A G G G A A G C
C C G G A A G A C A A C G A A C A G A A G C A G C T G T T C G T C G A A C A G C
A C A A G C A C T A C C T G G A C G A A A T C A T C G A A C A G A T C A G C G A
A T T C A G C A A G A G A G T C A T C C T G G C A G A C G C A A A C C T G G A C
A A G G T C C T G A G C G C A T A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A
T C A G A G A A C A G G C A G A A A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C A C T
G A C A A A C C T G G G A G C A C C G G C A G C A T T C A A G T A C T T C G A C
A C A A C A A T C G A C A G A A A G A G A T A C A C A A G C A C A A A G G A A G
T C C T G G A C G C A A C A C T G A T C C A C C A G A G C A T C A C A G G A C T

10

20

30

40

50

GTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGAC
GGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCAGCGAAA
GCGCAACACCGGAAGCGTCAGCGGATGGAGACTGTTCAA
GAAGATCAGCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCA
GCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATA
GCTTATTTCATCTCTTTTCTTTTCTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCA
ACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTG
CCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAAATGGAAAGA
ACCTCGAGAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAA

10

382

HiBiTタグ、HBA 5' UTRおよびヒトALB 3' UTRを有するCas9を
コードするORFを有するmRNA転写産物

GGGCATAAACCTGGCGCGCTCGCGGCCCGGCACTC
TTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCACCCGCCACC
ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA
ACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGT
CCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCTTGGGAAACACAGACAGA
CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCG
ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAAC
AGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGC
TACCTGCAGGAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTTCG
ACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTCTGGT
CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGA
AACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGA
CAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTTCGACAGCACAGA
CAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACAC
ATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGACC
TGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAAGCTGTTTCATCCA
GCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCG
ATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCG
CAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGC
ACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAAC
CTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGA
GCAACTTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAG
CAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCA
CAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAA
AGAACCCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAG
AGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGC
ATGATCAAGAGATACGACGAAACACCACAGGACCTGACAC
TGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTA
CAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCA
GGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACA
AGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGA
AGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGA
AAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCCAGA
TCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACAGGA
AGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATC
GAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGAC

20

30

40

50

CGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAAG
AAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAA
GTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAA
GAATGACAAACTTCGACAAGAACCCTGCCGAACGAAAAGGT
CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTTC
TACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAA
TGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAAGAGGC
AATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAACA
GTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAAT
GCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT
CAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATC
ATCAAGGACAAAGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAAG
ACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTTGA
AGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCA
CACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGCTGAAGAGAA
GAAGATACACAGGATGGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGAT
CAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG
GACTTCTCTGAAGAGCGACGGGATTTCGCAAAACAGAAACTTCA
TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGA
CATCCAGAAGGACACAGGTTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTG
CACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA
AGAAGGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTTCGTTCGACGAACT
GGTCAAGGTTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTC
ATCGAAATGGCAAGAGAGAAAACACAGACAACACAGAAAGGGAC
AGAAGAACAGCAGAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAAGG
AATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCG
GTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGT
ACTACCTGTCAGAACGGAAAGAGACATGTACGTTCGACCAAGGA
ACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTTCGACCAAC
ATCGTCCCAGAGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGACA
ACAAGGTCTCTGACAAGAAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAG
CGACAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTTCGTCAAGAAGATGAAG
AACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACAC
AGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAGGCAGAGAGAGAGGAGG
ACTGAGCGAACTGGACAAGGCGAGGATTCATCAAGAGACAG
CTGGTTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTTCGACACAGA
TCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGA
CAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTTCATCACACTGAAGAGC
AAGCTGGTTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGTTTCTACA
AGGTTCAGAGAAATCAACAACCTACCACACGACACGACGC
ATACCTGAACGCGAGTCGTTCGGAAACAGCACTGATCAAGAAAG
TACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTACA
AGGTCTACGACGTTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACA
GGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGC
AACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAA
ACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAACGG
AGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGGAAGAGACTTC
GCAACAGTTCAGAAAGGTCTCTGAGCATGCCGCGAGGTCAACA
TCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAA
GGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATC

10

20

30

40

50

G C A A G A A A G A A G G A C T G G G A C C C G A A G A A G T A C G G A G G A T
T C G A C A G C C C G A C A G T C G C A T A C A G C G T C C T G G T C G T C G C
A A A G G T C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G C G T C
A A G G A A C T G C T G G G A A T C A C A A T C A T G G A A A G A A G C A G C T
T C G A A A A G A A C C C G A T C G A C T T C C T G G A A G C A A A G G G A T A
C A A G G A A G T C A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C G A A G
T A C A G C C T G T T C G A A C T G G A A A A C G G A A G A A A G A G A A T G C
T G G C A A G C G C A G G A G A A C T G C A G A A G G G A A A C G A A C T G G C
A C T G C C G A G C A A G T A C G T C A A C T T C C T G T A C C T G G C A A G C
C A C T A C G A A A A G C T G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C G A A C
A G A A G C A G C T G T T C G T C G A A C A G C A C A A G C A C T A C C T G G A
C G A A A T C A T C G A A C A G A T C A G C G A A T T C A G C A A G A G A G T C
A T C C T G G C A G A C G C A A A C C T G G A C A A G G T C C T G A G C G C A T
A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A T C A G A G A A C A G G C A G A
A A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C A C T G A C A A A C C T G G G A G C A
C C G G C A G C A T T C A A G T A C T T C G A C A C A A C A A T C G A C A G A A
A G A G A T A C A C A A G C A C A A A G G A A G T C C T G G A C G C A A C A C T
G A T C C A C C A G A G C A T C A C A G G A C T G T A C G A A A C A A G A A T C
G A C C T G A G C C A G C T G G G A G G A G A C G G A G G A G G A A G C C C G A
A G A A G A A G A G A A A G G T C A G C G A A A G C G C A A C A C C G G A A A G
C G T C A G C G G A T G G A G A C T G T T C A A G A A G A T C A G C T A G C T A
G C C A T C A C A T T T A A A A G C A T C T C A G C C T A C C A T G A G A A T A
A G A G A A A G A A A A T G A A G A T C A A T A G C T T A T T C A T C T C T T T
T T C T T T T T C G T T G G T G T A A A G C C A A C A C C C T G T C T A A A A A
A C A T A A A T T T C T T T A A T C A T T T T G C C T C T T T T C T C T G T G C
T T C A A T T A A T A A A A A A T G G A A A G A A C C T C G A G A A A A A A A A
A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A

3 8 3

H i B i T タグ、H B B 5' UTR および H i T A L B 3' UTR を有する C a s 9 を
コードする O R F を有する m R N A 転写産物

G G G A C A T T T T G C T T C T G A C A C A A C T G T G T T C A C T A G C
A A C C T C A A A C A G A C A C C G G A T C T C G C C A C C A T G G A C A A G A
A G T A C A G C A T C G G A C T G G A C A T C G G A A C A A A C A G C G T C G G
A T G G G C A G T C A T C A C A G A C G A A T A C A A G G T C C C G A G C A A G
A A G T T C A A G G T C C T G G G A A A C A C A G A C A G A C A C A G C A T C A
A G A A G A A C C T G A T C G G A G C A C T G C T G T T C G A C A G C G G A G A
A A C A G C A G A A G C A A C A A G A C T G A A G A G A A C A G C A A G A A G A
A G A T A C A C A A G A A G A A A G A A C A G A A T C T G C T A C C T G C A G G
A A A T C T T C A G C A A C G A A A T G G C A A A G G T C G A C G A C A G C T T
C T T C C A C A G A C T G G A A G A A A G C T T C C T G G T C G A A G A A G A C
A A G A A G C A C G A A A G A C A C C C G A T C T T C G G A A A C A T C G T C G
A C G A A G T C G C A T A C C A C G A A A A G T A C C C G A C A A T C T A C C A
C C T G A G A A A G A A G C T G G T C G A C A G C A C A G A C A A G G C A G A C
C T G A G A C T G A T C T A C C T G G C A C T G G C A C A C A T G A T C A A G T
T C A G A G G A C A C T T C C T G A T C G A A G G A G A C C T G A A C C C G G A
C A A C A G C G A C G T C G A C A A G C T G T T C A T C C A G C T G G T C C A G
A C A T A C A A C C A G C T G T T C G A A G A A A A C C C G A T C A A C G C A A
G C G G A G T C G A C G C A A A G G C A A T C C T G A G C G C A A G A C T G A G
C A A G A G C A G A A G A C T G G A A A A C C T G A T C G C A C A G C T G C C G

