(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-537516
(P2020-537516A)
(43)公表日　令和2年12月24日(2020.12.24)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/09	110	4B050
C12N 9/80	(2006.01)	C12N	9/80	ZNAZ	4B065
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	Z	4C084
A61K 35/12	(2015.01)	A61K	35/12		4C087
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	105	4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 551 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-519386 (P2020-519386)
(86)(22)出願日　平成30年10月4日 (2018.10.4)
(85)翻訳文提出日　令和2年6月2日 (2020.6.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/054469
(87)国際公開番号　WO2019/071048
(87)国際公開日　平成31年4月11日 (2019.4.11)
(31)優先権主張番号　62/568,313
(32)優先日　平成29年10月4日 (2017.10.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　515236259
ザ・ブロード・インスティテュート・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国・マサチューセッツ・０２１４２・ケンブリッジ・メイン・ストリート・４１５
(71)出願人　596060697
マサチューセッツ　インスティテュート　オブ　テクノロジー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９ケンブリッジ，マサチューセッツ・アヴェニュー・７７

最終頁に続く

(54)【発明の名称】標的化された核酸編集のためのシステム、方法、及び組成物

(57)【要約】
本発明は、核酸を標的化及び編集するためのシステム、方法、及び組成物を提供する。特に、本発明は、ＲＮＡ標的化Ｃａｓ１３タンパク質、少なくとも１つのガイド分子、及び少なくとも１つのアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを含む、非天然型のまたは操作されたＲＮＡ標的化システムを提供する。
【選択図】図１

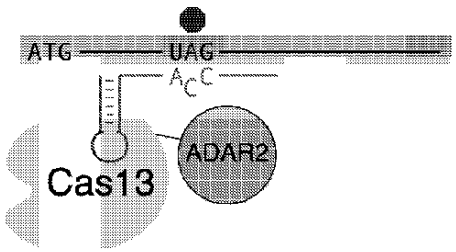


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
部位特異的塩基編集のための操作された組成物であって、
ａ．標的化ドメインと、
ｂ．アデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインと、を含み、前記アデノシンデアミナーゼが、活性をシチジンデアミナーゼに変換するように修飾される、組成物。
【請求項２】
前記アデノシンデアミナーゼが、Ｅ３９６、Ｃ４５１、Ｖ３５１、Ｒ４５５、Ｔ３７５、Ｋ３７６、Ｓ４８６、Ｑ４８８、Ｒ５１０、Ｋ５９４、Ｒ３４８、Ｇ５９３、Ｓ３９７、Ｈ４４３、Ｌ４４４、Ｙ４４５、Ｆ４４２、Ｅ４３８、Ｔ４４８、Ａ３５３、Ｖ３５５、Ｔ３３９、Ｐ５３９、Ｖ５２５、及びＩ５２０から選択される１つ以上の位置で１つ以上の変異によって修飾される、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
前記アデノシンデアミナーゼが、Ｅ４８８、Ｖ３５１、Ｓ４８６、Ｔ３７５、Ｓ３７０、Ｐ４６２、及びＮ５９７から選択される１つ以上の位置で変異される、請求項１に記載の組成物。
【請求項４】
前記アデノシンデアミナーゼが、Ｅ４８８Ｑ、Ｖ３５１Ｇ、Ｓ４８６Ａ、Ｔ３７５Ｓ、Ｓ３７０Ｃ、Ｐ４６２Ａ、及びＮ５９７Ｉから選択される１つ以上の変異を含む、請求項１に記載の組成物。
【請求項５】
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、ヒト、頭足類、またはＤｒｏｓｏｐｈｉｌａアデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインである、請求項１に記載の組成物。
【請求項６】
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のグルタミン酸^{４８８}、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置における変異を含むように修飾されている、請求項１に記載の組成物。
【請求項７】
位置４８８または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置の前記グルタミン酸残基が、グルタミン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｑ）、請求項６に記載の組成物。
【請求項８】
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、変異Ｅ４８８Ｑを含む変異されたｈＡＤＡＲ２ｄまたは変異Ｅ１００８Ｑを含む変異されたｈＡＤＡＲ１ｄである、請求項６に記載の組成物。
【請求項９】
前記標的化ドメインが、触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質、または前記触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質をコードするヌクレオチド配列である、請求項１～４のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１０】
前記触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質が、触媒的に不活性なＣａｓ１３ａ、触媒的に不活性なＣａｓ１３ｂ、または触媒的に不活性なＣａｓ１３ｃである、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
前記触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質が、表１、２、３、または４のいずれかに列挙される細菌種からなる群から選択される細菌種に由来するＣａｓ１３ヌクレアーゼから得られる、請求項９に記載の組成物。
【請求項１２】
直接反復配列に連結されるガイド配列を含むガイド分子、または前記ガイド分子をコー

ドするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１３】
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記標的化ドメインに共有結合または非共有結合で連結される、請求項１～４のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１４】
目的の標的座位におけるアデニンを修飾するのに適した、操作された非天然型のシステムであって、
（ａ）直接反復配列に連結されるガイド配列を含むガイド分子、または前記ガイド分子をコードするヌクレオチド配列と、
（ｂ）触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質、または前記触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質をコードするヌクレオチド配列と、
（ｃ）アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメイン、または前記アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列と、を含み、前記アデノシンデアミナーゼが、活性をシチジンデアミナーゼに変換するように修飾され、
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記Ｃａｓ１３タンパク質もしくは前記ガイド分子に共有結合または非共有結合で連結されるか、または送達後にそれらに連結するように適合されており、
前記ガイド配列が、アデニンを含む標的ＲＮＡ配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二本鎖を形成することができ、前記ガイド配列が、前記アデニンに対応する位置で非対合シトシンを含み、形成された前記ＲＮＡ二本鎖においてＡ－Ｃミスマッチをもたらす、システム。
【請求項１５】
前記アデノシンデアミナーゼが、Ｅ３９６、Ｃ４５１、Ｖ３５１、Ｒ４５５、Ｔ３７５、Ｋ３７６、Ｓ４８６、Ｑ４８８、Ｒ５１０、Ｋ５９４、Ｒ３４８、Ｇ５９３、Ｓ３９７、Ｈ４４３、Ｌ４４４、Ｙ４４５、Ｆ４４２、Ｅ４３８、Ｔ４４８、Ａ３５３、Ｖ３５５、Ｔ３３９、Ｐ５３９、Ｖ５２５、及びＩ５２０から選択される１つ以上の変異によって修飾される、請求項１４に記載のシステム。
【請求項１６】
前記アデノシンデアミナーゼが、Ｅ４８８、Ｖ３５１、Ｓ４８６、Ｔ３７５、Ｓ３７０、Ｐ４６２、及びＮ５９７から選択される１つ以上の位置で変異される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
目的の標的ＲＮＡ配列におけるアデニンを修飾する方法であって、前記標的ＲＮＡに、
（ａ）触媒的に不活性な（死んだ）Ｃａｓ１３タンパク質と、
（ｂ）直接反復配列に連結されるガイド配列を含むガイド分子と、
（ｃ）アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインと、を送達することを含み、
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記死んだＣａｓ１３タンパク質または前記ガイド分子に共有結合もしくは非共有結合で連結されるか、あるいは送達後にそれらに連結するように適合されており、
前記ガイド分子が、前記死んだＣａｓ１３タンパク質と複合体を形成し、前記複合体を前記目的の標的ＲＮＡ配列に結合するように導き、前記ガイド配列が、前記アデニンを含む標的配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二本鎖を形成することができ、前記ガイド配列が、前記アデニンに対応する位置で非対合シトシンを含み、形成されたＲＮＡ二本鎖においてＡ－Ｃミスマッチをもたらし、
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記ＲＮＡ二本鎖において前記アデニンを脱アミノする、方法。
【請求項１８】

前記Ｃａｓ１３タンパク質が、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、またはＣａｓ１３ｃである、請求項１７に記載の方法。

【請求項１９】

前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記死んだＣａｓ１３タンパク質のＮ末端またはＣ末端に融合される、請求項１７に記載の方法。

【請求項２０】

前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、リンカーによって前記死んだＣａｓ１３タンパク質に融合される、請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】

前記リンカーが、$(GGGGS)_{3-11}$、GSG_5もしくはＬＥＰＧＥＫＰＹＫＣＰＥＣＧＫＳＦＳＱＳＧＡＬＴＲＨＱＲＴＨＴＲであるか、または前記リンカーがＸＴＥＮリンカーである、請求項２０に記載の方法。

【請求項２２】

前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、アダプタータンパク質に連結され、前記ガイド分子または前記死んだＣａｓ１３タンパク質が、前記アダプタータンパク質に結合することができるアプタマー配列を含む、請求項１７に記載の方法。

【請求項２３】

前記アダプター配列が、ＭＳ２、ＰＰ７、Ｑβ、Ｆ２、ＧＡ、ｆｒ、ＪＰ５０１、Ｍ１２、Ｒ１７、ＢＺ１３、ＪＰ３４、ＪＰ５００、ＫＵ１、Ｍ１１、ＭＸ１、ＴＷ１８、ＶＫ、ＳＰ、ＦＩ、ＩＤ２、ＮＬ９５、ＴＷ１９、ＡＰ２０５、φＣｂ５、φＣｂ８ｒ、φＣｂ１２ｒ、φＣｂ２３ｒ、７ｓ、及びＰＲＲ１から選択される、請求項２２に記載の方法。

【請求項２４】

前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記死んだＣａｓ１３タンパク質の内部ループに挿入される、請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

前記Ｃａｓ１３タンパク質が、Ｃａｓ１３ａタンパク質であり、前記Ｃａｓ１３ａが、２つのＨＥＰＮドメインにおいて、特に、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉに由来するＣａｓ １３ａタンパク質の位置Ｒ４７４及びＲ１０４６またはＣａｓ１３ａオーソログのそれらに対応するアミノ酸位置で１つ以上の変異を含む、請求項２４に記載の方法。

【請求項２６】

前記Ｃａｓ１３タンパク質が、Ｃａｓ１３ｂタンパク質であり、前記Ｃａｓ１３ｂが、Ｂｅｒｇｅｙｅｌｌａ ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ ＡＴＣＣ ４３７６７に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質の位置Ｒ１１６、Ｈ１２１、Ｒ１１７７、もしくはＨ１１８２のうちの１つ以上、またはＣａｓ１３ｂオーソログのそれらに対応するアミノ酸位置において変異を含む、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

前記変異が、Ｂｅｒｇｅｙｅｌｌａ ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ ＡＴＣＣ ４３７６７に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質のＲ１１６Ａ、Ｈ１２１Ａ、Ｒ１１７７Ａ、またはＨ１１８２Ａのうちの１つ以上、もしくはＣａｓ１３ｂオーソログのそれらに対応するアミノ酸位置である、請求項２６に記載の方法。

【請求項２８】

前記ガイド配列が、前記標的配列と前記ＲＮＡ二本鎖を形成することができる約２０～約５３ｎｔ、約２５～約５３ｎｔ、または約２９～約５３ｎｔの長さを有する、請求項１７～２７のいずれかに記載の方法。

【請求項２９】

前記ガイド配列が、前記標的配列と前記ＲＮＡ二本鎖を形成することができる約４０～約５０ｎｔの長さを有する、請求項２８のいずれかに記載の方法。

【請求項３０】
前記非対合Ｃと前記ガイド配列の５’末端との間の距離が、２０～３０ヌクレオチドである、請求項１７に記載の方法。
【請求項３１】
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、ヒト、頭足類、またはＤｒｏｓｏｐｈｉｌａアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインである、請求項１７～３０のいずれかに記載の方法。
【請求項３２】
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のグルタミン酸^{488}、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含むように修飾されている、請求項１７に記載の方法。
【請求項３３】
位置４８８または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での前記グルタミン酸残基が、グルタミン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｑ）、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、変異Ｅ４８８Ｑを含む変異されたｈＡＤＡＲ２ｄまたは変異Ｅ１００８Ｑを含む変異されたｈＡＤＡＲ１ｄである、請求項３２または３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記ガイド配列が、前記標的ＲＮＡ配列における異なるアデノシン部位に対応する２つ以上のミスマッチを含むか、または２つのガイド分子が使用され、各々が、前記標的ＲＮＡ配列における異なるアデノシン部位に対応するミスマッチを含む、請求項１７～３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３６】
前記Ｃａｓ１３タンパク質及び任意選択で前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、１つ以上の異種核局在化シグナル（複数可）（ＮＬＳ）を含む、請求項１７～３５に記載の方法。
【請求項３７】
前記方法が、前記目的の標的配列を決定することと、前記標的配列に存在する前記アデニンを最も効率的に脱アミノする前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを選択することと、を含む、請求項１７～３６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３８】
前記触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質が、表１、２、３、または４のいずれかに列挙される細菌種からなる群から選択される細菌種に由来するＣａｓ１３ヌクレアーゼから得られる、請求項１７～３７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３９】
前記目的の標的ＲＮＡ配列が、細胞内にある、請求項１７～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４０】
前記細胞が、真核細胞である、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記細胞が、非ヒト動物細胞である、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
前記細胞が、ヒト細胞である、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記細胞が、植物細胞である、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記目的の標的座位が動物内にある、請求項１７～４３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４５】

前記目的の標的座位が植物内にある、請求項１７～４４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４６】
前記目的の標的ＲＮＡ配列が、インビトロにおけるＲＮＡポリヌクレオチドに含まれる、請求項１７～４５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４７】
前記成分（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）が、リボ核タンパク質複合体として前記細胞に送達される、請求項１７～４６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４８】
前記成分（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）が、１つ以上のポリヌクレオチド分子として前記細胞に送達される、請求項１７～４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４９】
前記１つ以上のポリヌクレオチド分子が、成分（ａ）及び／または（ｃ）をコードする１つ以上のｍＲＮＡ分子を含む、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記１つ以上のポリヌクレオチド分子が、１つ以上のベクター内に含まれる、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
前記１つ以上のポリヌクレオチド分子が、前記Ｃａｓ１３タンパク質、前記ガイド分子、及び前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを発現するように動作可能に構成された１つ以上の調節エレメントを含み、任意選択で、前記１つ以上の調節エレメントが誘導性プロモーターを含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記１つ以上のポリヌクレオチド分子または前記リボ核タンパク質複合体が、粒子、小胞、または１つ以上のウイルスベクターを介して送達される、請求項４８に記載の方法。
【請求項５３】
前記粒子が、脂質、糖、金属またはタンパク質を含む、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
前記粒子が、脂質ナノ粒子を含む、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
前記小胞が、エクソソームまたはリポソームを含む、請求項５２に記載の方法。
【請求項５６】
前記１つ以上のウイルスベクターが、アデノウイルス、１つ以上のレンチウイルス、または１つ以上のアデノ関連ウイルスのうちの１つ以上を含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５７】
前記方法が、１つ以上の標的ＲＮＡ配列の操作によって細胞、細胞株または生物を修飾する、請求項１７～５６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５８】
前記目的の標的ＲＮＡにおける前記アデニンの前記脱アミノが、病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ点変異を含有する転写産物によって引き起こされる疾患を治療する、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記疾患が、Ｍｅｉｅｒ－Ｇｏｒｌｉｎ症候群、Ｓｅｃｋｅｌ症候群４、Ｊｏｕｂｅｒｔ症候群５、Ｌｅｂｅｒ先天性黒内障１０、２型Ｃｈａｒｃｏｔ－Ｍａｒｉｅ－Ｔｏｏｔｈ病、２型Ｃｈａｒｃｏｔ－Ｍａｒｉｅ－Ｔｏｏｔｈ病、２Ｃ型Ｕｓｈｅｒ症候群、脊髄小脳失調症２８、脊髄小脳失調症２８、脊髄小脳失調症２８、ＱＴ延長症候群２、Ｓｊｏｇｒｅｎ－Ｌａｒｓｓｏｎ症候群、遺伝性果糖尿症、遺伝性果糖尿症、神経芽細胞腫、神経芽細胞腫、Ｋａｌｌｍａｎｎ症候群１、Ｋａｌｌｍａｎｎ症候群１、Ｋａｌｌｍａｎｎ症候群１、異染性白質ジストロフィー、Ｒｅｔｔ症候群、筋萎縮性側索硬化症１０型、Ｌｉ－Ｆｒａｕｍｅｎｉ症候群、または表５に列挙される疾患から選択される、請求項５８に記載の方法。