10

20

30

40

50

GGAGAAAAGAAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCAC
TGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGA
CCTGGCAGAAAGACGCAAAGCTGCGAGCTGAGCAAGGACACA
TACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGGAG
ACCAGTACGCGAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAAGAACCTGAG
CGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACA
GAAATCACAAAGGCAACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGA
GATACGACGAACACCAACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGC
ACTGGTTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATC
TTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCGAGGATACATCG
ACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTTCATCAA
GCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGAAGAACTGCTG
GTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAA
CATTCGACAACGGAAAGCATCCCGCACCCAGATCCACCTGGG
AGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGACTTCTAC
CCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCC
TGACATTTCAGAATCCCGTACTACGTCCGGACCGCTGGCAAAG
AGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAA
GAAACAATCACACCGTGGAACTTTCGAAGAAGTCTGTCGACA
AGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAA
CTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAG
CACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAACAGTCTACAACGAAC
TGACAAAGGTCAAGTACGTCAACAGAAGGAATGAGAAAGCC
GGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTTCGAC
CTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGC
TGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAG
CGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGC
CTGGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACA
AGGACTTCTCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGA
AGACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTTCGAAGACAGAGAA
ATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCAACACCTGTTTCG
ACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACAC
AGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGGAATC
AGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCTCTGA
AGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAAAACCTTCATGCAGCTGAT
CCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAG
GCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACA
TCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGGAAT
CCTGCAGACAGTCAAGGTCGTTCGACGAACTGGTCAAGGTC
ATGGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGG
CAAGAGAAAACCAAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAG
CAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAA
CTGGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTTCGAAAACA
CACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA
GAACGGAAAGAGACATGTACGTCCGACCAGGAACCTGGACATC
AACAGACTGAGCGACTACGACGTCCGACCACATCGTCCCGC
AGAGCTTCTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCT
GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTC
CCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAAGTACTGGA
GACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTT

10

20

30

40

50

40

50

TCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGA
ATACAAGGTCCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAAC
ACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCAC
TGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACT
GAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAAC
AGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTTCAGCAACGAAATGG
CAAAGGTTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAG
CTTCCTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCG
ATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCAACGAAA
AGTACCCGACAAATCTACCACTGAGAAAGAAGCTGGTTCGA
CAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCA
CTGGCACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTCTGATCG
AAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCT
GTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAA
GAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGGCAA
TCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAA
CCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAAGAAGAACGGACTG
TTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGA
ACTTCAAGAGCAACTTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAAGCT
GCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAAC
CTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCC
TGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGA
CATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTG
AGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCAACAGG
ACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCC
GGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC
GGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAG
AATTCTACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGA
CGGAACAGAAGAAGACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGAC
CTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAAGCATCC
CGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAG
AAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTCTGAAGGACAACAGA
GAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACT
ACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATG
GATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAAC
TTCGAAGAAGTCTGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCT
TCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAA
CGAAAAGGTCTTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATAC
TTCACAGTCTACAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTCA
CAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGAGCGGAGAAAC
GAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAACAGAA
AAGGTCAACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGA
AGATCGAATGCTTTCGACAGCGTTCGAAATCAGCGGAGTCTGA
AGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCAACGACCTG
CTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACAACGAAG
AAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGAC
ACTGTTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAG
ACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTTCATGAAGCAGC
TGAAGAGAAAGAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAG
AAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAG

10

20

30

40

50

ACAATCCTGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACA
GAAACTTTCATGCGAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATT
CAAGGAAGACATCCAGAAGGACACAGGTCAGCGGACAGGGA
GACAGCCTGCGACGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCC
CGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCGACAGTCAAGGTCTGT
CGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAA
AACATCGTTCATCGAAATGGCAAGAGAAACCAGACAACAC
AGAAGGGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAAT
CGAAGAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAG
GAACACCCGGTCAAAAACACACAGCTGCGAAGCAGAAAAGC
TGTACCTGTACTACCTGCGAGAACGGAAAGAGACATGTACGT
CGACCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGAC
GTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTCTGAAGGACGACA
GCATCGACAACAAGGTCTCTGACAAGAAGCGACAAGAACAG
AGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCTGTCAAG
AAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGC
TGATCACACAGAGAAAGTTCTGACAACCTGACAAGGCGAGA
GAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCGAGGATTCATC
AAGAGACAGCTGGTCAAAAACAGACAGATCACAAAGCACG
TCGCGACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGA
CGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTTCATCACA
CTGAAGAGCAAGCTGGTCAAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCC
AGTTCTACAAGGTCAAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGC
ACACGACGCGATACCTGAACGCGAGTCTGTCTGGAAACAGCACTG
ATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTACG
GAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAA
GAGCGAACAGGAAATCGGAAGGCAACAGCAAAGTACTTCT
TTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCA
CACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGA
AACAAACGGAGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGA
AGAGACTTTCGCAACAGTCAAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGC
AGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGG
ATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGAC
AAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAGT
ACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCTGCATACAGCGTCTCT
GGTCTGTCTGCAAAAGGTCTGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAAGCTG
AAGAGCGTCAAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAA
GAAGCAGCTTTCGAAAAGAAACCCGATCGACTTCTCTGGAAGC
AAAGGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAG
CTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAA
AGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCGAAGGGGAAA
CGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTCTGTAC
CTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGGAAGCCCGGAAG
ACAACGAACAGAAAGCAGCTGTTCGTCTGAACAGCACAAAGCA
CTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTTCAGC
AAGAGAGTCACTCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAGGTCC
TGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGA
ACAGGCGAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAC
CTGGGAGCACCCGGCAGCATTCAGTACTTCGACACAACAA
TCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTCTGGA

10

20

30

40

50

CGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAA
ACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAG
GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCAGCGAAAGCGCAAC
ACCGGAAAGCGTCAGCGGATGGAGACTGTTCAAGAAGATC
AGCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACC
ATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATT
CATCTCTTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCT
GTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTT
TCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAAATGGAAAGAACCTCGA
GAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
385

10

NLS1を有するCas9のアミノ酸配列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRL EESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKN
LFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDLD
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTL LKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF IKPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
REKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYE
YFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGT YHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTI LDFLKS DGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPA IKKGILQTVKVVD ELVKVMGRHKP
ENIVIEMARENQT TQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY
DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVV
KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKY
FFYSNIMNFFKTEIT LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWD PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKK
LKS VKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII
KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEF
SKRVILADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLT
NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLY
ETRIDLSQLGGDGGGSLAAKRSRTT

20

30

40

386

NLS2を有するCas9のアミノ酸配列

50

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRL EESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKNG
LFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLD
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQQLPEKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF I KPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVL PKHSLLYE
YFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDR FNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPA I KKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKP
ENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY
DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVV
KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREV KVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKY
FFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWD PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKK
LKS VKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII
KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEK LKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEITIEQISEF
SKRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLT
NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLY
ETRIDLSQLGGDGGGSQA AKRSRTT

387

NLS3を有するCas9のアミノ酸配列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRL EESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKNG
LFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLD
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQQLPEKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF I KPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVL PKHSLLYE

YFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFRNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKP
ENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY
DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTTRSDKNRGKSDNVPSEEVV
KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDAKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMKIAKSEQEIGKATAKY
FFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKK
LKS VKEL LGITIMERSSSF EKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII
KLPKYSLFEL ENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIIEQISEF
SKRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLT
NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLY
ETRIDLSQLGGDGGGSPAPAKRERTT

388

NLS4を有するCas9のアミノ酸配列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFS NEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAIL SARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKNG
LFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLD
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLP EKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF I KPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYE
YFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFRNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKP
ENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY
DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTTRSDKNRGKSDNVPSEEVV
KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDAKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMKIAKSEQEIGKATAKY

10

20

30

40

50

FFYSNIMNFFKTEITLANG EIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWD PPKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKK
LKS VKEL LGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII
KLPKYS LFEL ENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFL
YLASHYEK LKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEF
SKRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLT
NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLY
ETRIDLSQLGGDGGGSQA AKRPRTT

389

NLS5を有するCas9のアミノ酸配列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFV LG
NTDRHSI KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFS NEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSD VDKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNG
LFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKD TYDDDL
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF IKPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYE
YFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPA IKKGILQTVKVVD ELVKVMGRHKP
ENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY
DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVV
KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKY
FFYSNIMNFFKTEITLANG EIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWD PPKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKK
LKS VKEL LGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII
KLPKYS LFEL ENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFL
YLASHYEK LKGSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEF
SKRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLT
NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLY
ETRIDLSQLGGDGGGSRA AKRPRTT

390

NLS6を有するCas9のアミノ酸配列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFV LG
NTDRHSI KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK

NRICYLQEIFSNEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKNG
LFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLD
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDA ILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF IKPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYE
YFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDR FNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTI LDFLKS DGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPA IKKGILQTVKVVD ELVKVMGRHKP
ENIV IEMARENQT TQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY
DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVV
KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKY
FFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKK
LKS VKEL LGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII
KLPKYSLF ELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFL
YLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEF
SKRVILADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLT
NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLY
ETRIDLSQLGGDGGGSAAAKRSWSMAA

391

NLS7を有するCas9のアミノ酸配列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFVVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL ENLIAQLPGEKKNG
LFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLD
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDA ILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF IKPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYE
YFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDR FNASLGTYHD

LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTI LDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKP
ENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY
DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVV
KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKY
FFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWD PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVKGKSKK
LKS VKEL LGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII
KLPKYSLFEL ENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEK LKGS PEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEF
SKRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLT
NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLY
ETRIDLSQLGGDGGGSAAAKRVWSMAF

10

20

392

NLS8を有するCas9のアミノ酸配列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATR LKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFS NEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDV DKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNG
LFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLD
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLP EKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF I KPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYE
YFTVYNELT KVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTI LDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKP
ENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY
DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVV
KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKY
FFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNS

30

40

50

DKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVEKGKSKK
LKS VKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLII
KLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEF
SKRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLT
NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLY
ETRIDLSQLGGDGGGSAAAKRSWSMAF

393

NLS9を有するCas9のアミノ酸配列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFS NEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAIL SARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNG
LFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDDL
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLP EKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKF IKPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKDN
REKIEKILTFRIPYVVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVL PKHSLLYE
YFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTI LDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPA IKKGILQTVKVVD ELVKVMGRHKP
ENIVIE MARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY
DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVV
KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKY
FFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVEKGKSKK
LKS VKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLII
KLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEF
SKRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLT
NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLY
ETRIDLSQLGGDGGGSAAAKRKYFAA

394

NLS10を有するCas9のアミノ酸配列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFS NEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL

ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKN
LFGNLIASLSGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDL
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQQLPEKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKFIFKPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDN
REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYE
YFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFRNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDDELVKVMGRHKP
ENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY
DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTNRSDKNRGKSDNVPSEEVV
KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIASEQEIGKATAKY
FFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWD PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKK
LKS VKELLGITIMERSSSF EKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII
KLPKYSLFEL ENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQHKKHYLDEIIIEQISEF
SKRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLT
NLGAPAAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLY
ETRIDLSQLGGDGGGSRAAKRKAFAA

10

20

30

395

NLS11を有するCas9のアミノ酸配列

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLG
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFS NEMAKVDDSF FHRLEESFLVEEDKKHERH
PIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYL
ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLF
EENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKN
LFGNLIASLSGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDL
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP
LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQQLPEKYKEIFFDQSK
NGYAGYIDGGASQEEFYKFIFKPILEKMDGTEELLVKLNRE
DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDN
REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYE
YFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFRNASLGTYHD
LLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG

40

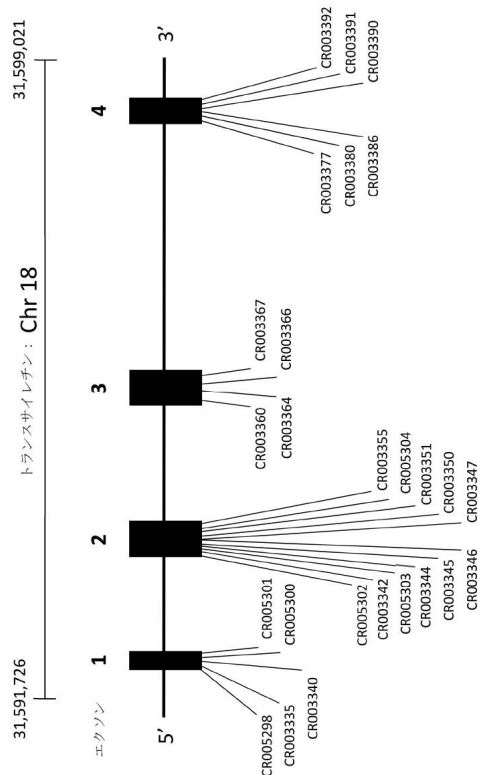
50

KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPAIAKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKP
ENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY
DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTTRSDKNRGKSDNVPSEEVV
KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA
LIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIASEQEIGKATAKY
FFYSNIMNFFKTEITLANG EIRKRPLIETNGETGEIVWDK
GRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNS
DKLIARKKDWD PKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGKSKK
LKSVKEL LGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII
KLPKYSLFEL ENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEKLKGS PEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEF
SKRVILADANLDKVL SAYNKH RD KPIREQAENIIHLFTLT
NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLY
ETRIDLSQLGGDGGGSRAAKRKYFAV
396