【請求項６０】
前記疾患が、中途終結疾患である、請求項５８に記載の方法。
【請求項６１】
前記修飾が、生物の妊孕性に影響する、請求項５７に記載の方法。
【請求項６２】
前記修飾が、前記標的ＲＮＡ配列のスプライシングに影響する、請求項５７に記載の方法。
【請求項６３】
前記修飾が、アミノ酸変化を導入し、がん細胞における新たな抗原の発現を引き起こす転写産物における変異を導入する、請求項５７に記載の方法。
【請求項６４】
前記標的ＲＮＡが、マイクロＲＮＡ内に含まれる、請求項５７に記載の方法。
【請求項６５】
前記目的の標的ＲＮＡにおける前記アデニンの前記脱アミノが、遺伝子の機能の獲得または機能の欠失を引き起こす、請求項５７に記載の方法。
【請求項６６】
前記遺伝子が、がん細胞によって発現される遺伝子である、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
先行請求項のいずれかに記載の方法から得られる修飾された細胞、または前記修飾された細胞の後代であって、前記細胞が、前記方法を受けていない対応する細胞と比較して、前記目的の標的ＲＮＡにおける前記アデニンに代わるヒポキサンチンまたはグアニンを含む、修飾された細胞または後代。
【請求項６８】
前記細胞が、真核細胞である、請求項６７に記載の修飾された細胞またはその後代。
【請求項６９】
前記細胞が、動物細胞である、請求項６７に記載の修飾された細胞またはその後代。
【請求項７０】
前記細胞が、ヒト細胞である、請求項６７に記載の修飾された細胞またはその後代。
【請求項７１】
前記細胞が、治療用Ｔ細胞である、請求項６７に記載の修飾された細胞またはその後代。
【請求項７２】
前記細胞が抗体産生Ｂ細胞である、請求項６７に記載の修飾された細胞またはその後代。
【請求項７３】
前記細胞が、植物細胞である、請求項６７に記載の修飾された細胞またはその後代。
【請求項７４】
前記請求項６７に記載の修飾された細胞を含む非ヒト動物。
【請求項７５】
前記請求項７４に記載の修飾された細胞を含む植物。
【請求項７６】
細胞療法のための方法であって、それを必要とする患者に前記請求項６７～７５のいずれかに記載の修飾された細胞を投与することを含み、前記修飾された細胞の存在が、前記患者における疾患を治療する、方法。
【請求項７７】
目的の標的座位におけるアデニンを修飾するのに適した、操作された非天然型のシステムであって、
ａ）直接反復配列に連結されたガイド配列を含むガイド分子、または前記ガイド分子をコードするヌクレオチド配列と、
ｂ）触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質、または前記触媒的に不活性なＣａｓ１３

タンパク質をコードするヌクレオチド配列と、
ｃ）アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメイン、または前記アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列と、を含み、
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記Ｃａｓ１３タンパク質もしくは前記ガイド分子に共有結合または非共有結合で連結されるか、または送達後にそれらに連結するように適合されており、
前記ガイド配列が、アデニンを含む標的ＲＮＡ配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二本鎖を形成することができ、前記ガイド配列が、前記アデニンに対応する位置で非対合シトシンを含み、形成された前記ＲＮＡ二本鎖においてＡ－Ｃミスマッチをもたらす、システム。
【請求項７８】
請求項７７に記載のａ）、ｂ）及びｃ）のヌクレオチド配列を含む、目的の標的座位におけるアデニンを修飾するのに適した操作された非天然型のベクターシステム。
【請求項７９】
ａ）前記ガイド配列を含む前記ガイド分子をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結される第１の調節エレメントと、
ｂ）前記触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結される第２の調節エレメントと、
ｃ）前記第１または第２の調節エレメントの制御下にあるか、または第３の調節エレメントに動作可能に連結されるアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列と、を含む１つ以上のベクターを含み、
アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列が第３の調節エレメントに動作可能に連結される場合、前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、発現後に前記ガイド分子または前記Ｃａｓ１３タンパク質に連結するように適合され、
成分（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）は、前記システムの同じまたは異なるベクター上に位置する、請求項７８に記載の操作された非天然型のベクターシステム。
【請求項８０】
請求項７７～７９のいずれかに記載のシステムを含む、インビトロもしくはエクスビボ宿主細胞もしくはその後代、または細胞株もしくはその後代。
【請求項８１】
前記細胞が、真核細胞である、宿主細胞もしくはその後代、または請求項８０に記載の細胞株もしくはその後代。
【請求項８２】
前記細胞が、動物細胞である、宿主細胞もしくはその後代、または請求項８０に記載の細胞株もしくはその後代。
【請求項８３】
前記細胞が、ヒト細胞である、宿主細胞もしくはその後代、または請求項８０に記載の細胞株もしくはその後代。
【請求項８４】
前記細胞が、植物細胞である、宿主細胞もしくはその後代、または請求項８０に記載の細胞株もしくはその後代。
【請求項８５】
前記シトシンが、グアノシンに５’隣接しない、請求項１１７に記載の方法。
【請求項８６】
前記アデノシンデアミナーゼが、ＡＤＡＲ、任意選択でｈｕＡＤＡＲ、任意選択で（ｈｕ）ＡＤＡＲ１または（ｈｕ）ＡＤＡＲ２である、請求項１７に記載の方法。
【請求項８７】
前記Ｃａｓ１３、好ましくはＣａｓ１３ｂが、切断され、好ましくはＣ末端切断され、

好ましくは、前記Ｃａｓ１３が、対応する野生型Ｃａｓ１３の切断された機能的バリアントである、請求項１７に記載の方法。
【請求項８８】
前記アデノシンデアミナーゼが、ＲＮＡ特異的アデノシンデアミナーゼである、請求項１７に記載の方法。
【請求項８９】
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記ＡＤＡＲの１つ以上の変異、好ましくは本明細書に記載の変異、例えば、図４３Ａ～４３Ｄ、４４、４５、４６Ａ～４６Ｂ、４７Ａ～４７Ｂのいずれかに提供される変異、またはＡＤＡＲホモログまたはオーソログにおける対応する変異を含むように修飾されている、請求項１７または３２に記載の方法。
【請求項９０】
目的の標的ＲＮＡ配列におけるアデニンを修飾する方法であって、前記標的ＲＮＡに、
（ａ）触媒的に不活性な（死んだ）Ｃａｓ１３タンパク質と、
（ｂ）直接反復配列に連結されるガイド配列を含むガイド分子と、
（ｃ）活性をシチジンデアミナーゼに変換するように変異されたアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインと、を送達することを含み、
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記死んだＣａｓ１３タンパク質または前記ガイド分子に共有結合もしくは非共有結合で連結されるか、あるいは送達後にそれらに連結するように適合されており、
前記ガイド分子が、前記死んだＣａｓ１３タンパク質と複合体を形成し、前記複合体を前記目的の標的ＲＮＡ配列に結合するように導き、前記ガイド配列が、前記アデニンを含む標的配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二本鎖を形成することができ、前記ガイド配列が、前記アデニンに対応する位置で非対合シトシンを含み、形成されたＲＮＡ二本鎖においてＡ－Ｃミスマッチをもたらし、
前記アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、前記ＲＮＡ二本鎖において前記アデニンを脱アミノする、方法。
【請求項９１】
前記アデノシンデアミナーゼが、Ｅ３９６、Ｃ４５１、Ｖ３５１、Ｒ４５５、Ｔ３７５、Ｋ３７６、Ｓ４８６、Ｑ４８８、Ｒ５１０、Ｋ５９４、Ｒ３４８、Ｇ５９３、Ｓ３９７、Ｈ４４３、Ｌ４４４、Ｙ４４５、Ｆ４４２、Ｅ４３８、Ｔ４４８、Ａ３５３、Ｖ３５５、Ｔ３３９、Ｐ５３９、Ｖ５２５、及びＩ５２０から選択される１つ以上の位置で変異される、請求項９０に記載の方法。
【請求項９２】
前記アデノシンデアミナーゼが、Ｅ４８８、Ｖ３５１、Ｓ４８６、Ｔ３７５、Ｓ３７０、Ｐ４６２、及びＮ５９７から選択される１つ以上の位置で変異される、請求項９１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１７年１０月４日に出願された米国仮出願第６２／５６８，３１３号の利益を主張する。上述の出願の全ての内容は、参照により本明細書に完全に組み込まれる。
【０００２】
連邦後援研究についての声明
本発明は、国立衛生研究所によって認められた助成番号ＭＨ１００７０６及びＭＨ１００４９下での政府の支援でなされた。政府は、本発明においてある一定の権利を有する。
【０００３】

電子配列表への参照
電子配列表（「ＢＲＯＤ－２３４５ＷＰ＿ＳＴ２５＿ＦＯＲ＿ＦＩＬＩＮＧ．ｔｘｔ」、サイズは１，４２７，２３２バイトでありそれは２０１８年９月２５日に作成された）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。
【０００４】
本発明は一般に、特に目的の標的座位でのアデニンのプログラム可能な脱アミンのための核酸を標的化及び編集するためのシステム、方法、及び組成物に関する。
【背景技術】
【０００５】
ゲノムシークエンシング技術及び分析方法における最近の進歩は、多様な生物学的機能及び疾患に関連する遺伝学的因子をカタログ化及びマッピングする能力を著しく加速させた。正確なゲノム標的化技術は、個々の遺伝的エレメントの選択的撹乱を可能にすることにより、原因遺伝的変異の系統的なリバースエンジニアリングを可能にするため、同様に合成生物学、バイオテクノロジー、及び医療用途を進めるために、必要とされる。標的化されたゲノム撹乱を生成するために、デザイナージンクフィンガー、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）、またはホーミングメガヌクレアーゼのようなゲノム編集技術が利用可能であるが、新規の戦略及び分子機構を採用し、価格も手頃で、設定しやすく、拡張性があり、真核ゲノム内の複数の位置を標的化しやすい新しいゲノム工学技術に対する必要性は存在し続ける。このことは、ゲノム工学及びバイオテクノロジーに新しい用途のための主な資源を提供するであろう。
【０００６】
シトシンのプログラム可能な脱アミノは、報告されており、Ａ→Ｇ及びＴ→Ｃ点変異の矯正のために使用され得る。例えば、Ｋｏｍｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ（２０１６）５３３：４２０－４２４は、シトシンのウラシルへの変換をもたらすＣａｓ９ガイドＲＮＡ複合体の標的化されたＤＮＡ鎖への結合によって取り代えられた標的化されていないＤＮＡ鎖におけるＡＰＯＢＥＣ１シチジンデアミナーゼによるシトシンの標的化された脱アミノを報告する。Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２０１７）３５：３７１－３７６、Ｓｈｉｍａｔａｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２０１７）ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３８３３、Ｚｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２０１７）ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３８１１、Ｙａｎｇ Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎ（２０１６）ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｃｏｍｍｓ１３３３０も参照されたい。
【発明の概要】
【０００７】
本出願は、目的の標的ＲＮＡ配列を修飾することに関する。ＤＮＡ標的化よりむしろＲＮＡ標的化を使用することは、治療開発のために適切ないくつかの利点を提供する。第一に、ＲＮＡを標的化することには実質的な安全性の利点がある。トランスクリプトームにおける利用可能な配列空間がゲノムより著しく小さいため、オフターゲットの事象はより少なくなり、オフターゲットの事象が発生するような場合には、それは一過性であり、あまり負の副作用を誘導しそうにないようになるであろう。第二に、ＲＮＡ標的化治療薬は、それらが細胞型独立であり核に入らなくてもよいことで送達しやすくなっており、より効率的になるであろう。
【０００８】
一態様では、本開示は、標的化ドメインと、そのアデノシンデアミナーゼまたは触媒ドメインとを含む、部位特異的塩基編集のための操作された組成物を含み、アデノシンデアミナーゼは、活性をシチジンデアミナーゼに変換するように修飾される。
【０００９】
いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ３９６、Ｃ４５１、Ｖ３５１、Ｒ４５５、Ｔ３７５、Ｋ３７６、Ｓ４８６、Ｑ４８８、Ｒ５１０、Ｋ５９４、Ｒ３４８

、Ｇ５９３、Ｓ３９７、Ｈ４４３、Ｌ４４４、Ｙ４４５、Ｆ４４２、Ｅ４３８、Ｔ４４８、Ａ３５３、Ｖ３５５、Ｔ３３９、Ｐ５３９、Ｖ５２５、及びＩ５２０から選択される１つ以上の位置で１つ以上の変異によって修飾される。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８、Ｖ３５１、Ｓ４８６、Ｔ３７５、Ｓ３７０、Ｐ４６２、及びＮ５９７から選択される１つ以上の位置で変異される。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８Ｑ、Ｖ３５１Ｇ、Ｓ４８６Ａ、Ｔ３７５Ｓ、Ｓ３７０Ｃ、Ｐ４６２Ａ、及びＮ５９７Ｉから選択される１つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、ヒト、頭足類、またはＤｒｏｓｏｐｈｉｌａアデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインである。いくつかの実施形態では、該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のグルタミン酸４８８、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置で変異を含むよう修飾されている。いくつかの実施形態では、位置４８８または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での該グルタミン酸残基は、グルタミン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｑ）。いくつかの実施形態では、該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、変異Ｅ４８８Ｑを含む変異されたｈＡＤＡＲ２ｄまたは変異Ｅ１００８Ｑを含む変異されたｈＡＤＡＲ１ｄである。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは、触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質、または該触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質をコードするヌクレオチド配列である。いくつかの実施形態では、触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質は、触媒的に不活性なＣａｓ１３ａ、触媒的に不活性なＣａｓ１３ｂ、または触媒的に不活性なＣａｓ１３ｃである。いくつかの実施形態では、該触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質は、表１、２、３、または４のいずれかにおいて列挙される細菌種からなる群から選択される細菌種に由来するＣａｓ１３ヌクレアーゼから得られる。いくつかの実施形態では、組成物は、直接反復配列に連結されたガイド配列を含むガイド分子、または該ガイド分子をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、標的化ドメインに共有結合または非共有結合で連結されている。

【００１０】

別の態様では、本発明は、目的の標的ＲＮＡ配列におけるアデニンを修飾する方法に関する。特定の実施形態では、方法は、該標的ＲＮＡに、（ａ）触媒的に不活性な（死んだ）Ｃａｓ１３タンパク質、（ｂ）直接反復配列に連結されたガイド配列を含むガイド分子、及び（ｃ）アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインであって、該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインが、該死んだＣａｓ１３タンパク質または該ガイド分子に共有または非共有結合で連結されているか、または送達後にそれらを連結するように適合され、ガイド分子が、該死んだＣａｓ１３タンパク質と複合体を形成し、該複合体を目的の該標的ＲＮＡ配列に結合するように導き、該ガイド配列が、該アデニンを含む標的配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二本鎖を形成することができ、該ガイド配列が、該アデニンに対応する位置で非対合シトシンを含み、形成されるＲＮＡ二本鎖においてＡ－Ｃミスマッチをもたらす、Ｃａｓ１３タンパク質、ガイド分子、及びアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを送達することを含む。