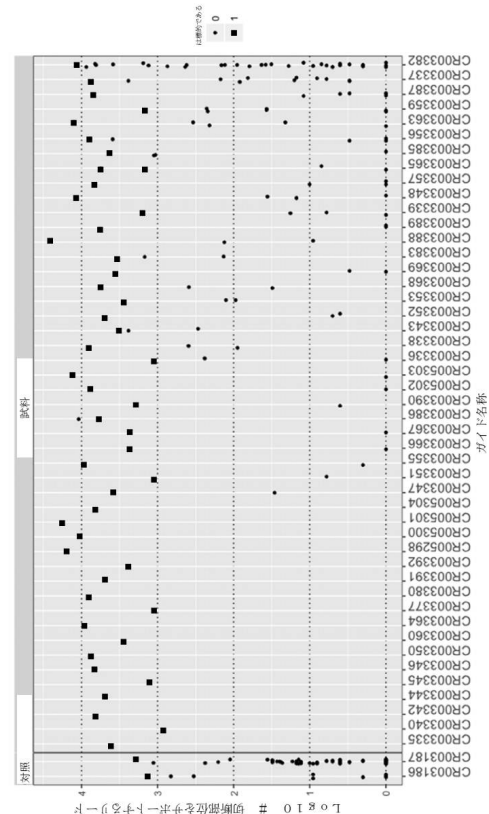
* = P S 連結、「m」 = 2' - O - Me ヌクレオチド

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

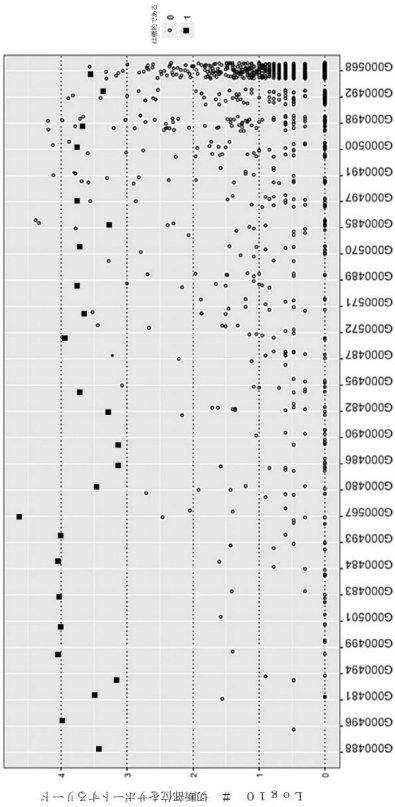
20

30

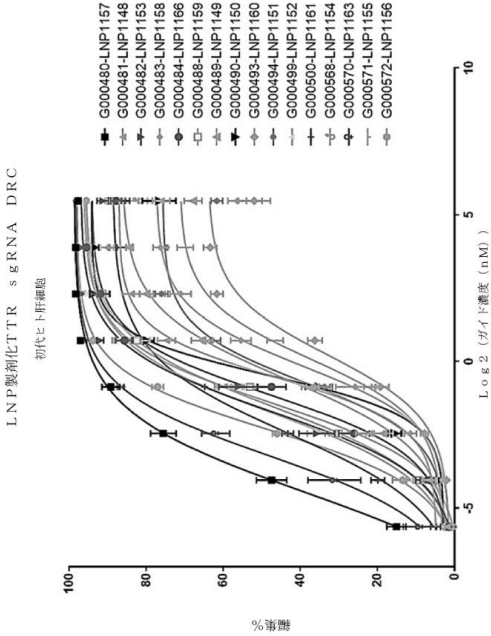
40

50

【図 3】



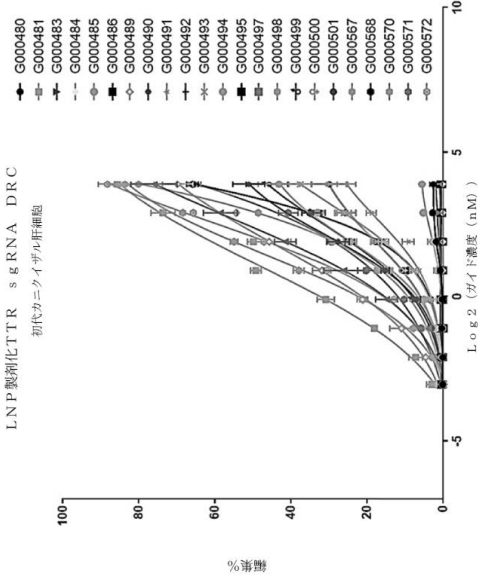
【図 4】



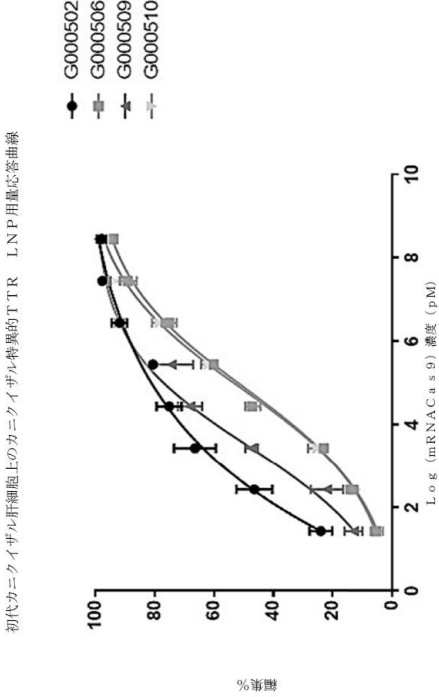
10

20

【図 5】



【図 6】

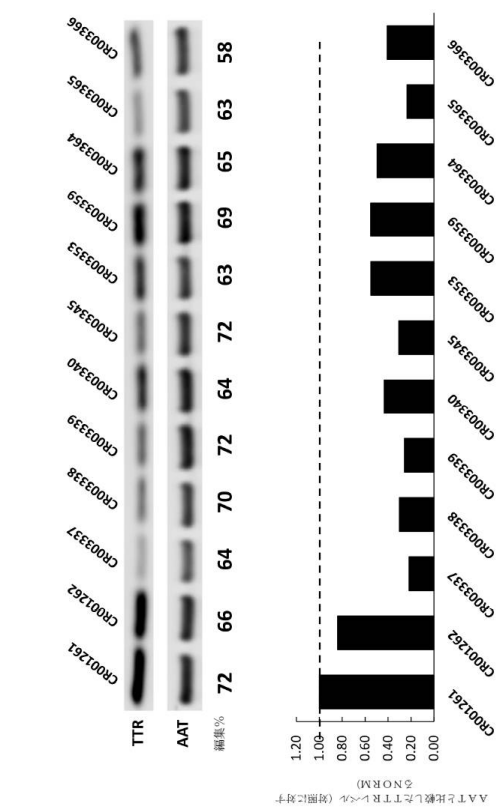


30

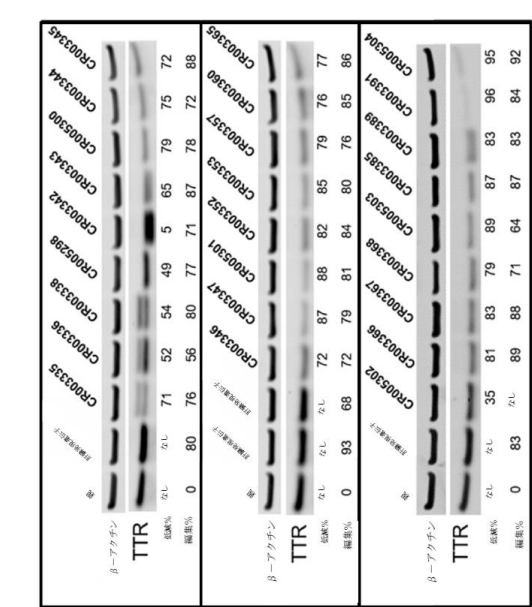
40

50

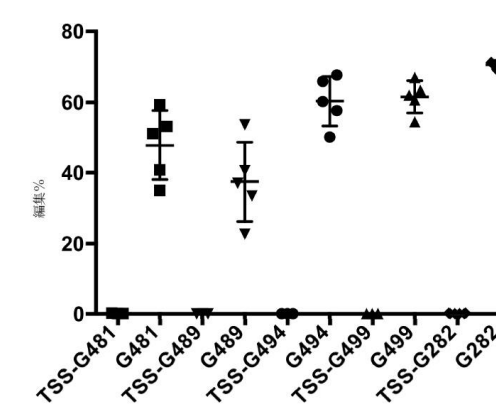
【図 7】



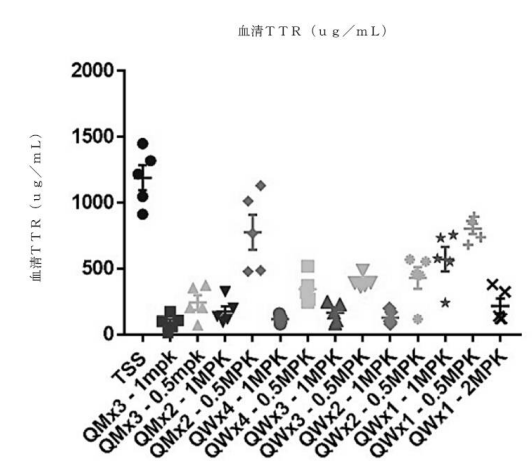
【図 8】



【図 9】



【図 10 A】



10

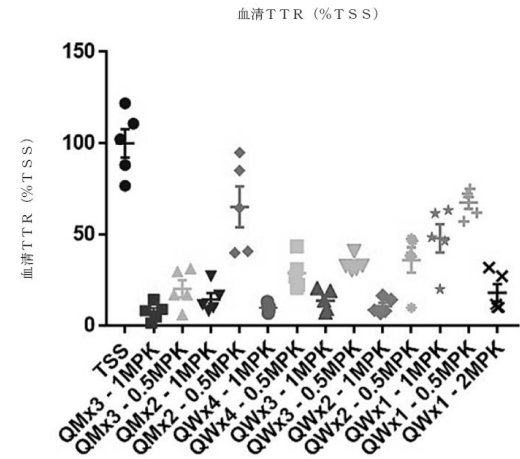
20

30

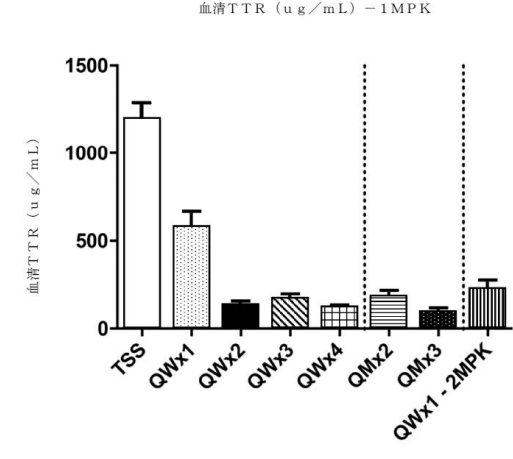
40

50

【図 1 0 B】

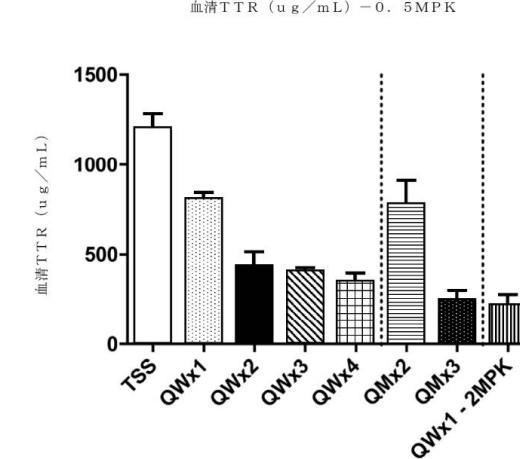


【図 1 1 A】

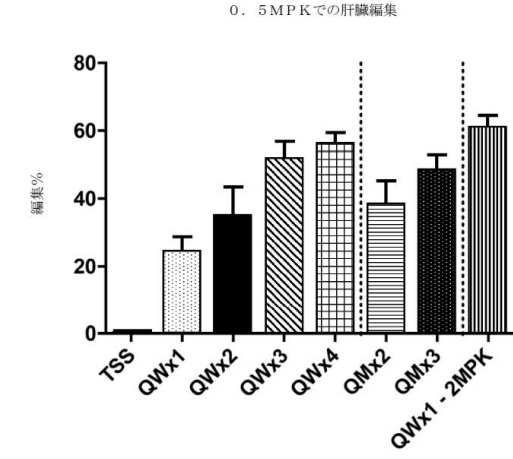


10

【図 1 1 B】



【図 1 2 A】