【００１１】

ある特定の例示的実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質は、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、またはＣａｓ　１３ｃである。

【００１２】

アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、該死んだＣａｓ１３タンパク質のＮ末端またはＣ末端に融合される。ある特定の例示的実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、リンカーによって該死んだＣａｓ１３タンパク質に融合される。リンカーは、$(GGGGS)_{3-11}$（配列番号１～９）GSG_5（配列番号１０）またはＬＥＰＧＥＫＰＹＫＣＰＥＣＧＫＳＦＳＱＳＧＡＬＴＲＨＱＲＴＨＴＲ（配列番号１１）であり得る。

【００１３】
ある特定の例示的実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、アダプタータンパク質に連結され、該ガイド分子または該死んだＣａｓ１３タンパク質は、該アダプタータンパク質に結合することができるアプタマー配列を含む。アダプター配列は、ＭＳ２、ＰＰ７、Ｑβ、Ｆ２、ＧＡ、ｆｒ、ＪＰ５０１、Ｍ１２、Ｒ１７、ＢＺ１３、ＪＰ３４、ＪＰ５００、ＫＵ１、Ｍ１１、ＭＸ１、ＴＷ１８、ＶＫ、ＳＰ、ＦＩ、ＩＤ２、ＮＬ９５、ＴＷ１９、ＡＰ２０５、φＣｂ５、φＣｂ８ｒ、φＣｂ１２ｒ、φＣｂ２３ｒ、７ｓ、及びＰＲＲ１から選択され得る。
【００１４】
ある特定の例示的実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、該死んだＣａｓ１３タンパク質の内部ループに挿入される。ある特定の例示的実施形態では、Ｃａｓ１３ａタンパク質は、２つのＨＥＰＮドメイン、特にＬｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉに由来するＣａｓ　１３ａタンパク質の位置Ｒ４７４及びＲ１０４６、またはＣａｓ１３ａオーソログのそれらに対応するアミノ酸位置で１つ以上の変異を含む。
【００１５】
ある特定の例示的実施形態では、Ｃａｓ　１３タンパク質はＣａｓ１３ｂタンパク質であり、Ｃａｓ１３ｂは、Ｂｅｒｇｅｙｅｌｌａ　ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ　ＡＴＣＣ　４３７６７に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質の位置Ｒ１１６、Ｈ１２１、Ｒ１１７７、Ｈ１１８２のうちの１つ以上、またはＣａｓ１３ｂオーソログのそれらに対応するアミノ酸位置において変異を含む。ある特定の他の例示的実施形態では、変異は、Ｂｅｒｇｅｙｅｌｌａ　ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ　ＡＴＣＣ　４３７６７に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質のＲ１１６Ａ、Ｈ１２１Ａ、Ｒ１１７７Ａ、Ｈ１１８２Ａのうちの１つ以上、またはＣａｓ１３ｂオーソログのそれらに対応するアミノ酸位置である。
【００１６】
ある特定の例示的実施形態では、ガイド配列は、該標的配列と該ＲＮＡ二本鎖を形成することができる約２９～５３ｎｔの長さを有する。ある特定の他の実施形態では、ガイド配列は、該標的配列と該ＲＮＡ二本鎖を形成することができる約４０～５０ｎｔの長さを有する。ある特定の例示的な実施形態では、該非対合Ｃと該ガイド配列の５’末端との間の距離は、２０～３０ヌクレオチドである。
【００１７】
ある特定の例示的実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、ヒト、頭足類、またはＤｒｏｓｏｐｈｉｌａアデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインである。ある特定の例示的実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のグルタミン酸^{488}、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置で変異を含むよう修飾されている。ある特定の例示的実施形態では、グルタミン酸残基は位置４８８であり得るか、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置はグルタミン残基によって置き換えられてもよい（Ｅ４８８Ｑ）。
【００１８】
ある特定の他の例示的実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、変異Ｅ４８８Ｑを含む変異されたｈＡＤＡＲ２ｄまたは変異Ｅ１００８Ｑを含む変異されたｈＡＤＡＲ１ｄである。
【００１９】
ある特定の例示的実施形態では、ガイド配列は、標的ＲＮＡ配列における異なるアデノシン部位に対応するか、または２つのガイド分子が使用される２つ以上のミスマッチを含み、各々が標的ＲＮＡ配列における異なるアデノシン部位に対応するミスマッチを含む。
【００２０】
ある特定の例示的実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質及び任意選択で該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、１つ以上の異種核局在化シグナル（複

数可）（ＮＬＳ）を含む。
【００２１】
ある特定の例示的実施形態では、方法は、目的の標的配列を決定することと、最も効率的に、当時の標的配列に存在する該アデニンを脱アミノするアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを選択することとをさらに含む。
【００２２】
目的の標的ＲＮＡ配列は、細胞内にあり得る。細胞は、真核細胞、非ヒト動物細胞、ヒト細胞、植物細胞であり得る。目的の標的座位は、動物または植物内にあり得る。
【００２３】
目的の標的ＲＮＡ配列は、インビトロでＲＮＡポリヌクレオチドを含むことができる。
【００２４】
本明細書に記載のシステムの成分は、リボ核タンパク質複合体としてまたは１つ以上のポリヌクレオチド分子として該細胞に送達され得る。１つ以上のポリヌクレオチド分子は、成分をコードする１つ以上のｍＲＮＡ分子を含むことができる。１つ以上のポリヌクレオチド分子は、１つ以上のベクター内に含まれ得る。１つ以上のポリヌクレオチド分子は、該Ｃａｓ１３タンパク質、該ガイド分子、及び該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを発現するように動作可能に構成された１つ以上の調節エレメントをさらに含むことができ、任意選択で、該１つ以上の調節エレメントは誘導性プロモーターを含む。１つ以上のポリヌクレオチド分子または該リボ核タンパク質複合体は、粒子、小胞、または１つ以上のウイルスベクターを介して送達され得る。粒子は、脂質、糖、金属またはタンパク質を含むことができる。粒子は、脂質ナノ粒子を含むことができる。小胞は、エクソソームまたはリポソームを含むことができる。１つ以上のウイルスベクターは、アデノウイルス、１つ以上のレンチウイルス、または１つ以上のアデノ関連ウイルスのうちの１つ以上を含むことができる。
【００２５】
本明細書に開示される方法は、１つ以上の標的ＲＮＡ配列の操作によって細胞、細胞株または生物を修飾するために使用され得る。
【００２６】
ある特定の例示的実施形態では、目的の該標的ＲＮＡにおける該アデニンの脱アミノは、病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ点変異を含有する転写産物によって引き起こされる疾患を治療する。
【００２７】
方法は、廃用性を治療するために使用され得る。ある特定の例示的実施形態では、疾患は、Ｍｅｉｅｒ－Ｇｏｒｌｉｎ症候群、Ｓｅｃｋｅｌ症候群４、Ｊｏｕｂｅｒｔ症候群５、Ｌｅｂｅｒ先天性黒内障１０、２型Ｃｈａｒｃｏｔ－Ｍａｒｉｅ－Ｔｏｏｔｈ病、２型Ｃｈａｒｃｏｔ－Ｍａｒｉｅ－Ｔｏｏｔｈ病、２Ｃ型Ｕｓｈｅｒ症候群、脊髄小脳失調症２８、脊髄小脳失調症２８、脊髄小脳失調症２８、ＱＴ延長症候群２、Ｓｊｏｇｒｅｎ－Ｌａｒｓｓｏｎ症候群、遺伝性果糖尿症、遺伝性果糖尿症、神経芽細胞腫、神経芽細胞腫、Ｋａｌｌｍａｎｎ症候群１、Ｋａｌｌｍａｎｎ症候群１、Ｋａｌｌｍａｎｎ症候群１、異染性白質ジストロフィー、Ｒｅｔｔ症候群、筋萎縮性側索硬化症１０型、Ｌｉ－Ｆｒａｕｍｅｎｉ症候群、または表５に列挙される疾患から選択される。疾患は、中途終結疾患であり得る。
【００２８】
本明細書に開示される方法は、生物の妊孕性に影響する修飾を行うために使用され得る。修飾は、該標的ＲＮＡ配列のスプライシングに影響することができる。修飾は、アミノ酸変化を導入し、がん細胞において新しい抗原の発現を引き起こす転写産物に変異を導入することができる。
【００２９】
ある特定の例示的実施形態では、標的ＲＮＡは、マイクロＲＮＡであり得るか、またはマイクロＲＮＡ内に含まれ得る。ある特定の例示的実施形態では、目的の該標的ＲＮＡに

おける該アデニンの脱アミノは、遺伝子の機能の獲得または機能の欠失を引き起こす。ある特定の例示的実施形態では、遺伝子は、がん細胞によって発現される遺伝子である。

【００３０】

ある特定の例示的実施形態では、該シトシンは、グアノシンに隣接する５’ではない。ある特定の例示的実施形態では、該アデノシンデアミナーゼは、ＡＤＡＲ、任意選択でｈｕＡＤＡＲ、任意選択で（ｈｕ）ＡＤＡＲ１または（ｈｕ）ＡＤＡＲ２である。ある特定の例示的実施形態では、該Ｃａｓ１３、好ましくはＣａｓ１３ｂは、切断され、好ましくはＣ末端で切断され、好ましくは、該Ｃａｓ　１３は対応する野生型Ｃａｓ１３の切断された機能的バリアントである。ある特定の例示的実施形態では、該アデノシンデアミナーゼは、ＲＮＡ特異的アデノシンデアミナーゼである。ある特定の例示的実施形態では、該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、該ＡＤＡＲの１つ以上の変異、好ましくは本明細書に記載の変異、例えば、図４３Ａ～４３Ｄ、４４、４５、４６Ａ～４６Ｂ、４７Ａ～４７Ｂのいずれかに提供される変異、またはＡＤＡＲホモログまたはオーソログにおける対応する変異を含むように修飾されている。

【００３１】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の方法を使用して得られる修飾された細胞またはその後代を含み、該細胞は、方法に従わない対応する細胞と比較して、目的の該標的ＲＮＡにおける該アデニンに代わるヒポキサンチンまたはグアニンを含む。修飾された細胞またはその後代は、真核細胞動物細胞、ヒト細胞、治療用Ｔ細胞、抗体産生Ｂ細胞、植物細胞であり得る。

【００３２】

別の態様では、本発明は、該修飾された細胞またはその後代を含む非ヒト動物を含む。修飾されたものは、植物細胞であり得る。

【００３３】

別の態様では、本発明は、それを必要とする患者に本明細書に開示される修飾された細胞を投与することを含む細胞療法のための方法を含み、該修飾された細胞の存在は、患者における疾患を治療する。

【００３４】

別の態様では、本発明は、Ａ）直接反復配列に連結されたガイド配列を含むガイド分子、または該ガイド分子をコードするヌクレオチド配列、Ｂ）触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質、または該触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質をコードするヌクレオチド配列、Ｃ）アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメイン、または該アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列を含み、該アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインは、該Ｃａｓ１３タンパク質または該ガイド分子に共有結合または非共有結合で連結されるか、または送達後にそこへ連結するよう適合され、該ガイド配列はアデニンを含む標的ＲＮＡ配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二本鎖を形成することができ、該ガイド配列は、該アデニンに対応する位置で非対合シトシンを含み、形成されたＲＮＡ二本鎖においてＡ－Ｃミスマッチをもたらす、目的の標的座位においてアデニンを修飾するのに適した操作された非天然型のシステムに関する。

【００３５】

別の態様では、本発明は、ａ）、ｂ）及びｃ）のヌクレオチド配列を含む、目的の標的座位におけるアデニンを修飾するのに適した操作された非天然型のベクターシステムに関する。

【００３６】

別の態様では、本発明は、該ガイド配列を含む該ガイド分子をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結される第１の調節エレメント、該触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結される第２の調節エレメント、及び該第１もしくは第２の調節エレメントの制御下にあるか、または第３の調節エレメントに動作可能に連結されるアデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインを

コードするヌクレオチド配列を含む１つ以上のベクターを含み、アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインをコードする該ヌクレオチド配列が第３の調節エレメントに動作可能に連結される場合、該アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインは、発現後に該ガイド分子もしくは該Ｃａｓ１３タンパク質に連結するように適合され、成分Ａ）、Ｂ）及びＣ）は、システムの同じまたは異なるベクター上に位置する、操作された非天然型のベクターに関する。

【００３７】

本明細書に開示される方法が、結合すること及び切断ＲＮＡの特異性のために哺乳動物細胞において機能するＣａｓ１３タンパク質の能力を示すため、追加的な拡張された用途は、スプライスバリアントを編集することとＲＮＡ結合タンパク質がどのようにＲＮＡと相互作用するか測定することとを含む。

【００３８】

別の態様では、本発明は、本明細書に開示されるシステムを含む、インビトロまたはエクスビボ宿主細胞もしくはその後代またはその細胞株もしくはその後代に関する。宿主細胞またはその後代は、真核細胞、動物細胞、ヒト細胞、または植物細胞であり得る。

【００３９】

別の態様では、本開示は、（ａ）触媒的に不活性な（死んだ）Ｃａｓ１３タンパク質、（ｂ）直接反復配列に連結されたガイド配列を含むガイド分子、及び（ｃ）活性をシチジンデアミナーゼに変換するためのアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを該標的ＲＮＡに送達することを含み、該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、共有結合または非共有結合で該死んだＣａｓ１３タンパク質または該ガイド分子に連結されているか、または送達後にそれらに連結するよう適合されており、該ガイド分子は、該死んだＣａｓ１３タンパク質と複合体を形成し目的の該標的ＲＮＡ配列に結合するよう該複合体を導き、該ガイド配列は、ＲＮＡ二本鎖を形成するための該アデニンを含む標的配列とハイブリダイズすることができ、該ガイド配列は、形成されたＲＮＡ二本鎖においてＡ－Ｃミスマッチをもたらす該アデニンに対応する位置で非対合シトシンを含み、該アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、該ＲＮＡ二本鎖において該アデニンを脱アミノする、目的の標的ＲＮＡ配列におけるアデニンを修飾する方法を含む。

【００４０】

いくつかの例示的実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ３９６、Ｃ４５１、Ｖ３５１、Ｒ４５５、Ｔ３７５、Ｋ３７６、Ｓ４８６、Ｑ４８８、Ｒ５１０、Ｋ５９４、Ｒ３４８、Ｇ５９３、Ｓ３９７、Ｈ４４３、Ｌ４４４、Ｙ４４５、Ｆ４４２、Ｅ４３８、Ｔ４４８、Ａ３５３、Ｖ３５５、Ｔ３３９、Ｐ５３９、Ｖ５２５、及びＩ５２０から選択される１つ以上の位置で変異される。いくつかの例示的実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８、Ｖ３５１、Ｓ４８６、Ｔ３７５、Ｓ３７０、Ｐ４６２、及びＮ５９７から選択される１つ以上の位置で変異される。

【００４１】

別の態様では、本発明は、（ａ）直接反復配列に連結されたガイド配列を含むガイド分子、または該ガイド分子をコードするヌクレオチド配列、（ｂ）触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質、または該触媒的に不活性なＣａｓ１３タンパク質をコードするヌクレオチド配列、（ｃ）アデノシンデアミナーゼがシチジンデアミナーゼに活性を変換するように修飾される、アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメイン、または該アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列を含み、該アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインは、該Ｃａｓ１３タンパク質または該ガイド分子に共有結合または非共有結合で連結されるか、または送達後にそこへ連結するよう適合され、該ガイド配列はアデニンを含む標的ＲＮＡ配列とハイブリダイズしてＲＮＡ二本鎖を形成することができ、該ガイド配列は、該アデニンに対応する位置で非対合シトシンを含み、形成されたＲＮＡ二本鎖においてＡ－Ｃミスマッチをもたらす、目的の標的座位においてアデニンを修飾するのに適した操作された非天

然型のシステムを含む。
【００４２】
いくつかの例示的実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ３９６、Ｃ４５１、Ｖ３５１、Ｒ４５５、Ｔ３７５、Ｋ３７６、Ｓ４８６、Ｑ４８８、Ｒ５１０、Ｋ５９４、Ｒ３４８、Ｇ５９３、Ｓ３９７、Ｈ４４３、Ｌ４４４、Ｙ４４５、Ｆ４４２、Ｅ４３８、Ｔ４４８、Ａ３５３、Ｖ３５５、Ｔ３３９、Ｐ５３９、Ｖ５２５、及びＩ５２０から選択される１つ以上の変異によって修飾される。いくつかの例示的実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８、Ｖ３５１、Ｓ４８６、Ｔ３７５、Ｓ３７０、Ｐ４６２、及びＮ５９７から選択される１つ以上の位置で変異される。
【００４３】
例示的実施形態のこれらの及び他の態様、目的、特徴、及び利点は、例示された例示的実施形態の以下の詳細な説明を考慮すると、当業者に明らかになるであろう。
【００４４】
本発明の特徴及び利点の理解は、本発明の原理が利用され得る例示的な実施形態を示す以下の詳細な説明、及び添付の図面を参照して得られるであろう。
【図面の簡単な説明】
【００４５】
【図１】Ｃａｓ１３ｂタンパク質で本明細書に例証される、目的の標的ＲＮＡ配列でのアデニンの標的化された脱アミノのための本発明の例示的実施形態を例示する。
【００４６】
【図２】Ｃａｓ１３ｂを使用するような際に転写産物レベルでヒト疾患を治療するための治療戦略としてのＲＮＡ編集の開発を例示する。ルシフェラーゼ転写産物における操作されたプレ終結終止コドン（ｐｒｅ－ｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ　ｓｔｏｐ　ｃｏｄｏｎ）を標的化するＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２融合によるＲＮＡ塩基編集の概略図。
【００４７】
【図３】ルシフェラーゼ発現を回復するためのガイド位置及び長さ最適化。
【００４８】
【図４－１】アデニンデアミナーゼタンパク質の例示的な配列。（配列番号６５０～６５６）
【図４－２】アデニンデアミナーゼタンパク質の例示的な配列。（配列番号６５０～６５６）
【００４９】
【図５】例示的な実施形態で使用されるガイド（ヌクレオチド配列についての配列番号６５７～６６０、及びアミノ酸配列についての配列番号６９６が示される）。
【００５０】
【図６】編集効率は、ＤＲからさらに離れ、ガイド長を延長することによって達成される長いＲＮＡ二本鎖を有する編集された塩基と相関する
【００５１】
【図７】編集効率が大きくなるほど、編集部位はＤＲ／タンパク質結合領域からさらに離れる。
【００５２】
【図８】ＤＲからの編集部位の距離
【００５３】
【図９Ａ】Ｎ末端またはＣ末端上のＣａｓ１３ｂ１２（二重Ｒ　ＨＥＰＮ変異体）に融合されるＡＤＡＲ１またはＡＤＡＲ２。ガイドは、ルシフェラーゼにおける終止コドンとの完全一致である。シグナルは、編集された塩基とガイドの５’端との間の距離と相関し、より短い距離がより良い編集を提供するようである。
【図９Ｂ】Ｎ末端またはＣ末端上のＣａｓ１３ｂ１２（二重Ｒ　ＨＥＰＮ変異体）に融合されるＡＤＡＲ１またはＡＤＡＲ２。ガイドは、ルシフェラーゼにおける終止コドンとの完全一致である。シグナルは、編集された塩基とガイドの５’端との間の距離と相関し、

より短い距離がより良い編集を提供するようである。
【００５４】
【図１０】Ｃａｓ１３ａ／Ｃａｓ１３ｂインターフェースのためのＣｌｕｃ／Ｇｌｕｃタイリング
【００５５】
【図１１Ａ】ＮＧＳ（ルシフェラーゼレポーター）によるＡＤＡＲ編集定量化。
【図１１Ｂ】ＮＧＳ（ルシフェラーゼレポーター）によるＡＤＡＲ編集定量化。
【図１１Ｃ】ＮＧＳ（ルシフェラーゼレポーター）によるＡＤＡＲ編集定量化。
【００５６】
【図１２】ＮＧＳ（ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ）によるＡＤＡＲ編集定量化。
【００５７】
【図１３Ａ】ＲＮＡ　ＳｅｑからのＣａｓ１３ａ／ｂ＋ｓｈＲＮＡ特異性。
【図１３Ｂ】ＲＮＡ　ＳｅｑからのＣａｓ１３ａ／ｂ＋ｓｈＲＮＡ特異性。
【図１３Ｃ】ＲＮＡ　ＳｅｑからのＣａｓ１３ａ／ｂ＋ｓｈＲＮＡ特異性。
【００５８】
【図１４】オフ標的（Ａ：ＡまたはＡ：Ｇ）を低減するためのミスマッチ特異性（配列番号６６１～６６８）
【００５９】
【図１５】オンターゲット活性についてのミスマッチ
【００６０】
【図１６】ＡＤＡＲモチーフ嗜好性
【００６１】
【図１７】ＲＮＡ編集効率を増強するより大きな泡
【００６２】
【図１８】転写産物における複数のＡの編集（配列番号６６９～６７２）
【００６３】
【図１９】ＲＮＡ編集のためのガイド長滴定
【００６４】
【図２０Ａ】哺乳動物コドン最適化Ｃａｓ１３ｂオーソログは非常に効率的なＲＮＡノックダウンを介在する。（図２０Ａ）代表的なＣａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃ座位ならびに関連するｃｒＲＮＡの概略図。（図２０Ｂ）ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞におけるＣａｓ１３ａ切断活性を測定するためのルシフェラーゼアッセイの概略図。（図２０Ｃ）１９のＣａｓ１３ａ、１５のＣａｓ１３ｂ、及び５のＣａｓ１３ｃオーソログを有するＣｌｕｃを標的化する、２つの異なるガイドを使用するＲＮＡノックダウン効率。ルシフェラーゼ発現は、非標的化ガイド対照条件において発現に正規化される。（図２０Ｄ）パートＣにおいて実行する上位７つのオーソログは、Ｃｌｕｃを標的化する２つの異なるガイドＲＮＡを有する３つの異なるＮＬＳ及びＮＥＳタグで活性についてアッセイされる。（図２０Ｅ）Ｃａｓ１３ｂ１２及びＣａｓ１３ａ２（ＬｗＣａｓ１３ａ）は、Ｇｌｕｃ及びＣｌｕｃに対するノックダウン活性について比較される。ガイドは転写産物に沿ってタイルされ（ｔｉｌｅｄ）、Ｃａｓ１３ｂ１２とＣａｓ１３ａ２との間のガイドは位置合わせされる。（図２０Ｆ）内因性ＫＲＡＳ転写産物に対するＣａｓ１３ａ２、Ｃａｓ１３ｂ６、Ｃａｓ１３ｂ１１、及びＣａｓ１３ｂ１２についてのガイドノックダウンであり、対応するｓｈＲＮＡに対して比較される。
【図２０Ｂ】哺乳動物コドン最適化Ｃａｓ１３ｂオーソログは非常に効率的なＲＮＡノックダウンを介在する。（図２０Ａ）代表的なＣａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃ座位ならびに関連するｃｒＲＮＡの概略図。（図２０Ｂ）ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞におけるＣａｓ１３ａ切断活性を測定するためのルシフェラーゼアッセイの概略図。（図２０Ｃ）１９のＣａｓ１３ａ、１５のＣａｓ１３ｂ、及び５のＣａｓ１３ｃオーソログを有するＣｌｕｃを標的化する、２つの異なるガイドを使用するＲＮＡノックダウン効率。ルシフェラーゼ発現は、非標的化ガイド対照条件において発現に正規化される。（図２０Ｄ）

パートＣにおいて実行する上位７つのオーソログは、Ｃｌｕｃを標的化する２つの異なるガイドＲＮＡを有する３つの異なるＮＬＳ及びＮＥＳタグで活性についてアッセイされる。（図２０Ｅ）Ｃａｓ１３ｂ１２及びＣａｓ１３ａ２（ＬｗＣａｓ１３ａ）は、Ｇｌｕｃ及びＣｌｕｃに対するノックダウン活性について比較される。ガイドは転写産物に沿ってタイルされ（ｔｉｌｅｄ）、Ｃａｓ１３ｂ１２とＣａｓ１３ａ２との間のガイドは位置合わせされる。（図２０Ｆ）内因性ＫＲＡＳ転写産物に対するＣａｓ１３ａ２、Ｃａｓ１３ｂ６、Ｃａｓ１３ｂ１１、及びＣａｓ１３ｂ１２についてのガイドノックダウンであり、対応するｓｈＲＮＡに対して比較される。

【図２０Ｃ】哺乳動物コドン最適化Ｃａｓ１３ｂオーソログは非常に効率的なＲＮＡノックダウンを介在する。（図２０Ａ）代表的なＣａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃ座位ならびに関連するｃｒＲＮＡの概略図。（図２０Ｂ）ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞におけるＣａｓ１３ａ切断活性を測定するためのルシフェラーゼアッセイの概略図。（図２０Ｃ）１９のＣａｓ１３ａ、１５のＣａｓ１３ｂ、及び５のＣａｓ１３ｃオーソログを有するＣｌｕｃを標的化する、２つの異なるガイドを使用するＲＮＡノックダウン効率。ルシフェラーゼ発現は、非標的化ガイド対照条件において発現に正規化される。（図２０Ｄ）パートＣにおいて実行する上位７つのオーソログは、Ｃｌｕｃを標的化する２つの異なるガイドＲＮＡを有する３つの異なるＮＬＳ及びＮＥＳタグで活性についてアッセイされる。（図２０Ｅ）Ｃａｓ１３ｂ１２及びＣａｓ１３ａ２（ＬｗＣａｓ１３ａ）は、Ｇｌｕｃ及びＣｌｕｃに対するノックダウン活性について比較される。ガイドは転写産物に沿ってタイルされ（ｔｉｌｅｄ）、Ｃａｓ１３ｂ１２とＣａｓ１３ａ２との間のガイドは位置合わせされる。（図２０Ｆ）内因性ＫＲＡＳ転写産物に対するＣａｓ１３ａ２、Ｃａｓ１３ｂ６、Ｃａｓ１３ｂ１１、及びＣａｓ１３ｂ１２についてのガイドノックダウンであり、対応するｓｈＲＮＡに対して比較される。

【図２０Ｄ】哺乳動物コドン最適化Ｃａｓ１３ｂオーソログは非常に効率的なＲＮＡノックダウンを介在する。（図２０Ａ）代表的なＣａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃ座位ならびに関連するｃｒＲＮＡの概略図。（図２０Ｂ）ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞におけるＣａｓ１３ａ切断活性を測定するためのルシフェラーゼアッセイの概略図。（図２０Ｃ）１９のＣａｓ１３ａ、１５のＣａｓ１３ｂ、及び５のＣａｓ１３ｃオーソログを有するＣｌｕｃを標的化する、２つの異なるガイドを使用するＲＮＡノックダウン効率。ルシフェラーゼ発現は、非標的化ガイド対照条件において発現に正規化される。（図２０Ｄ）パートＣにおいて実行する上位７つのオーソログは、Ｃｌｕｃを標的化する２つの異なるガイドＲＮＡを有する３つの異なるＮＬＳ及びＮＥＳタグで活性についてアッセイされる。（図２０Ｅ）Ｃａｓ１３ｂ１２及びＣａｓ１３ａ２（ＬｗＣａｓ１３ａ）は、Ｇｌｕｃ及びＣｌｕｃに対するノックダウン活性について比較される。ガイドは転写産物に沿ってタイルされ（ｔｉｌｅｄ）、Ｃａｓ１３ｂ１２とＣａｓ１３ａ２との間のガイドは位置合わせされる。（図２０Ｆ）内因性ＫＲＡＳ転写産物に対するＣａｓ１３ａ２、Ｃａｓ１３ｂ６、Ｃａｓ１３ｂ１１、及びＣａｓ１３ｂ１２についてのガイドノックダウンであり、対応するｓｈＲＮＡに対して比較される。

【図２０Ｅ】哺乳動物コドン最適化Ｃａｓ１３ｂオーソログは非常に効率的なＲＮＡノックダウンを介在する。（図２０Ａ）代表的なＣａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃ座位ならびに関連するｃｒＲＮＡの概略図。（図２０Ｂ）ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞におけるＣａｓ１３ａ切断活性を測定するためのルシフェラーゼアッセイの概略図。（図２０Ｃ）１９のＣａｓ１３ａ、１５のＣａｓ１３ｂ、及び５のＣａｓ１３ｃオーソログを有するＣｌｕｃを標的化する、２つの異なるガイドを使用するＲＮＡノックダウン効率。ルシフェラーゼ発現は、非標的化ガイド対照条件において発現に正規化される。（図２０Ｄ）パートＣにおいて実行する上位７つのオーソログは、Ｃｌｕｃを標的化する２つの異なるガイドＲＮＡを有する３つの異なるＮＬＳ及びＮＥＳタグで活性についてアッセイされる。（図２０Ｅ）Ｃａｓ１３ｂ１２及びＣａｓ１３ａ２（ＬｗＣａｓ１３ａ）は、Ｇｌｕｃ及びＣｌｕｃに対するノックダウン活性について比較される。ガイドは転写産物に沿ってタイルされ（ｔｉｌｅｄ）、Ｃａｓ１３ｂ１２とＣａｓ１３ａ２との間のガイドは位置合