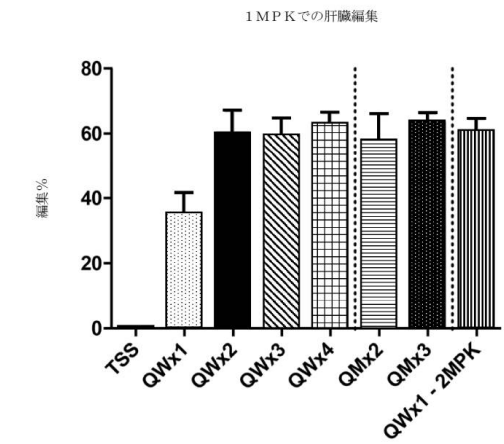
20

30

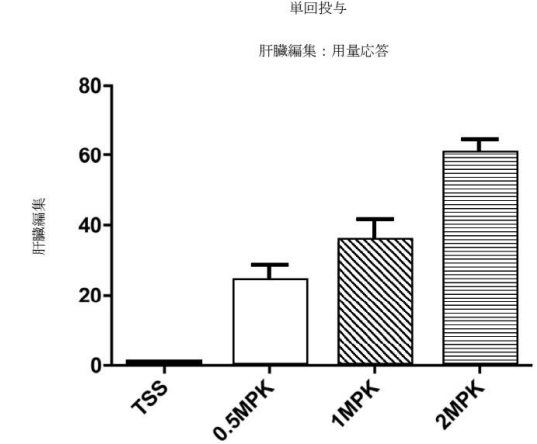
40

50

【図 1 2 B】

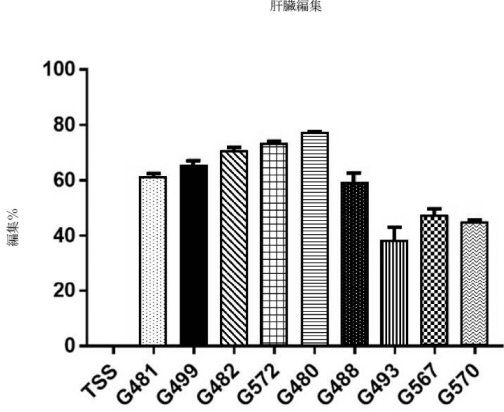


【図 1 2 C】



10

【図 1 3】



【図 1 4 A - 1 4 B】

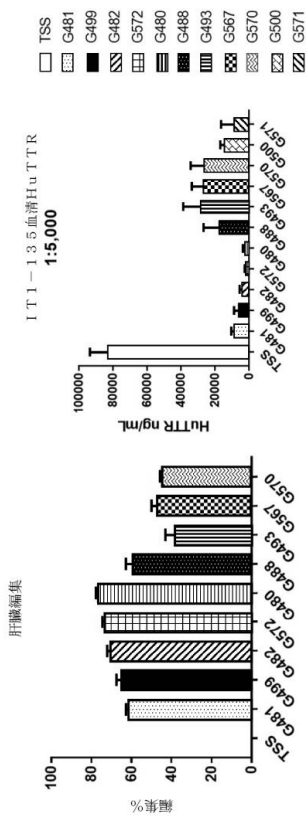


図 1 4 B

図 1 4 A

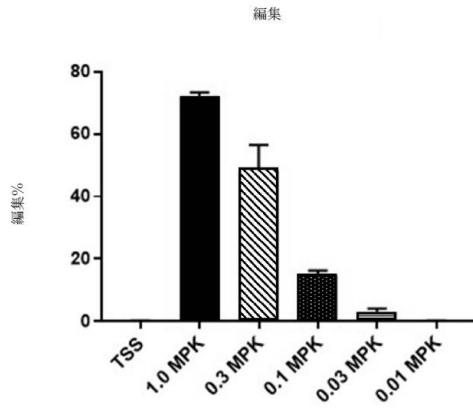
20

30

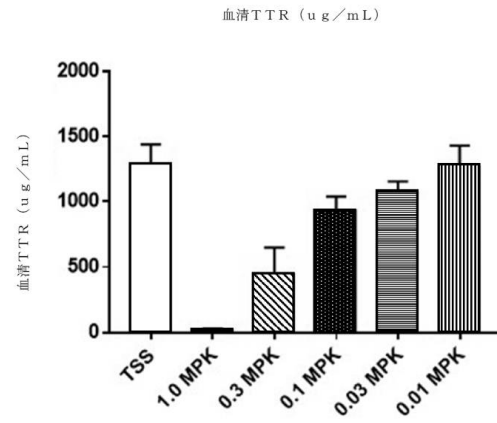
40

50

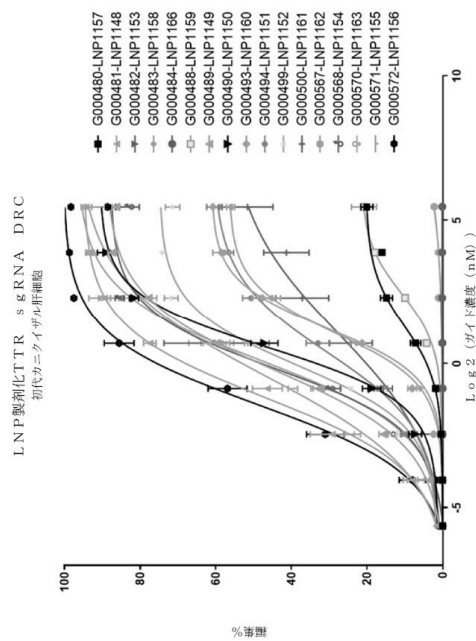
【図 15 A】



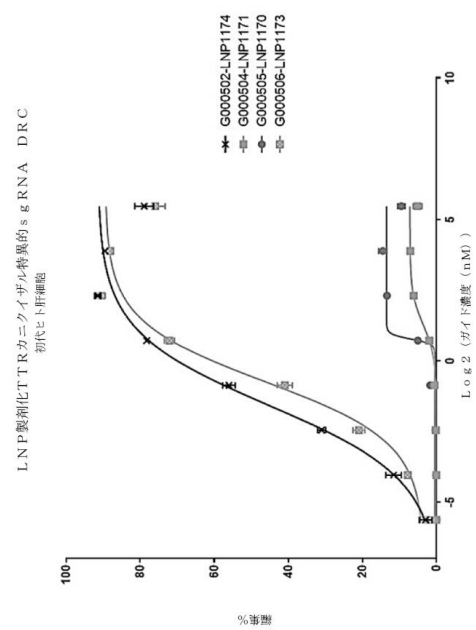
【図 15 B】



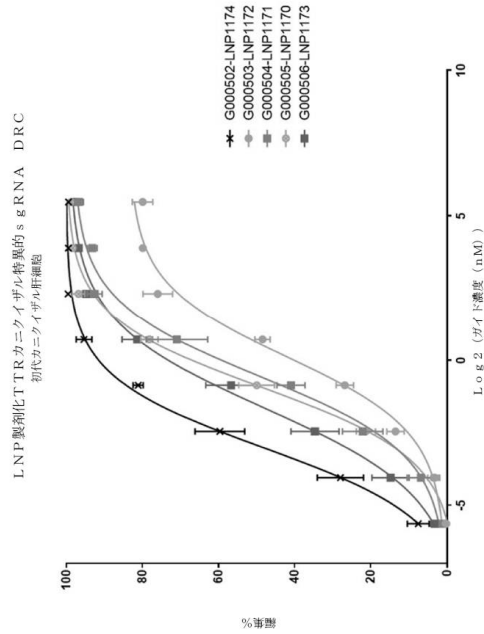
【図 16】



【図 17】



【図 18】



【図 19 A - 19 B】

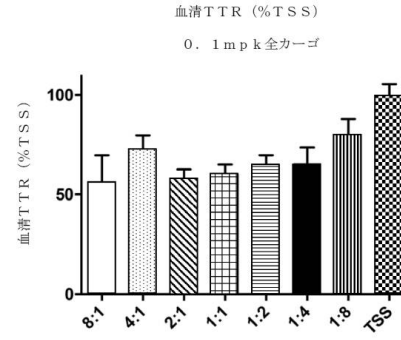


図 19 A

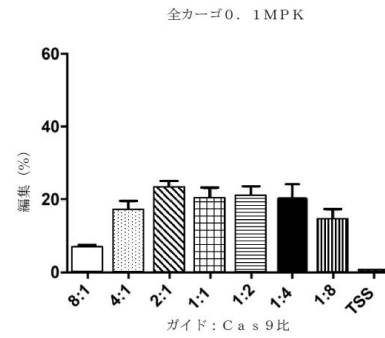


図 19 B

【図 19 C - 19 D】

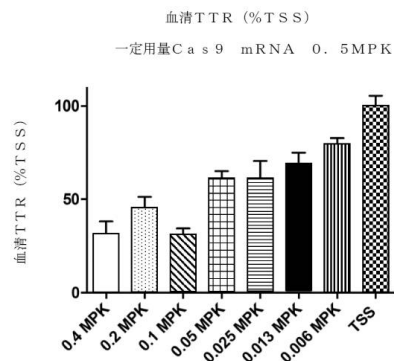


図 19 C

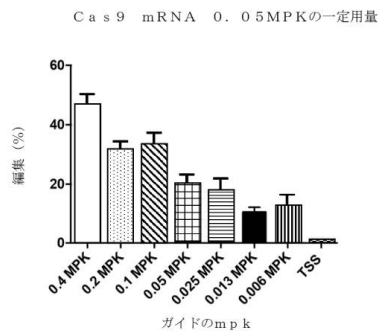
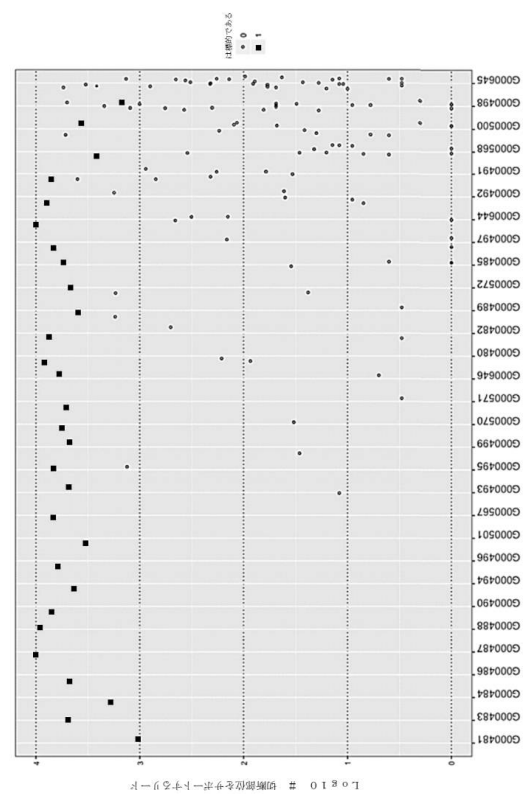


図 19 D

【図 20】



10

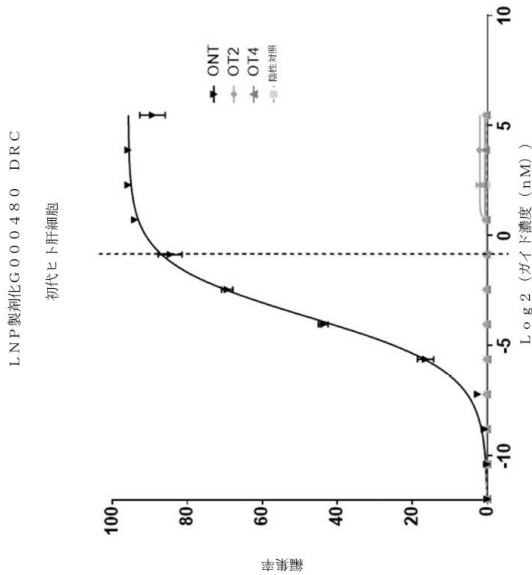
20

30

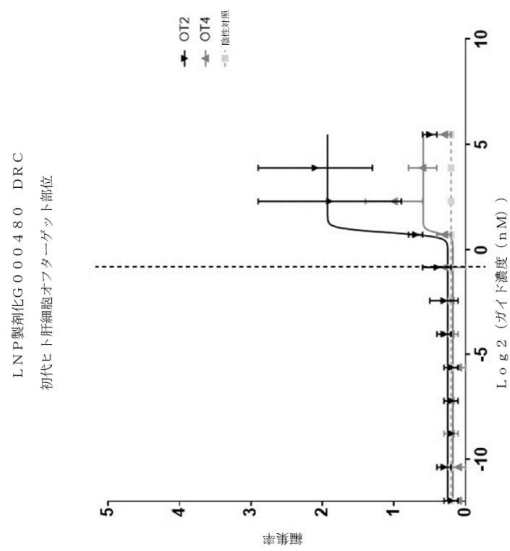
40

50

【図 2 1 A】

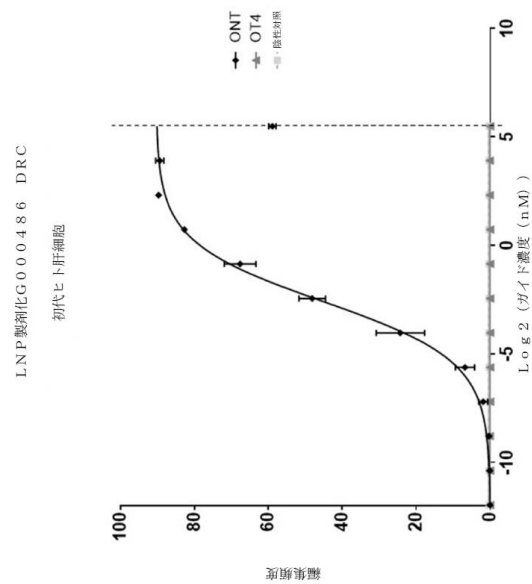


【図 2 1 B】

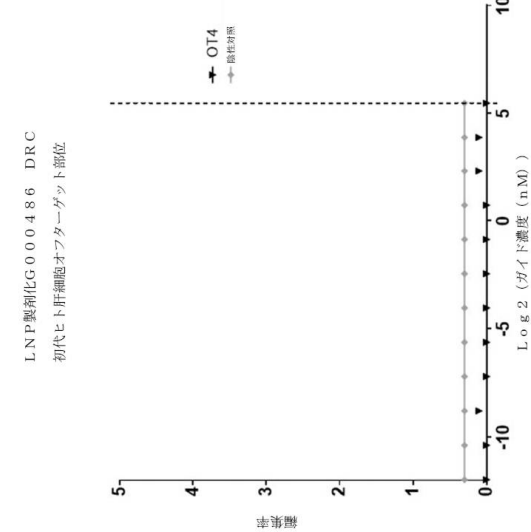


10

【図 2 2 A】



【図 2 2 B】



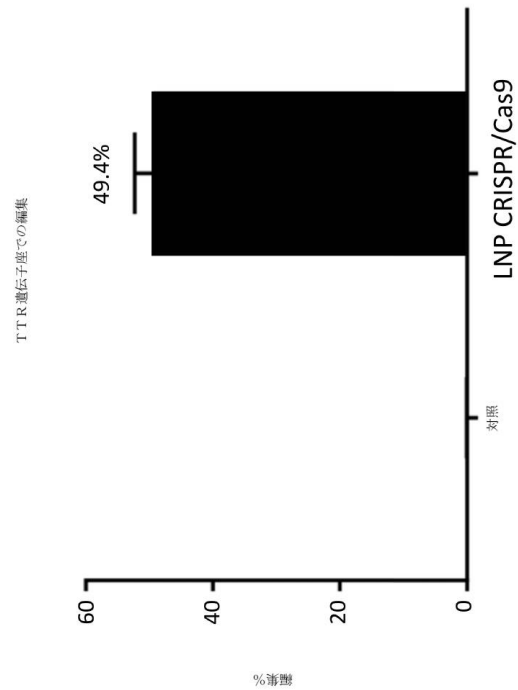
20

30

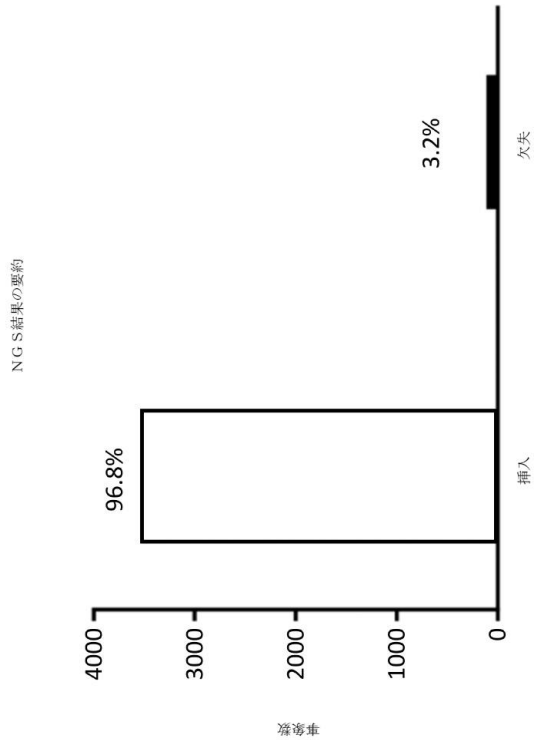
40

50

【図 2 3 A】



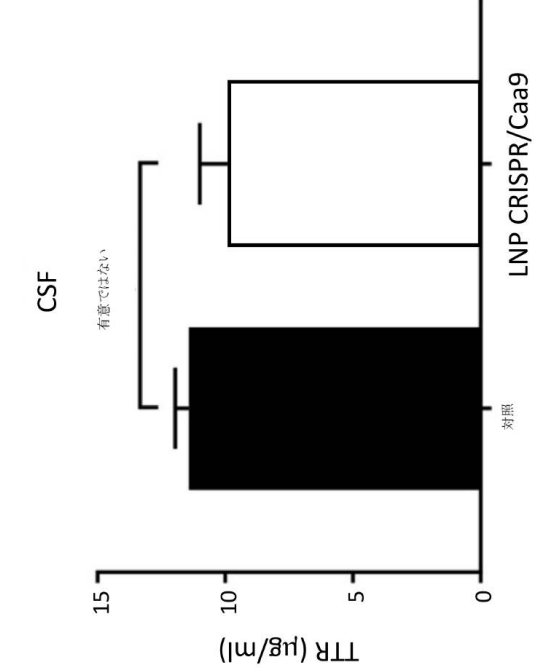
【図 2 3 B】



【図 2 4 A】



【図 2 4 B】



10

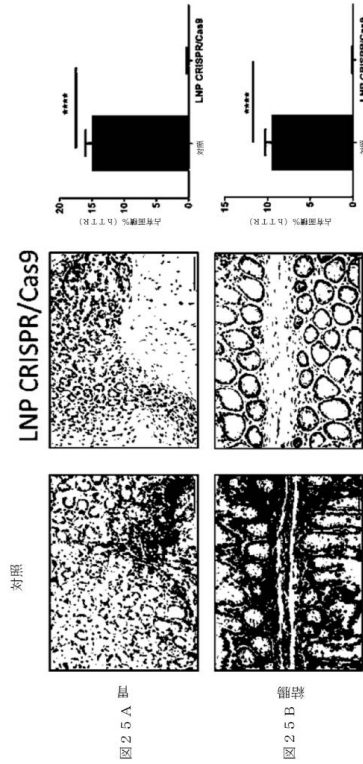
20

30

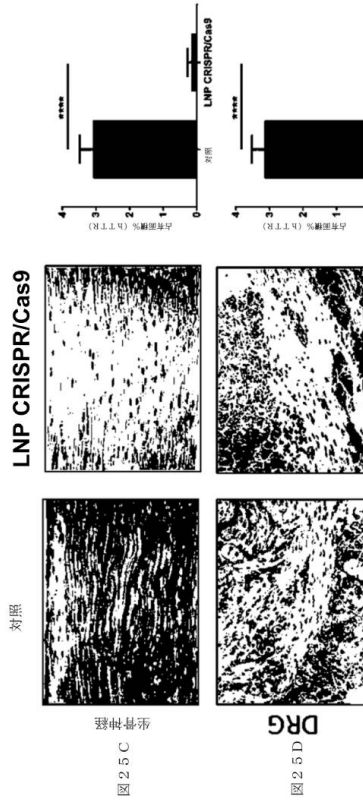
40

50

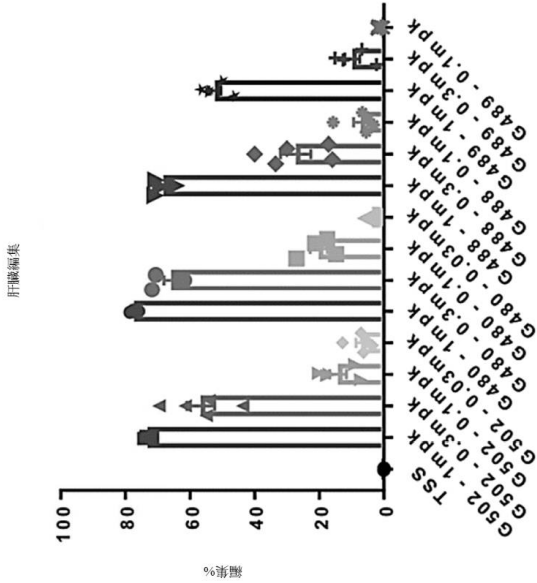
【図 2 5 A - 2 5 B】



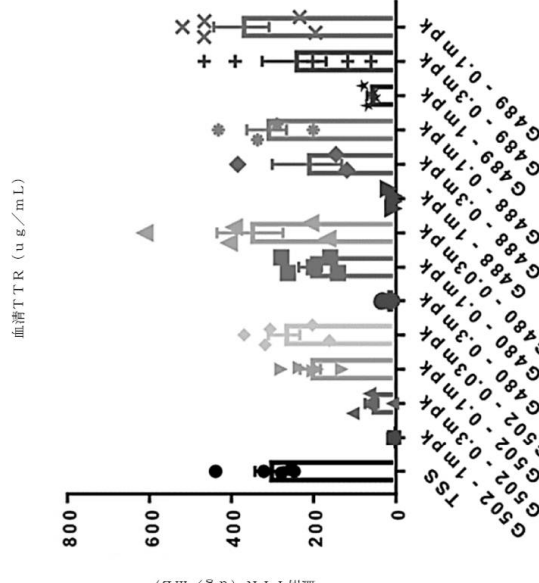
【図 2 5 C - 2 5 D】



【図 2 6 A】



【図 2 6 B】



10

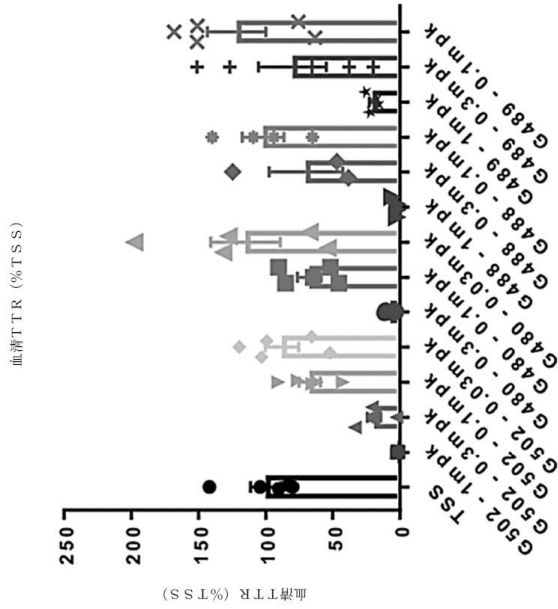
20

30

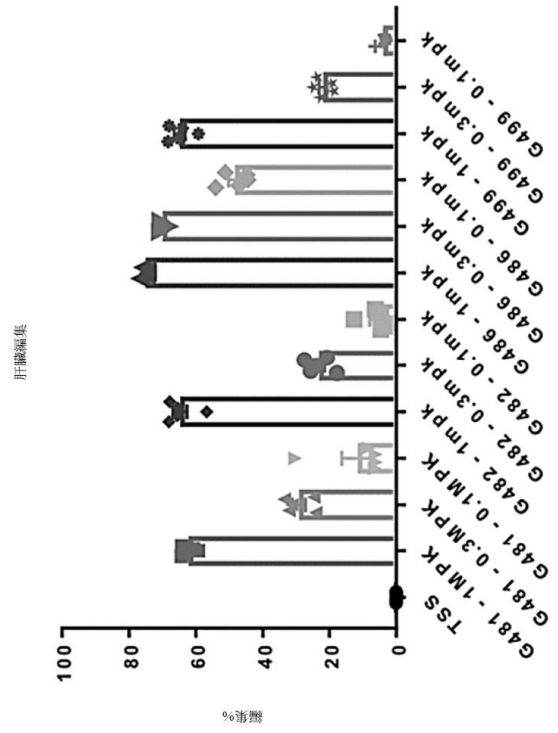
40

50

【図 2 6 C】



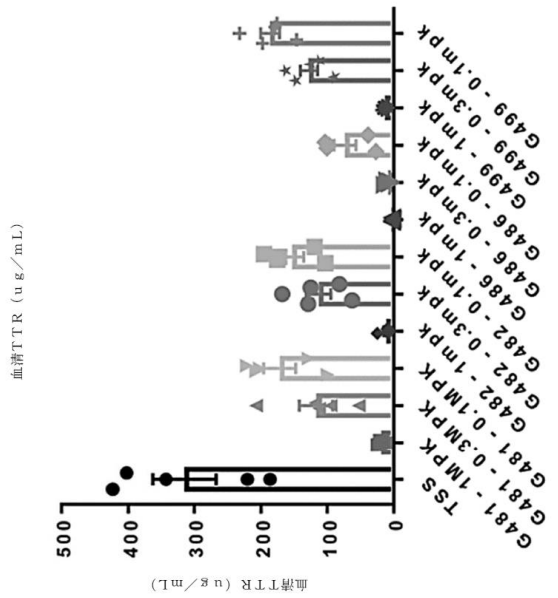
【図 2 7 A】



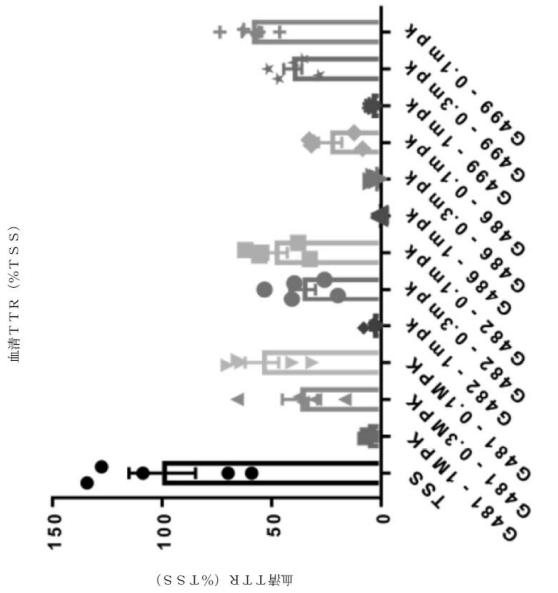
10

20

【図 2 7 B】



【図 2 7 C】

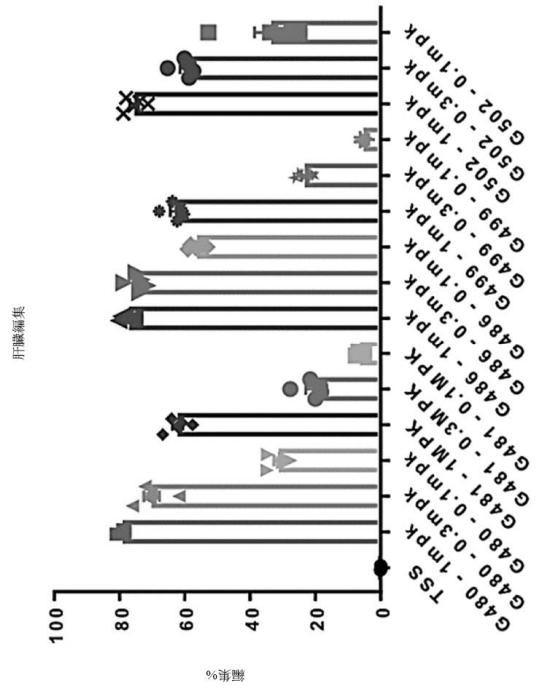


30

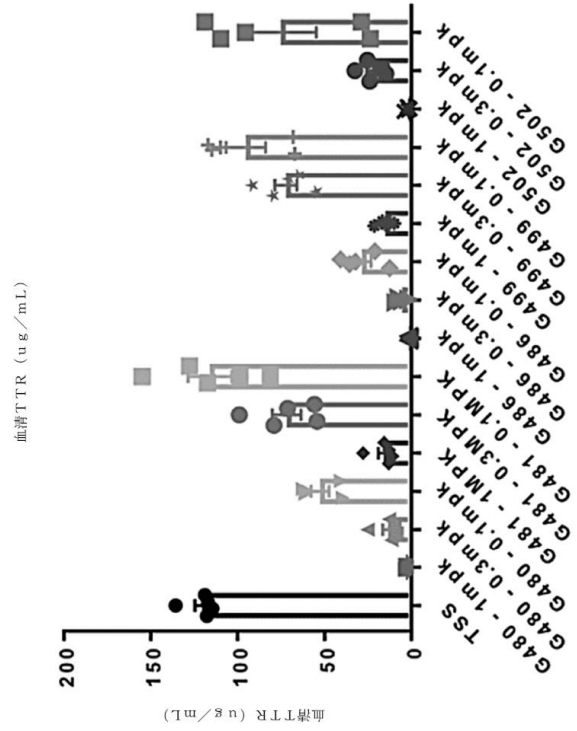
40

50

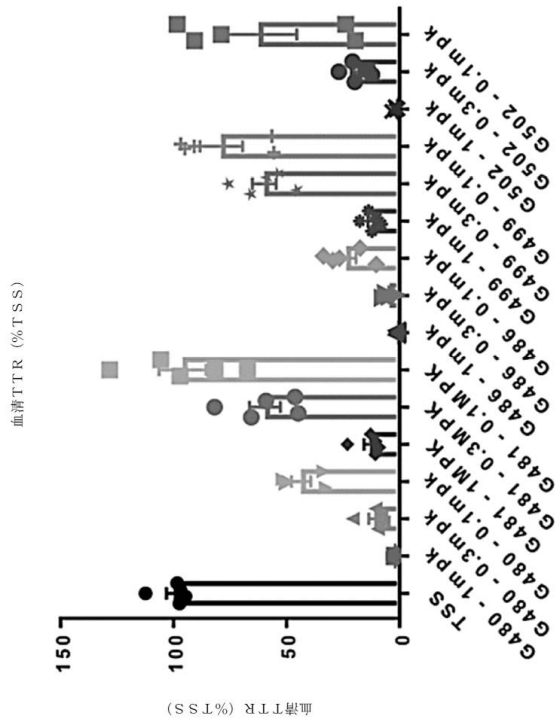