わせされる。（図２０Ｆ）内因性ＫＲＡＳ転写産物に対するＣａｓ１３ａ２、Ｃａｓ１３ｂ６、Ｃａｓ１３ｂ１１、及びＣａｓ１３ｂ１２についてのガイドノックダウンであり、対応するｓｈＲＮＡに対して比較される。
【図２０Ｆ】哺乳動物コドン最適化Ｃａｓ１３ｂオーソログは非常に効率的なＲＮＡノックダウンを介在する。（図２０Ａ）代表的なＣａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃ座位ならびに関連するｃｒＲＮＡの概略図。（図２０Ｂ）ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞におけるＣａｓ１３ａ切断活性を測定するためのルシフェラーゼアッセイの概略図。（図２０Ｃ）１９のＣａｓ１３ａ、１５のＣａｓ１３ｂ、及び５のＣａｓ１３ｃオーソログを有するＣｌｕｃを標的化する、２つの異なるガイドを使用するＲＮＡノックダウン効率。ルシフェラーゼ発現は、非標的化ガイド対照条件において発現に正規化される。（図２０Ｄ）パートＣにおいて実行する上位７つのオーソログは、Ｃｌｕｃを標的化する２つの異なるガイドＲＮＡを有する３つの異なるＮＬＳ及びＮＥＳタグで活性についてアッセイされる。（図２０Ｅ）Ｃａｓ１３ｂ１２及びＣａｓ１３ａ２（ＬｗＣａｓ１３ａ）は、Ｇｌｕｃ及びＣｌｕｃに対するノックダウン活性について比較される。ガイドは転写産物に沿ってタイルされ（ｔｉｌｅｄ）、Ｃａｓ１３ｂ１２とＣａｓ１３ａ２との間のガイドは位置合わせされる。（図２０Ｆ）内因性ＫＲＡＳ転写産物に対するＣａｓ１３ａ２、Ｃａｓ１３ｂ６、Ｃａｓ１３ｂ１１、及びＣａｓ１３ｂ１２についてのガイドノックダウンであり、対応するｓｈＲＮＡに対して比較される。
【００６５】
【図２１Ａ－１】Ｃａｓ１３酵素は、哺乳動物細胞において特異的ＲＮＡノックダウンを介在する。（図２１Ａ）Ｃａｓ１３ａ／ｂミスマッチ特異性試験についての半変性標的配列の概略図。（配列番号６７３～６９４）（図２１Ｂ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂについての一重ミスマッチノックダウンデータのヒートマップ。ノックダウンは、各酵素について非標的化（ＮＴ）ガイドに正規化される。（図２１Ｃ）Ｃａｓ１３ａについての二重ミスマッチノックダウンデータ。各ミスマッチの位置は、Ｘ軸及びＹ軸上に示される。ノックダウンデータは、位置の所定のセットについての全ての二重ミスマッチの和である。データは、各酵素についてＮＴガイドに正規化される。（図２１Ｄ）Ｃａｓ１３ｂについての二重ミスマッチノックダウンデータ。説明についてはＣを参照されたい。（図２１Ｅ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂについてのトランスクリプトーム全体の特異性と位置合わせされたガイドについてのｓｈＲＮＡとを比較するＲＮＡ－ｓｅｑデータ。Ｙ軸は標的条件についての読み取り計数を表し、Ｘ軸は非標的化条件についての計数を表す。（図２１Ｆ）Ｃａｓ１３ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについてのＲＮＡ－ｓｅｑデータから計算されるＲＮＡ発現。（図２１Ｇ）ＲＮＡ－ｓｅｑデータからの Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについての有意なオフターゲット。ＦＤＲ＜０．０５を使用して有意なオフターゲットを計算した。
【図２１Ａ－２】Ｃａｓ１３酵素は、哺乳動物細胞において特異的ＲＮＡノックダウンを介在する。（図２１Ａ）Ｃａｓ１３ａ／ｂミスマッチ特異性試験についての半変性標的配列の概略図。（配列番号６７３～６９４）（図２１Ｂ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂについての一重ミスマッチノックダウンデータのヒートマップ。ノックダウンは、各酵素について非標的化（ＮＴ）ガイドに正規化される。（図２１Ｃ）Ｃａｓ１３ａについての二重ミスマッチノックダウンデータ。各ミスマッチの位置は、Ｘ軸及びＹ軸上に示される。ノックダウンデータは、位置の所定のセットについての全ての二重ミスマッチの和である。データは、各酵素についてＮＴガイドに正規化される。（図２１Ｄ）Ｃａｓ１３ｂについての二重ミスマッチノックダウンデータ。説明についてはＣを参照されたい。（図２１Ｅ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂについてのトランスクリプトーム全体の特異性と位置合わせされたガイドについてのｓｈＲＮＡとを比較するＲＮＡ－ｓｅｑデータ。Ｙ軸は標的条件についての読み取り計数を表し、Ｘ軸は非標的化条件についての計数を表す。（図２１Ｆ）Ｃａｓ１３ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについてのＲＮＡ－ｓｅｑデータから計算されるＲＮＡ発現。（図２１Ｇ）ＲＮＡ－ｓｅｑデータからの Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについての有意なオフターゲット。ＦＤＲ＜０．０５を使用して有意なオフターゲットを計算した。
【図２１Ｂ】Ｃａｓ１３酵素は、哺乳動物細胞において特異的ＲＮＡノックダウンを介在

する。（図２１Ａ）Ｃａｓ１３ａ／ｂミスマッチ特異性試験についての半変性標的配列の概略図。（配列番号６７３～６９４）（図２１Ｂ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂについての一重ミスマッチノックダウンデータのヒートマップ。ノックダウンは、各酵素について非標的化（ＮＴ）ガイドに正規化される。（図２１Ｃ）Ｃａｓ１３ａについての二重ミスマッチノックダウンデータ。各ミスマッチの位置は、Ｘ軸及びＹ軸上に示される。ノックダウンデータは、位置の所定のセットについての全ての二重ミスマッチの和である。データは、各酵素についてＮＴガイドに正規化される。（図２１Ｄ）Ｃａｓ１３ｂについての二重ミスマッチノックダウンデータ。説明についてはＣを参照されたい。（図２１Ｅ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂについてのトランスクリプトーム全体の特異性と位置合わせされたガイドについてのｓｈＲＮＡとを比較するＲＮＡ－ｓｅｑデータ。Ｙ軸は標的条件についての読み取り計数を表し、Ｘ軸は非標的化条件についての計数を表す。（図２１Ｆ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについてのＲＮＡ－ｓｅｑデータから計算されるＲＮＡ発現。（図２１Ｇ）ＲＮＡ－ｓｅｑデータからのＣａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについての有意なオフターゲット。ＦＤＲ＜０．０５を使用して有意なオフターゲットを計算した。

【図２１Ｃ】Ｃａｓ１３酵素は、哺乳動物細胞において特異的ＲＮＡノックダウンを介在する。（図２１Ａ）Ｃａｓ１３ａ／ｂミスマッチ特異性試験についての半変性標的配列の概略図。（配列番号６７３～６９４）（図２１Ｂ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂについての一重ミスマッチノックダウンデータのヒートマップ。ノックダウンは、各酵素について非標的化（ＮＴ）ガイドに正規化される。（図２１Ｃ）Ｃａｓ１３ａについての二重ミスマッチノックダウンデータ。各ミスマッチの位置は、Ｘ軸及びＹ軸上に示される。ノックダウンデータは、位置の所定のセットについての全ての二重ミスマッチの和である。データは、各酵素についてＮＴガイドに正規化される。（図２１Ｄ）Ｃａｓ１３ｂについての二重ミスマッチノックダウンデータ。説明についてはＣを参照されたい。（図２１Ｅ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂについてのトランスクリプトーム全体の特異性と位置合わせされたガイドについてのｓｈＲＮＡとを比較するＲＮＡ－ｓｅｑデータ。Ｙ軸は標的条件についての読み取り計数を表し、Ｘ軸は非標的化条件についての計数を表す。（図２１Ｆ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについてのＲＮＡ－ｓｅｑデータから計算されるＲＮＡ発現。（図２１Ｇ）ＲＮＡ－ｓｅｑデータからのＣａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについての有意なオフターゲット。ＦＤＲ＜０．０５を使用して有意なオフターゲットを計算した。

【図２１Ｄ】Ｃａｓ１３酵素は、哺乳動物細胞において特異的ＲＮＡノックダウンを介在する。（図２１Ａ）Ｃａｓ１３ａ／ｂミスマッチ特異性試験についての半変性標的配列の概略図。（配列番号６７３～６９４）（図２１Ｂ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂについての一重ミスマッチノックダウンデータのヒートマップ。ノックダウンは、各酵素について非標的化（ＮＴ）ガイドに正規化される。（図２１Ｃ）Ｃａｓ１３ａについての二重ミスマッチノックダウンデータ。各ミスマッチの位置は、Ｘ軸及びＹ軸上に示される。ノックダウンデータは、位置の所定のセットについての全ての二重ミスマッチの和である。データは、各酵素についてＮＴガイドに正規化される。（図２１Ｄ）Ｃａｓ１３ｂについての二重ミスマッチノックダウンデータ。説明についてはＣを参照されたい。（図２１Ｅ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂについてのトランスクリプトーム全体の特異性と位置合わせされたガイドについてのｓｈＲＮＡとを比較するＲＮＡ－ｓｅｑデータ。Ｙ軸は標的条件についての読み取り計数を表し、Ｘ軸は非標的化条件についての計数を表す。（図２１Ｆ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについてのＲＮＡ－ｓｅｑデータから計算されるＲＮＡ発現。（図２１Ｇ）ＲＮＡ－ｓｅｑデータからのＣａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについての有意なオフターゲット。ＦＤＲ＜０．０５を使用して有意なオフターゲットを計算した。

【図２１Ｅ】Ｃａｓ１３酵素は、哺乳動物細胞において特異的ＲＮＡノックダウンを介在する。（図２１Ａ）Ｃａｓ１３ａ／ｂミスマッチ特異性試験についての半変性標的配列の概略図。（配列番号６７３～６９４）（図２１Ｂ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂについての一重ミスマッチノックダウンデータのヒートマップ。ノックダウンは、各酵素について非標的化（ＮＴ）ガイドに正規化される。（図２１Ｃ）Ｃａｓ１３ａについての二重ミスマッチノックダウンデータ。各ミスマッチの位置は、Ｘ軸及びＹ軸上に示される。ノックダウンデ

ータは、位置の所定のセットについての全ての二重ミスマッチの和である。データは、各酵素についてＮＴガイドに正規化される。（図２１Ｄ）Ｃａｓ１３ｂについての二重ミスマッチノックダウンデータ。説明についてはＣを参照されたい。（図２１Ｅ）Ｃａｓ１３ａ／ｂについてのトランスクリプトーム全体の特異性と位置合わせされたガイドについてのｓｈＲＮＡとを比較するＲＮＡ－ｓｅｑデータ。Ｙ軸は標的条件についての読み取り計数を表し、Ｘ軸は非標的化条件についての計数を表す。（図２１Ｆ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについてのＲＮＡ－ｓｅｑデータから計算されるＲＮＡ発現。（図２１Ｇ）ＲＮＡ－ｓｅｑデータからの Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについての有意なオフターゲット。ＦＤＲ＜０．０５を使用して有意なオフターゲットを計算した。

【図２１Ｆ】Ｃａｓ１３酵素は、哺乳動物細胞において特異的ＲＮＡノックダウンを介在する。（図２１Ａ）Ｃａｓ１３ａ／ｂミスマッチ特異性試験についての半変性標的配列の概略図。（配列番号６７３～６９４）（図２１Ｂ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂについての一重ミスマッチノックダウンデータのヒートマップ。ノックダウンは、各酵素について非標的化（ＮＴ）ガイドに正規化される。（図２１Ｃ）Ｃａｓ１３ａについての二重ミスマッチノックダウンデータ。各ミスマッチの位置は、Ｘ軸及びＹ軸上に示される。ノックダウンデータは、位置の所定のセットについての全ての二重ミスマッチの和である。データは、各酵素についてＮＴガイドに正規化される。（図２１Ｄ）Ｃａｓ１３ｂについての二重ミスマッチノックダウンデータ。説明についてはＣを参照されたい。（図２１Ｅ）Ｃａｓ１３ａ／ｂについてのトランスクリプトーム全体の特異性と位置合わせされたガイドについてのｓｈＲＮＡとを比較するＲＮＡ－ｓｅｑデータ。Ｙ軸は標的条件についての読み取り計数を表し、Ｘ軸は非標的化条件についての計数を表す。（図２１Ｆ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについてのＲＮＡ－ｓｅｑデータから計算されるＲＮＡ発現。（図２１Ｇ）ＲＮＡ－ｓｅｑデータからの Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについての有意なオフターゲット。ＦＤＲ＜０．０５を使用して有意なオフターゲットを計算した。

【図２１Ｇ】Ｃａｓ１３酵素は、哺乳動物細胞において特異的ＲＮＡノックダウンを介在する。（図２１Ａ）Ｃａｓ１３ａ／ｂミスマッチ特異性試験についての半変性標的配列の概略図。（配列番号６７３～６９４）（図２１Ｂ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂについての一重ミスマッチノックダウンデータのヒートマップ。ノックダウンは、各酵素について非標的化（ＮＴ）ガイドに正規化される。（図２１Ｃ）Ｃａｓ１３ａについての二重ミスマッチノックダウンデータ。各ミスマッチの位置は、Ｘ軸及びＹ軸上に示される。ノックダウンデータは、位置の所定のセットについての全ての二重ミスマッチの和である。データは、各酵素についてＮＴガイドに正規化される。（図２１Ｄ）Ｃａｓ１３ｂについての二重ミスマッチノックダウンデータ。説明についてはＣを参照されたい。（図２１Ｅ）Ｃａｓ１３ａ／ｂについてのトランスクリプトーム全体の特異性と位置合わせされたガイドについてのｓｈＲＮＡとを比較するＲＮＡ－ｓｅｑデータ。Ｙ軸は標的条件についての読み取り計数を表し、Ｘ軸は非標的化条件についての計数を表す。（図２１Ｆ）Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについてのＲＮＡ－ｓｅｑデータから計算されるＲＮＡ発現。（図２１Ｇ）ＲＮＡ－ｓｅｑデータからの Ｃａｓ１３　ａ／ｂ及びｓｈＲＮＡについての有意なオフターゲット。ＦＤＲ＜０．０５を使用して有意なオフターゲットを計算した。

【００６６】

【図２２Ａ】触媒的に不活性なＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合は、哺乳動物細胞における標的化されたＲＮＡ編集を可能にする。（図２２Ａ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の終止コドンを除去するためのＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質でのＲＮＡ編集の概略図。（図２２Ｂ）複数のガイド位置について、野生型ＡＤＡＲ２と融合したＣａｓ１３ｂと、活性化型ＡＤＡＲ２　Ｅ４８８Ｑ変異体と融合したＣａｓ１３ｂとのＲＮＡ編集比較。ルシフェラーゼ発現は、Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼ対照値に正規化される。（図２２Ｃ）編集部位を取り巻く様々な位置を標的化するように設計された３０、５０、７０、及び８４ｎｔガイド間のＲＮＡ編集比較。（図２２Ｄ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の終止コドンに対するシークエンシング定量化のために使用されるガイドの位置及び長さを示す概略図。（配列番号６９５）（図２２Ｅ）シークエンシ

ングによって定量化される、Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の対応するアデニン塩基での各ガイド設計についてのオンターゲット及びオフターゲット編集効率。（図２２Ｆ）標的化されたアデニンと反対側に様々な塩基を有するガイドのルシフェラーゼ読み出し。

【図２２Ｂ】触媒的に不活性なＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合は、哺乳動物細胞における標的化されたＲＮＡ編集を可能にする。（図２２Ａ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の終止コドンを除去するためのＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質でのＲＮＡ編集の概略図。（図２２Ｂ）複数のガイド位置について、野生型ＡＤＡＲ２と融合したＣａｓ１３ｂと、活性化型ＡＤＡＲ２　Ｅ４８８Ｑ変異体と融合したＣａｓ１３ｂとのＲＮＡ編集比較。ルシフェラーゼ発現は、Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼ対照値に正規化される。（図２２Ｃ）編集部位を取り巻く様々な位置を標的化するように設計された３０、５０、７０、及び８４ｎｔガイド間のＲＮＡ編集比較。（図２２Ｄ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の終止コドンに対するシークエンシング定量化のために使用されるガイドの位置及び長さを示す概略図。（配列番号６９５）（図２２Ｅ）シークエンシングによって定量化される、Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の対応するアデニン塩基での各ガイド設計についてのオンターゲット及びオフターゲット編集効率。（図２２Ｆ）標的化されたアデニンと反対側に様々な塩基を有するガイドのルシフェラーゼ読み出し。

【図２２Ｃ】触媒的に不活性なＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合は、哺乳動物細胞における標的化されたＲＮＡ編集を可能にする。（図２２Ａ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の終止コドンを除去するためのＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質でのＲＮＡ編集の概略図。（図２２Ｂ）複数のガイド位置について、野生型ＡＤＡＲ２と融合したＣａｓ１３ｂと、活性化型ＡＤＡＲ２　Ｅ４８８Ｑ変異体と融合したＣａｓ１３ｂとのＲＮＡ編集比較。ルシフェラーゼ発現は、Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼ対照値に正規化される。（図２２Ｃ）編集部位を取り巻く様々な位置を標的化するように設計された３０、５０、７０、及び８４ｎｔガイド間のＲＮＡ編集比較。（図２２Ｄ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の終止コドンに対するシークエンシング定量化のために使用されるガイドの位置及び長さを示す概略図。（配列番号６９５）（図２２Ｅ）シークエンシングによって定量化される、Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の対応するアデニン塩基での各ガイド設計についてのオンターゲット及びオフターゲット編集効率。（図２２Ｆ）標的化されたアデニンと反対側に様々な塩基を有するガイドのルシフェラーゼ読み出し。

【図２２Ｄ】触媒的に不活性なＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合は、哺乳動物細胞における標的化されたＲＮＡ編集を可能にする。（図２２Ａ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の終止コドンを除去するためのＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質でのＲＮＡ編集の概略図。（図２２Ｂ）複数のガイド位置について、野生型ＡＤＡＲ２と融合したＣａｓ１３ｂと、活性化型ＡＤＡＲ２　Ｅ４８８Ｑ変異体と融合したＣａｓ１３ｂとのＲＮＡ編集比較。ルシフェラーゼ発現は、Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼ対照値に正規化される。（図２２Ｃ）編集部位を取り巻く様々な位置を標的化するように設計された３０、５０、７０、及び８４ｎｔガイド間のＲＮＡ編集比較。（図２２Ｄ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の終止コドンに対するシークエンシング定量化のために使用されるガイドの位置及び長さを示す概略図。（配列番号６９５）（図２２Ｅ）シークエンシングによって定量化される、Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の対応するアデニン塩基での各ガイド設計についてのオンターゲット及びオフターゲット編集効率。（図２２Ｆ）標的化されたアデニンと反対側に様々な塩基を有するガイドのルシフェラーゼ読み出し。

【図２２Ｅ】触媒的に不活性なＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合は、哺乳動物細胞における標的化されたＲＮＡ編集を可能にする。（図２２Ａ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の終止コドンを除去するためのＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質でのＲＮＡ編集の概略図。（図２２Ｂ）複数のガイド位置について、野生型ＡＤＡＲ２と融合した

Ｃａｓ１３ｂと、活性化型ＡＤＡＲ２　Ｅ４８８Ｑ変異体と融合したＣａｓ１３ｂとのＲＮＡ編集比較。ルシフェラーゼ発現は、Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼ対照値に正規化される。（図２２Ｃ）編集部位を取り巻く様々な位置を標的化するように設計された３０、５０、７０、及び８４ｎｔガイド間のＲＮＡ編集比較。（図２２Ｄ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の終止コドンに対するシークエンシング定量化のために使用されるガイドの位置及び長さを示す概略図。（配列番号６９５）（図２２Ｅ）シークエンシングによって定量化される、Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の対応するアデニン塩基での各ガイド設計についてのオンターゲット及びオフターゲット編集効率。（図２２Ｆ）標的化されたアデニンと反対側に様々な塩基を有するガイドのルシフェラーゼ読み出し。

【図２２Ｆ】触媒的に不活性なＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合は、哺乳動物細胞における標的化されたＲＮＡ編集を可能にする。（図２２Ａ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の終止コドンを除去するためのＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質でのＲＮＡ編集の概略図。（図２２Ｂ）複数のガイド位置について、野生型ＡＤＡＲ２と融合したＣａｓ１３ｂと、活性化型ＡＤＡＲ２　Ｅ４８８Ｑ変異体と融合したＣａｓ１３ｂとのＲＮＡ編集比較。ルシフェラーゼ発現は、Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼ対照値に正規化される。（図２２Ｃ）編集部位を取り巻く様々な位置を標的化するように設計された３０、５０、７０、及び８４ｎｔガイド間のＲＮＡ編集比較。（図２２Ｄ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の終止コドンに対するシークエンシング定量化のために使用されるガイドの位置及び長さを示す概略図。（配列番号６９５）（図２２Ｅ）シークエンシングによって定量化される、Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物上の対応するアデニン塩基での各ガイド設計についてのオンターゲット及びオフターゲット編集効率。（図２２Ｆ）標的化されたアデニンと反対側に様々な塩基を有するガイドのルシフェラーゼ読み出し。

【００６７】

【図２３】Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合を伴う内因性ＲＮＡ編集。内因性ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ座位の内因性Ｃａ１３ｂ１２－ＡＤＡＲ編集の次世代シークエンシング転写産物当たり２つの異なる領域を標的化し、Ａ－＞Ｇ編集を標的化されたアデニン付近における全てのアデニンで定量化した。Ａ５４９細胞におけるＳＴＫ１１転写産物におけるプレ終結部位は、Ｃａｓ１３ｂ１２－ＡＤＡＲで標的化し、ＳＴＫ１１タンパク質の発現を回復する。

【００６８】

【図２４】最適なガイド位置を決定するための戦略。

【００６９】

【図２５Ａ】（図２５Ａ）Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ２は、変異されたルシフェラーゼ転写産物の修復を促進する。（図２５Ｂ）Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ１は、変異されたルシフェラーゼ転写産物の修復を促進する。（図２５Ｃ）ヒトＡＤＡＲ１とヒトＡＤＡＲ２との比較。

【図２５Ｂ】（図２５Ａ）Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ２は、変異されたルシフェラーゼ転写産物の修復を促進する。（図２５Ｂ）Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ１は、変異されたルシフェラーゼ転写産物の修復を促進する。（図２５Ｃ）ヒトＡＤＡＲ１とヒトＡＤＡＲ２との比較。

【図２５Ｃ】（図２５Ａ）Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ２は、変異されたルシフェラーゼ転写産物の修復を促進する。（図２５Ｂ）Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ１は、変異されたルシフェラーゼ転写産物の修復を促進する。（図２５Ｃ）ヒトＡＤＡＲ１とヒトＡＤＡＲ２との比較。

【００７０】

【図２６】Ｅ４８８Ｑ対野生型ｄＡＤＡＲ２編集の比較。Ｅ４８８Ｑは、ｄＡＤＡＲ２の活性化型変異体である。

【００７１】

【図２７Ａ】Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ２－Ｅ４８８Ｑによって標的化される転写産物は、期待されるＡ－Ｇ編集を含有する。（図２７Ａ）ヒートマップ。（図２７Ｂ）テンプレートにおける位置。Ａ部位のみが、ヒートマップにおけるようにＧに対する編集率と共に示される。
【図２７Ｂ】Ｃａｓ１３ｂ－ｈｕＡＤＡＲ２－Ｅ４８８Ｑによって標的化される転写産物は、期待されるＡ－Ｇ編集を含有する。（図２７Ａ）ヒートマップ。（図２７Ｂ）テンプレートにおける位置。Ａ部位のみが、ヒートマップにおけるようにＧに対する編集率と共に示される。
【００７２】
【図２８Ａ】ガイドの内因性タイリング。（図２８Ａ）ＫＲＡＳ：ヒートマップ。（上）テンプレートにおける位置（下）。Ａ部位のみが、ヒートマップにおけるようにＧに対する編集率と共に示される。（図２８Ｂ）ＰＰＩＢ：ヒートマップ。（上）テンプレートにおける位置（下）。Ａ部位のみが、ヒートマップにおけるようにＧに対する編集率と共に示される。
【図２８Ｂ】ガイドの内因性タイリング。（図２８Ａ）ＫＲＡＳ：ヒートマップ。（上）テンプレートにおける位置（下）。Ａ部位のみが、ヒートマップにおけるようにＧに対する編集率と共に示される。（図２８Ｂ）ＰＰＩＢ：ヒートマップ。（上）テンプレートにおける位置（下）。Ａ部位のみが、ヒートマップにおけるようにＧに対する編集率と共に示される。
【００７３】
【図２９】非標的化編集。
【００７４】
【図３０】リンカー最適化。
【００７５】
【図３１】Ｃａｓ１３ｂ　ＡＤＡＲは、発現したｃＤＮＡにおける患者からの病原性Ａ＞Ｇ変異を矯正するために使用され得る。
【００７６】
【図３２】Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲは、５’Ｇモチーフにわずかな制限を有する。
【００７７】
【図３３Ａ】編集効率に対する効果についての退化したＰＦＳ位置のスクリーニング。全てのＰＦＳ（４－Ｎ）アイデンティティは、非標的化よりも高い編集を有する。パネルＡにおける配列番号６９７、６９８、６９９、及び７０３を示す。
【図３３Ｂ】編集効率に対する効果についての退化したＰＦＳ位置のスクリーニング。全てのＰＦＳ（４－Ｎ）アイデンティティは、非標的化よりも高い編集を有する。パネルＡにおける配列番号６９７、６９８、６９９、及び７０３を示す。
【図３３Ｃ】編集効率に対する効果についての退化したＰＦＳ位置のスクリーニング。全てのＰＦＳ（４－Ｎ）アイデンティティは、非標的化よりも高い編集を有する。パネルＡにおける配列番号６９７、６９８、６９９、及び７０３を示す。
【図３３Ｄ】編集効率に対する効果についての退化したＰＦＳ位置のスクリーニング。全てのＰＦＳ（４－Ｎ）アイデンティティは、非標的化よりも高い編集を有する。パネルＡにおける配列番号６９７、６９８、６９９、及び７０３を示す。
【００７８】
【図３４】標的転写産物におけるオフターゲット編集の低減。
【００７９】
【図３５】標的転写産物におけるオフターゲット編集の低減。
【００８０】
【図３６Ａ】Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲトランスクリプトーム特異性。オンターゲット編集は、７１％である。（図３６Ａ）標的化ガイド、４８２の有意な部位。（図３６Ｂ）非標的化ガイド、９４９の有意な部位。染色体０がＧｌｕｃであり染色体１がＣｌｕｃであることに注目されたい。そして、ヒト染色体はその後の順番にある。

【図３６Ｂ】Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲトランスクリプトーム特異性。オンターゲット編集は、７１％である。（図３６Ａ）標的化ガイド、４８２の有意な部位。（図３６Ｂ）非標的化ガイド、９４９の有意な部位。染色体０がＧｌｕｃであり染色体１がＣｌｕｃであることに注目されたい。そして、ヒト染色体はその後の順番にある。
【００８１】
【図３７Ａ】Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲトランスクリプトーム特異性。（図３７Ａ）標的化ガイド。（図３７Ｂ）非標的化ガイド。
【図３７Ｂ】Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲトランスクリプトーム特異性。（図３７Ａ）標的化ガイド。（図３７Ｂ）非標的化ガイド。
【００８２】
【図３８】Ｃａｓ１３ｂは、競合するＡＤＡＲ編集戦略と比較して最高の効率を有する。
【００８３】
【図３９Ａ】競合するＲＮＡ編集システム。（Ａ－Ｂ）ＢｏｘＢ。オンターゲット編集は６３％である。（図３９Ａ）標的化ガイド－２０２０の有意な部位。（図３９Ｂ）非標的化ガイド－１８０５の有意な部位。（図３９Ｃ～図３９Ｄ）Ｓｔａｆｆｏｒｓｔ。オンターゲット編集は３６％である。（図３９Ｃ）標的化ガイド－１７６の有意な部位。（図３９Ｄ）非標的化ガイド－１８６の有意な部位。
【図３９Ｂ】競合するＲＮＡ編集システム。（Ａ－Ｂ）ＢｏｘＢ。オンターゲット編集は６３％である。（図３９Ａ）標的化ガイド－２０２０の有意な部位。（図３９Ｂ）非標的化ガイド－１８０５の有意な部位。（図３９Ｃ～図３９Ｄ）Ｓｔａｆｆｏｒｓｔ。オンターゲット編集は３６％である。（図３９Ｃ）標的化ガイド－１７６の有意な部位。（図３９Ｄ）非標的化ガイド－１８６の有意な部位。
【図３９Ｃ】競合するＲＮＡ編集システム。（Ａ－Ｂ）ＢｏｘＢ。オンターゲット編集は６３％である。（図３９Ａ）標的化ガイド－２０２０の有意な部位。（図３９Ｂ）非標的化ガイド－１８０５の有意な部位。（図３９Ｃ～図３９Ｄ）Ｓｔａｆｆｏｒｓｔ。オンターゲット編集は３６％である。（図３９Ｃ）標的化ガイド－１７６の有意な部位。（図３９Ｄ）非標的化ガイド－１８６の有意な部位。
【図３９Ｄ】競合するＲＮＡ編集システム。（Ａ－Ｂ）ＢｏｘＢ。オンターゲット編集は６３％である。（図３９Ａ）標的化ガイド－２０２０の有意な部位。（図３９Ｂ）非標的化ガイド－１８０５の有意な部位。（図３９Ｃ～図３９Ｄ）Ｓｔａｆｆｏｒｓｔ。オンターゲット編集は３６％である。（図３９Ｃ）標的化ガイド－１７６の有意な部位。（図３９Ｄ）非標的化ガイド－１８６の有意な部位。
【００８４】
【図４０】ＡＤＡＲの用量設定。ｃｒＲＮＡ量は一定である。
【００８５】
【図４１Ａ】特異性に対する用量応答効果。（図４１Ａ～図４１Ｂ）１５０ｎｇ　Ｃａｓ１３－ＡＤＡＲ。オンターゲット編集は８３％である。（図４１Ａ）標的化ガイド－１２３１の有意な部位。（図４１Ｂ）非標的化ガイド－５２０の有意な部位。（図４１Ｃ～図４１Ｄ）１０ｎｇ　Ｃａｓ１３－ＡＤＡＲ。オンターゲット編集は８０％である。（図４１Ｃ）標的化ガイド－３４７の有意な部位。（図４１Ｄ）非標的化ガイド－２２３の有意な部位。
【図４１Ｂ】特異性に対する用量応答効果。（図４１Ａ～図４１Ｂ）１５０ｎｇ　Ｃａｓ１３－ＡＤＡＲ。オンターゲット編集は８３％である。（図４１Ａ）標的化ガイド－１２３１の有意な部位。（図４１Ｂ）非標的化ガイド－５２０の有意な部位。（図４１Ｃ～図４１Ｄ）１０ｎｇ　Ｃａｓ１３－ＡＤＡＲ。オンターゲット編集は８０％である。（図４１Ｃ）標的化ガイド－３４７の有意な部位。（図４１Ｄ）非標的化ガイド－２２３の有意な部位。
【図４１Ｃ】特異性に対する用量応答効果。（図４１Ａ～図４１Ｂ）１５０ｎｇ　Ｃａｓ１３－ＡＤＡＲ。オンターゲット編集は８３％である。（図４１Ａ）標的化ガイド－１２３１の有意な部位。（図４１Ｂ）非標的化ガイド－５２０の有意な部位。（図４１Ｃ～図

４１Ｄ）１０ｎｇ　Ｃａｓ１３－ＡＤＡＲ。オンターゲット編集は８０％である。（図４１Ｃ）標的化ガイド－３４７の有意な部位。（図４１Ｄ）非標的化ガイド－２２３の有意な部位。

【図４１Ｄ】特異性に対する用量応答効果。（図４１Ａ～図４１Ｂ）１５０ｎｇ　Ｃａｓ１３－ＡＤＡＲ。オンターゲット編集は８３％である。（図４１Ａ）標的化ガイド－１２３１の有意な部位。（図４１Ｂ）非標的化ガイド－５２０の有意な部位。（図４１Ｃ～図４１Ｄ）１０ｎｇ　Ｃａｓ１３－ＡＤＡＲ。オンターゲット編集は８０％である。（図４１Ｃ）標的化ガイド－３４７の有意な部位。（図４１Ｄ）非標的化ガイド－２２３の有意な部位。