【図 28 A】



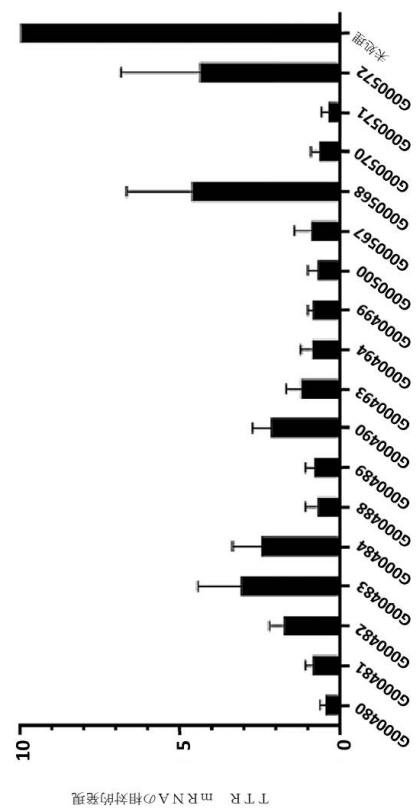
【図 28 B】



【図 28 C】



【図 29】



10

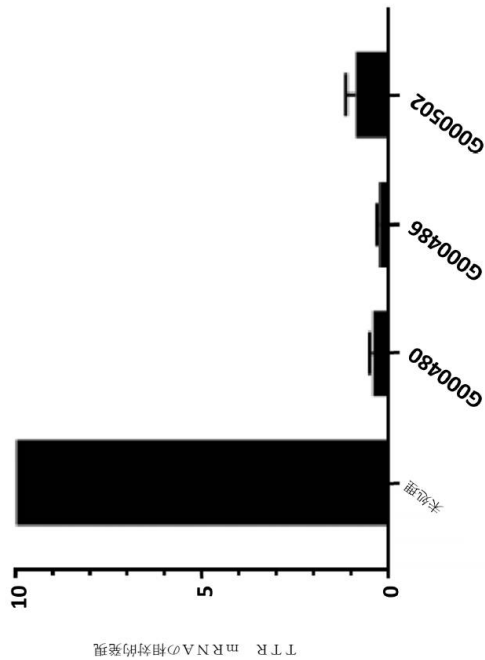
20

30

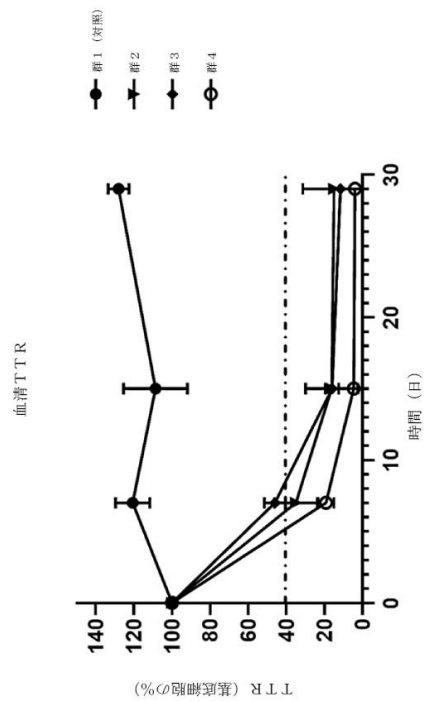
40

50

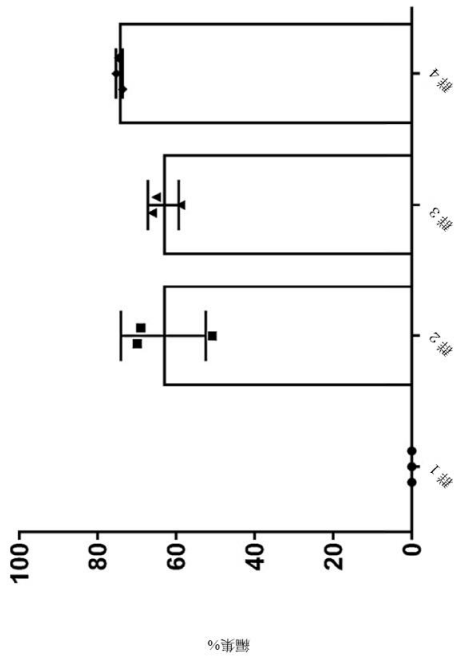
【図 3 0】



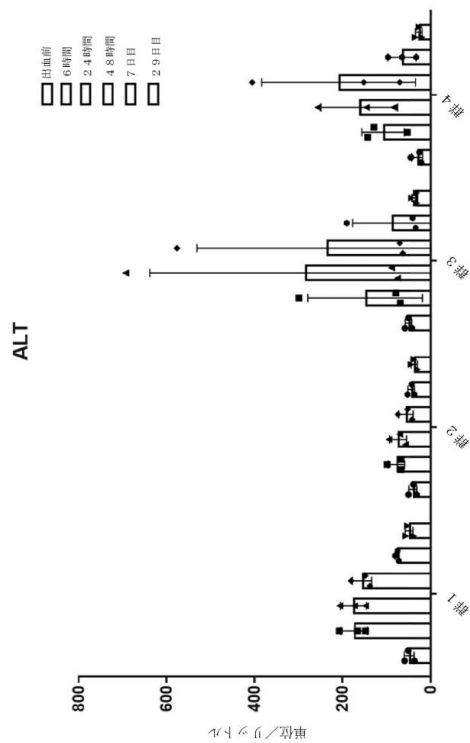
【図 3 1 A】



【図 3 1 B】



【図 3 1 C】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007636338000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/573 (2006.01)	A 6 1 K	31/573	
A 6 1 K	31/167 (2006.01)	A 6 1 K	31/167	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/135 (2006.01)	A 6 1 K	31/135	
A 6 1 K	31/341 (2006.01)	A 6 1 K	31/341	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	1/08 (2006.01)	A 6 1 P	1/08	
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 K	9/127 (2025.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	9/127	
A 6 1 K	47/14 (2017.01)	A 6 1 K	9/14	
A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/18	
A 6 1 K	47/28 (2006.01)	A 6 1 K	47/14	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	A 6 1 K	47/24	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	A 6 1 K	47/28	
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0
		C 1 2 N	15/63	Z Z N A
		C 1 2 N	15/88	Z

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0
- (72)発明者 アレクサンダー, セス シー.
- アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0
- (72)発明者 ウッド, クリスティ エム.
- アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0
- (72)発明者 カンジョリア, アルティ マヘンドラ プラカーシュ
- アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0
- (72)発明者 オダテ, ショブ
- アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0
- (72)発明者 サイツァー, ジェシカ リン
- アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0
- (72)発明者 レスカルボー, レイナード マイケル
- アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0
- (72)発明者 ストラップス, ワルター
- アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

審査官 三上 晶子

- (56)参考文献 国際公開第2018/007871 (WO, A1)
- 国際公開第2014/093655 (WO, A1)
- Nucl. Acids Res., 2000年, vol.28, no.1, p.292

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 K 4 5 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 9

C 1 2 N 1 5 / 6 3

C 1 2 N 1 5 / 8 8