【００８６】

【図４２Ａ】ＡＤＡＲ１は、ＡＤＡＲ２よりも特異的であるようである。オンターゲット編集は、２９％である。（図４２Ａ）標的化ガイド。１１の有意な部位。（図４２Ｂ）非標的化ガイド。６の有意な部位。染色体０がＧｌｕｃであり染色体１がＣｌｕｃであることに注目されたい。そして、ヒト染色体はその後の順番にある。

【図４２Ｂ】ＡＤＡＲ１は、ＡＤＡＲ２よりも特異的であるようである。オンターゲット編集は、２９％である。（図４２Ａ）標的化ガイド。１１の有意な部位。（図４２Ｂ）非標的化ガイド。６の有意な部位。染色体０がＧｌｕｃであり染色体１がＣｌｕｃであることに注目されたい。そして、ヒト染色体はその後の順番にある。

【００８７】

【図４３Ａ】ＡＤＡＲ特異性変異体は、増強した特異性を有する。（図４３Ａ）標的化ガイド。（図４３Ｂ）非標的化ガイド。（図４３Ｃ）非標的化に対する標的化の比。（図４３Ｄ）標的化及び非標的化ガイド。

【図４３Ｂ】ＡＤＡＲ特異性変異体は、増強した特異性を有する。（図４３Ａ）標的化ガイド。（図４３Ｂ）非標的化ガイド。（図４３Ｃ）非標的化に対する標的化の比。（図４３Ｄ）標的化及び非標的化ガイド。

【図４３Ｃ】ＡＤＡＲ特異性変異体は、増強した特異性を有する。（図４３Ａ）標的化ガイド。（図４３Ｂ）非標的化ガイド。（図４３Ｃ）非標的化に対する標的化の比。（図４３Ｄ）標的化及び非標的化ガイド。

【図４３Ｄ】ＡＤＡＲ特異性変異体は、増強した特異性を有する。（図４３Ａ）標的化ガイド。（図４３Ｂ）非標的化ガイド。（図４３Ｃ）非標的化に対する標的化の比。（図４３Ｄ）標的化及び非標的化ガイド。

【００８８】

【図４４】ＲＮＡ標的との各残基の接触点に沿ってプロットされたＡＤＡＲ変異体ルシフェラーゼ結果。配列番号７０４及び７３５が示される。

【００８９】

【図４５】ＡＤＡＲ特異性変異体は、増強された特異性を有する。紫色の点は、全トランスクリプトームオフターゲットＮＧＳ分析のために選択される変異体である。赤色の点は、始点（すなわち、Ｅ４８８Ｑ変異体）である。全ての追加的な変異体がＥ４８８Ｑ変異も有することに注目されたい。

【００９０】

【図４６Ａ】ＡＤＡＲ変異体は、ＮＧＳに従ってより特異的である。（図４６Ａ）オンターゲット。（図４６Ｂ）オフターゲット。

【図４６Ｂ】ＡＤＡＲ変異体は、ＮＧＳに従ってより特異的である。（図４６Ａ）オンターゲット。（図４６Ｂ）オフターゲット。

【００９１】

【図４７Ａ】ＡＤＡＲ特異性変異体に関するルシフェラーゼデータは、ＮＧＳにマッチする。（図４７Ａ）ＮＧＳのために選択された標的化ガイド。（図４７Ｂ）ＮＧＳのために選択された非標的化ガイド。ルシフェラーゼデータは、図４６Ａ～４６ＢにおけるＮＧＳデータにマッチする。非標的化ガイドを伴うより少ない活性を有するオーソログは、トランスクリプトームにわたってより少ないオフターゲットを有し、それらのオンターゲット

編集効率は、標的化ガイドルシフェラーゼ条件によって予測され得る。
【図４７Ｂ】ＡＤＡＲ特異性変異体に関するルシフェラーゼデータは、ＮＧＳにマッチする。（図４７Ａ）ＮＧＳのために選択された標的化ガイド。（図４７Ｂ）ＮＧＳのために選択された非標的化ガイド。ルシフェラーゼデータは、図４６Ａ～４６ＢにおけるＮＧＳデータにマッチする。非標的化ガイドを伴うより少ない活性を有するオーソログは、トランスクリプトームにわたってより少ないオフターゲットを有し、それらのオンターゲット編集効率は、標的化ガイドルシフェラーゼ条件によって予測され得る。
【００９２】
【図４８Ａ】Ｃａｓ１３ｂ　１２のＣ末端トランケーションは、ＡＤＡＲ編集において依然として高活性である。
【図４８Ｂ】Ｃａｓ１３ｂ　１２のＣ末端トランケーションは、ＡＤＡＲ編集において依然として高活性である。
【図４８Ｃ】Ｃａｓ１３ｂ　１２のＣ末端トランケーションは、ＡＤＡＲ編集において依然として高活性である。
【００９３】
【図４９Ａ】ＲＮＡノックダウンのための高活性なＣａｓ１３ｂオーソログの特徴付け図４９Ａ）ステレオタイプなＣａｓ１３座位及び対応するｃｒＲＮＡ構造の概略図。図４９Ｂ）２つの異なるガイドを使用するルシフェラーゼノックダウンのための１９のＣａｓ１３ａ、１５のＣａｓ１３ｂ、及び７のＣａｓ１３ｃオーソログの評価。両方のガイドを使用する効率的なノックダウンを伴うオーソログは、宿主生物名で標識される。図４９Ｃ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｇｌｕｃに対するタイリングガイド及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。図４９Ｄ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｃｌｕｃに対するタイリングガイド及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。図４９Ｅ）ＬｗａＣａｓ１３ａ（赤）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリにおいて検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（百万当たりの転写産物（ＴＰＭ））値における発現レベル。３つの生物学的反復の平均値が示される。Ｇｌｕｃ転写データ点は、標識される。図４９Ｆ）ＰＳｐＣａｓ１３ｂ（青）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリにおいて検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（百万当たりの転写産物（ＴＰＭ））値における発現レベル。３つの生物学的反復の平均値が示される。Ｇｌｕｃ転写データ点は、標識される。図４９Ｇ）Ｅ及びＦにおけるトランスクリプトームワイド分析からのＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ、及びｓｈＲＮＡのＧｌｕｃノックダウンからの有意なオフターゲットの数。
【図４９Ｂ】ＲＮＡノックダウンのための高活性なＣａｓ１３ｂオーソログの特徴付け図４９Ａ）ステレオタイプなＣａｓ１３座位及び対応するｃｒＲＮＡ構造の概略図。図４９Ｂ）２つの異なるガイドを使用するルシフェラーゼノックダウンのための１９のＣａｓ１３ａ、１５のＣａｓ１３ｂ、及び７のＣａｓ１３ｃオーソログの評価。両方のガイドを使用する効率的なノックダウンを伴うオーソログは、宿主生物名で標識される。図４９Ｃ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｇｌｕｃに対するタイリングガイド及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。図４９Ｄ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｃｌｕｃに対するタイリングガイド及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。図４９Ｅ）ＬｗａＣａｓ１３ａ（赤）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリにおいて検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（百万当たりの転写産物（ＴＰＭ））値における発現レベル。３つの生物学的反復の平均値が示される。Ｇｌｕｃ転写データ点は、標識される。図４９Ｆ）ＰＳｐＣａｓ１３ｂ（青）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリにおいて検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（百万当たりの転写産物（ＴＰＭ））値における発現レベル。３つの生物学的反復の平均

値が示される。Ｇｌｕｃ転写データ点は、標識される。図４９Ｇ）Ｅ及びＦにおけるトランスクリプトームワイド分析からのＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ、及びｓｈＲＮＡのＧｌｕｃノックダウンからの有意なオフターゲットの数。

【図４９Ｃ】ＲＮＡノックダウンのための高活性なＣａｓ１３ｂオーソログの特徴付け図４９Ａ）ステレオタイプなＣａｓ１３座位及び対応するｃｒＲＮＡ構造の概略図。図４９Ｂ）２つの異なるガイドを使用するルシフェラーゼノックダウンのための１９のＣａｓ１３ａ、１５のＣａｓ１３ｂ、及び７のＣａｓ１３ｃオーソログの評価。両方のガイドを使用する効率的なノックダウンを伴うオーソログは、宿主生物名で標識される。図４９Ｃ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｇｌｕｃに対するタイリングガイド及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。図４９Ｄ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｃｌｕｃに対するタイリングガイド及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。図４９Ｅ）ＬｗａＣａｓ１３ａ（赤）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリにおいて検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（百万当たりの転写産物（ＴＰＭ））値における発現レベル。３つの生物学的反復の平均値が示される。Ｇｌｕｃ転写データ点は、標識される。図４９Ｆ）ＰＳｐＣａｓ１３ｂ（青）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリにおいて検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（百万当たりの転写産物（ＴＰＭ））値における発現レベル。３つの生物学的反復の平均値が示される。Ｇｌｕｃ転写データ点は、標識される。図４９Ｇ）Ｅ及びＦにおけるトランスクリプトームワイド分析からのＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ、及びｓｈＲＮＡのＧｌｕｃノックダウンからの有意なオフターゲットの数。

【図４９Ｄ】ＲＮＡノックダウンのための高活性なＣａｓ１３ｂオーソログの特徴付け図４９Ａ）ステレオタイプなＣａｓ１３座位及び対応するｃｒＲＮＡ構造の概略図。図４９Ｂ）２つの異なるガイドを使用するルシフェラーゼノックダウンのための１９のＣａｓ１３ａ、１５のＣａｓ１３ｂ、及び７のＣａｓ１３ｃオーソログの評価。両方のガイドを使用する効率的なノックダウンを伴うオーソログは、宿主生物名で標識される。図４９Ｃ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｇｌｕｃに対するタイリングガイド及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。図４９Ｄ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｃｌｕｃに対するタイリングガイド及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。図４９Ｅ）ＬｗａＣａｓ１３ａ（赤）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリにおいて検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（百万当たりの転写産物（ＴＰＭ））値における発現レベル。３つの生物学的反復の平均値が示される。Ｇｌｕｃ転写データ点は、標識される。図４９Ｆ）ＰＳｐＣａｓ１３ｂ（青）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリにおいて検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（百万当たりの転写産物（ＴＰＭ））値における発現レベル。３つの生物学的反復の平均値が示される。Ｇｌｕｃ転写データ点は、標識される。図４９Ｇ）Ｅ及びＦにおけるトランスクリプトームワイド分析からのＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ、及びｓｈＲＮＡのＧｌｕｃノックダウンからの有意なオフターゲットの数。

【図４９Ｅ】ＲＮＡノックダウンのための高活性なＣａｓ１３ｂオーソログの特徴付け図４９Ａ）ステレオタイプなＣａｓ１３座位及び対応するｃｒＲＮＡ構造の概略図。図４９Ｂ）２つの異なるガイドを使用するルシフェラーゼノックダウンのための１９のＣａｓ１３ａ、１５のＣａｓ１３ｂ、及び７のＣａｓ１３ｃオーソログの評価。両方のガイドを使用する効率的なノックダウンを伴うオーソログは、宿主生物名で標識される。図４９Ｃ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｇｌｕｃに対するタイリングガイド及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。図４９Ｄ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｃｌｕｃに対するタイリングガイド及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。図４９Ｅ）

ＬｗａＣａｓ１３ａ（赤）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリにおいて検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（百万当たりの転写産物（ＴＰＭ））値における発現レベル。３つの生物学的反復の平均値が示される。Ｇｌｕｃ転写データ点は、標識される。図４９Ｆ）ＰＳｐＣａｓ１３ｂ（青）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリにおいて検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（百万当たりの転写産物（ＴＰＭ））値における発現レベル。３つの生物学的反復の平均値が示される。Ｇｌｕｃ転写データ点は、標識される。図４９Ｇ）Ｅ及びＦにおけるトランスクリプトームワイド分析からのＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ、及びｓｈＲＮＡのＧｌｕｃノックダウンからの有意なオフターゲットの数。

【図４９Ｆ】ＲＮＡノックダウンのための高活性なＣａｓ１３ｂオーソログの特徴付け図４９Ａ）ステレオタイプなＣａｓ１３座位及び対応するｃｒＲＮＡ構造の概略図。図４９Ｂ）２つの異なるガイドを使用するルシフェラーゼノックダウンのための１９のＣａｓ１３ａ、１５のＣａｓ１３ｂ、及び７のＣａｓ１３ｃオーソログの評価。両方のガイドを使用する効率的なノックダウンを伴うオーソログは、宿主生物名で標識される。図４９Ｃ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｇｌｕｃに対するタイリングガイド及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。図４９Ｄ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｃｌｕｃに対するタイリングガイド及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。図４９Ｅ）ＬｗａＣａｓ１３ａ（赤）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリにおいて検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（百万当たりの転写産物（ＴＰＭ））値における発現レベル。３つの生物学的反復の平均値が示される。Ｇｌｕｃ転写データ点は、標識される。図４９Ｆ）ＰＳｐＣａｓ１３ｂ（青）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリにおいて検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（百万当たりの転写産物（ＴＰＭ））値における発現レベル。３つの生物学的反復の平均値が示される。Ｇｌｕｃ転写データ点は、標識される。図４９Ｇ）Ｅ及びＦにおけるトランスクリプトームワイド分析からのＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ、及びｓｈＲＮＡのＧｌｕｃノックダウンからの有意なオフターゲットの数。

【図４９Ｇ】ＲＮＡノックダウンのための高活性なＣａｓ１３ｂオーソログの特徴付け図４９Ａ）ステレオタイプなＣａｓ１３座位及び対応するｃｒＲＮＡ構造の概略図。図４９Ｂ）２つの異なるガイドを使用するルシフェラーゼノックダウンのための１９のＣａｓ１３ａ、１５のＣａｓ１３ｂ、及び７のＣａｓ１３ｃオーソログの評価。両方のガイドを使用する効率的なノックダウンを伴うオーソログは、宿主生物名で標識される。図４９Ｃ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｇｌｕｃに対するタイリングガイド及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。図４９Ｄ）ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａのノックダウン活性は、Ｃｌｕｃに対するタイリングガイド及びルシフェラーゼ発現を測定することによって比較される。図４９Ｅ）ＬｗａＣａｓ１３ａ（赤）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリにおいて検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（百万当たりの転写産物（ＴＰＭ））値における発現レベル。３つの生物学的反復の平均値が示される。Ｇｌｕｃ転写データ点は、標識される。図４９Ｆ）ＰＳｐＣａｓ１３ｂ（青）及びｓｈＲＮＡ（黒）のＧｌｕｃ標的化条件（ｙ軸）と比較した、非標的化対照（ｘ軸）のＲＮＡ－ｓｅｑライブラリにおいて検出された全ての遺伝子のｌｏｇ２（百万当たりの転写産物（ＴＰＭ））値における発現レベル。３つの生物学的反復の平均値が示される。Ｇｌｕｃ転写データ点は、標識される。図４９Ｇ）Ｅ及びＦにおけるトランスクリプトームワイド分析からのＬｗａＣａｓ１３ａ、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ、及びｓｈＲＮＡのＧｌｕｃノックダウンからの有意なオフターゲットの数。

【００９４】

【図５０Ａ】ＲＮＡ編集のためのｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合の操作図５０Ａ）ｄＣａ

ｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質によるＲＮＡ編集の概略図。図５０Ｂ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ Ｗ８５Ｘ標的及び標的化ガイド設計の概略図。（配列番号７００及び７０１）図５０Ｃ）長さ３０、５０、７０、または８４ｎｔのタイリングガイド、Ｃａｓ１３ｂ－ｄＡＤＡＲ１（左）及びＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２－ｃｄ（右）のルシフェラーゼ活性回復の定量化。図５０Ｄ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘを標的化するための標的部位の概略図。（配列番号７０２）図５０Ｅ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘを標的化する５０ｎｔガイドのＡ－＞Ｉ編集のシークエンシング定量化。

【図５０Ｂ】ＲＮＡ編集のためのｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合の操作図５０Ａ）ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質によるＲＮＡ編集の概略図。図５０Ｂ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ Ｗ８５Ｘ標的及び標的化ガイド設計の概略図。（配列番号７００及び７０１）図５０Ｃ）長さ３０、５０、７０、または８４ｎｔのタイリングガイド、Ｃａｓ１３ｂ－ｄＡＤＡＲ１（左）及びＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２－ｃｄ（右）のルシフェラーゼ活性回復の定量化。図５０Ｄ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘを標的化するための標的部位の概略図。（配列番号７０２）図５０Ｅ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘを標的化する５０ｎｔガイドのＡ－＞Ｉ編集のシークエンシング定量化。

【図５０Ｃ】ＲＮＡ編集のためのｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合の操作図５０Ａ）ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質によるＲＮＡ編集の概略図。図５０Ｂ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ Ｗ８５Ｘ標的及び標的化ガイド設計の概略図。（配列番号７００及び７０１）図５０Ｃ）長さ３０、５０、７０、または８４ｎｔのタイリングガイド、Ｃａｓ１３ｂ－ｄＡＤＡＲ１（左）及びＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２－ｃｄ（右）のルシフェラーゼ活性回復の定量化。図５０Ｄ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘを標的化するための標的部位の概略図。（配列番号７０２）図５０Ｅ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘを標的化する５０ｎｔガイドのＡ－＞Ｉ編集のシークエンシング定量化。

【図５０Ｄ】ＲＮＡ編集のためのｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合の操作図５０Ａ）ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質によるＲＮＡ編集の概略図。図５０Ｂ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ Ｗ８５Ｘ標的及び標的化ガイド設計の概略図。（配列番号７００及び７０１）図５０Ｃ）長さ３０、５０、７０、または８４ｎｔのタイリングガイド、Ｃａｓ１３ｂ－ｄＡＤＡＲ１（左）及びＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２－ｃｄ（右）のルシフェラーゼ活性回復の定量化。図５０Ｄ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘを標的化するための標的部位の概略図。（配列番号７０２）図５０Ｅ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘを標的化する５０ｎｔガイドのＡ－＞Ｉ編集のシークエンシング定量化。

【図５０Ｅ】ＲＮＡ編集のためのｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合の操作図５０Ａ）ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合タンパク質によるＲＮＡ編集の概略図。図５０Ｂ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ Ｗ８５Ｘ標的及び標的化ガイド設計の概略図。（配列番号７００及び７０１）図５０Ｃ）長さ３０、５０、７０、または８４ｎｔのタイリングガイド、Ｃａｓ１３ｂ－ｄＡＤＡＲ１（左）及びＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２－ｃｄ（右）のルシフェラーゼ活性回復の定量化。図５０Ｄ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘを標的化するための標的部位の概略図。（配列番号７０２）図５０Ｅ）ＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼＷ８５Ｘを標的化する５０ｎｔガイドのＡ－＞Ｉ編集のシークエンシング定量化。

【００９５】

【図５１Ａ】図５１Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるＲＮＡ編集のための配列柔軟性の測定ＲＥＰＡＩＲｖ１によるＲＮＡ編集のプロトスペーサー隣接部位（ＰＦＳ）嗜好性を決定するための画面の概略図。配列番号７３７が示される。図５１Ｂ）２つの異なる編集部位での全ての４－Ｎ　ＰＦＳ組み合わせのＲＮＡ編集効率の分布。図５１Ｃ）全ての可能性のある３つの塩基モチーフにわたるＣｌｕｃ　Ｗ８５でのＲＥＰＡＩＲｖ１の編集パーセン

トの定量化。図５１Ｄ）全ての可能性のある３つの塩基モチーフについてのＣｌｕｃ　Ｗ８５でのＲＮＡ編集の５’及び３’塩基嗜好性のヒートマップ
【図５１Ｂ】図５１Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるＲＮＡ編集のための配列柔軟性の測定ＲＥＰＡＩＲｖ１によるＲＮＡ編集のプロトスペーサー隣接部位（ＰＦＳ）嗜好性を決定するための画面の概略図。配列番号７３７が示される。図５１Ｂ）２つの異なる編集部位での全ての４－Ｎ　ＰＦＳ組み合わせのＲＮＡ編集効率の分布。図５１Ｃ）全ての可能性のある３つの塩基モチーフにわたるＣｌｕｃ　Ｗ８５でのＲＥＰＡＩＲｖ１の編集パーセントの定量化。図５１Ｄ）全ての可能性のある３つの塩基モチーフについてのＣｌｕｃ　Ｗ８５でのＲＮＡ編集の５’及び３’塩基嗜好性のヒートマップ
【図５１Ｃ】図５１Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるＲＮＡ編集のための配列柔軟性の測定ＲＥＰＡＩＲｖ１によるＲＮＡ編集のプロトスペーサー隣接部位（ＰＦＳ）嗜好性を決定するための画面の概略図。配列番号７３７が示される。図５１Ｂ）２つの異なる編集部位での全ての４－Ｎ　ＰＦＳ組み合わせのＲＮＡ編集効率の分布。図５１Ｃ）全ての可能性のある３つの塩基モチーフにわたるＣｌｕｃ　Ｗ８５でのＲＥＰＡＩＲｖ１の編集パーセントの定量化。図５１Ｄ）全ての可能性のある３つの塩基モチーフについてのＣｌｕｃ　Ｗ８５でのＲＮＡ編集の５’及び３’塩基嗜好性のヒートマップ
【図５１Ｄ】図５１Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるＲＮＡ編集のための配列柔軟性の測定ＲＥＰＡＩＲｖ１によるＲＮＡ編集のプロトスペーサー隣接部位（ＰＦＳ）嗜好性を決定するための画面の概略図。配列番号７３７が示される。図５１Ｂ）２つの異なる編集部位での全ての４－Ｎ　ＰＦＳ組み合わせのＲＮＡ編集効率の分布。図５１Ｃ）全ての可能性のある３つの塩基モチーフにわたるＣｌｕｃ　Ｗ８５でのＲＥＰＡＩＲｖ１の編集パーセントの定量化。図５１Ｄ）全ての可能性のある３つの塩基モチーフについてのＣｌｕｃ　Ｗ８５でのＲＮＡ編集の５’及び３’塩基嗜好性のヒートマップ
【００９６】
【図５２Ａ】ＲＥＰＡＩＲｖ１を有する疾患関連変異の矯正図５２Ａ）ＡＶＰＲ２　８７８Ｇ＞Ａを標的化するための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０５～７０８）図５２Ｂ）ＡＶＰＲ２における８７８Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計を有するＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して変化する百分率に矯正される。図５２Ｃ）ＦＡＮＣＣ　１５１７Ｇ＞Ａを標的化するための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０９～７１２）図５２Ｄ）ＦＡＮＣＣにおける１５１７Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計を有するＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して変化する百分率に矯正される。図５２Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１を使用する３４の異なる疾患関連Ｇ＞Ａ変異の編集パーセントの定量化。図５２Ｆ）ＣｌｉｎＶａｒデータベースによって注釈されたように矯正され得る全ての可能性のあるＧ＞Ａ変異の分析。図５２Ｇ）ＣｌｉｎＶａｒにおける全てのＧ＞Ａ変異ための編集モチーフの分布は、Ｇｌｕｃ転写産物上で定量化されたようなモチーフ当たりのＲＥＰＡＩＲｖ１による編集効率に対して示される。
【図５２Ｂ】ＲＥＰＡＩＲｖ１を有する疾患関連変異の矯正図５２Ａ）ＡＶＰＲ２　８７８Ｇ＞Ａを標的化するための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０５～７０８）図５２Ｂ）ＡＶＰＲ２における８７８Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計を有するＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して変化する百分率に矯正される。図５２Ｃ）ＦＡＮＣＣ　１５１７Ｇ＞Ａを標的化するための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０９～７１２）図５２Ｄ）ＦＡＮＣＣにおける１５１７Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計を有するＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して変化する百分率に矯正される。図５２Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１を使用する３４の異なる疾患関連Ｇ＞Ａ変異の編集パーセントの定量化。図５２Ｆ）ＣｌｉｎＶａｒデータベースによって注釈されたように矯正され得る全ての可能性のあるＧ＞Ａ変異の分析。図５２Ｇ）ＣｌｉｎＶａｒにおける全てのＧ＞Ａ変異ための編集モチーフの分布は、Ｇｌｕｃ転写産物上で定量化されたようなモチーフ当たりのＲＥＰＡＩＲｖ１による編集効率に対して示される。
【図５２Ｃ】ＲＥＰＡＩＲｖ１を有する疾患関連変異の矯正図５２Ａ）ＡＶＰＲ２　８７８Ｇ＞Ａを標的化するための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０５～７０８）

図５２Ｂ）ＡＶＰＲ２における８７８Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計を有するＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して変化する百分率に矯正される。図５２Ｃ）ＦＡＮＣＣ　１５１７Ｇ＞Ａを標的化するための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０９～７１２）図５２Ｄ）ＦＡＮＣＣにおける１５１７Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計を有するＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して変化する百分率に矯正される。図５２Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１を使用する３４の異なる疾患関連Ｇ＞Ａ変異の編集パーセントの定量化。図５２Ｆ）ＣｌｉｎＶａｒデータベースによって注釈されたように矯正され得る全ての可能性のあるＧ＞Ａ変異の分析。図５２Ｇ）ＣｌｉｎＶａｒにおける全てのＧ＞Ａ変異ための編集モチーフの分布は、Ｇｌｕｃ転写産物上で定量化されたようなモチーフ当たりのＲＥＰＡＩＲｖ１による編集効率に対して示される。

【図５２Ｄ】ＲＥＰＡＩＲｖ１を有する疾患関連変異の矯正図５２Ａ）ＡＶＰＲ２　８７８Ｇ＞Ａを標的化するための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０５～７０８）図５２Ｂ）ＡＶＰＲ２における８７８Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計を有するＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して変化する百分率に矯正される。図５２Ｃ）ＦＡＮＣＣ　１５１７Ｇ＞Ａを標的化するための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０９～７１２）図５２Ｄ）ＦＡＮＣＣにおける１５１７Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計を有するＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して変化する百分率に矯正される。図５２Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１を使用する３４の異なる疾患関連Ｇ＞Ａ変異の編集パーセントの定量化。図５２Ｆ）ＣｌｉｎＶａｒデータベースによって注釈されたように矯正され得る全ての可能性のあるＧ＞Ａ変異の分析。図５２Ｇ）ＣｌｉｎＶａｒにおける全てのＧ＞Ａ変異ための編集モチーフの分布は、Ｇｌｕｃ転写産物上で定量化されたようなモチーフ当たりのＲＥＰＡＩＲｖ１による編集効率に対して示される。

【図５２Ｅ】ＲＥＰＡＩＲｖ１を有する疾患関連変異の矯正図５２Ａ）ＡＶＰＲ２　８７８Ｇ＞Ａを標的化するための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０５～７０８）図５２Ｂ）ＡＶＰＲ２における８７８Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計を有するＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して変化する百分率に矯正される。図５２Ｃ）ＦＡＮＣＣ　１５１７Ｇ＞Ａを標的化するための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０９～７１２）図５２Ｄ）ＦＡＮＣＣにおける１５１７Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計を有するＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して変化する百分率に矯正される。図５２Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１を使用する３４の異なる疾患関連Ｇ＞Ａ変異の編集パーセントの定量化。図５２Ｆ）ＣｌｉｎＶａｒデータベースによって注釈されたように矯正され得る全ての可能性のあるＧ＞Ａ変異の分析。図５２Ｇ）ＣｌｉｎＶａｒにおける全てのＧ＞Ａ変異ための編集モチーフの分布は、Ｇｌｕｃ転写産物上で定量化されたようなモチーフ当たりのＲＥＰＡＩＲｖ１による編集効率に対して示される。

【図５２Ｆ】ＲＥＰＡＩＲｖ１を有する疾患関連変異の矯正図５２Ａ）ＡＶＰＲ２　８７８Ｇ＞Ａを標的化するための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０５～７０８）図５２Ｂ）ＡＶＰＲ２における８７８Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計を有するＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して変化する百分率に矯正される。図５２Ｃ）ＦＡＮＣＣ　１５１７Ｇ＞Ａを標的化するための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０９～７１２）図５２Ｄ）ＦＡＮＣＣにおける１５１７Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計を有するＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して変化する百分率に矯正される。図５２Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１を使用する３４の異なる疾患関連Ｇ＞Ａ変異の編集パーセントの定量化。図５２Ｆ）ＣｌｉｎＶａｒデータベースによって注釈されたように矯正され得る全ての可能性のあるＧ＞Ａ変異の分析。図５２Ｇ）ＣｌｉｎＶａｒにおける全てのＧ＞Ａ変異ための編集モチーフの分布は、Ｇｌｕｃ転写産物上で定量化されたようなモチーフ当たりのＲＥＰＡＩＲｖ１による編集効率に対して示される。

【図５２Ｇ】ＲＥＰＡＩＲｖ１を有する疾患関連変異の矯正図５２Ａ）ＡＶＰＲ２　８７８Ｇ＞Ａを標的化するための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０５～７０８）図５２Ｂ）ＡＶＰＲ２における８７８Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計を有するＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して変化する百分率に矯正される。図５２Ｃ）ＦＡＮＣＣ　１５１

７Ｇ＞Ａを標的化するための標的及びガイド設計の概略図。（配列番号７０９～７１２）図５２Ｄ）ＦＡＮＣＣにおける１５１７Ｇ＞Ａ変異は、３つの異なるガイド設計を有するＲＥＰＡＩＲｖ１を使用して変化する百分率に矯正される。図５２Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１を使用する３４の異なる疾患関連Ｇ＞Ａ変異の編集パーセントの定量化。図５２Ｆ）ＣｌｉｎＶａｒデータベースによって注釈されたように矯正され得る全ての可能性のあるＧ＞Ａ変異の分析。図５２Ｇ）ＣｌｉｎＶａｒにおける全てのＧ＞Ａ変異ための編集モチーフの分布は、Ｇｌｕｃ転写産物上で定量化されたようなモチーフ当たりのＲＥＰＡＩＲｖ１による編集効率に対して示される。

【００９７】

【図５３Ａ】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性の特徴付け図５３Ａ）ＫＲＡＳ標的部位及びガイド設計の概略図。（配列番号７１３～７２０）図５３Ｂ）タイルされたＫＲＡＳ標的化ガイドについての編集パーセントの定量化。オンターゲット及び近傍するアデノシン部位で編集パーセンテージが示される。各ガイドについて、二本鎖ＲＮＡの領域は、赤い長方形で示される。図５３Ｃ）Ｃｌｕｃ標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲット部位Ｃｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図５３Ｄ）非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。

【図５３Ｂ】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性の特徴付け図５３Ａ）ＫＲＡＳ標的部位及びガイド設計の概略図。（配列番号７１３～７２０）図５３Ｂ）タイルされたＫＲＡＳ標的化ガイドについての編集パーセントの定量化。オンターゲット及び近傍するアデノシン部位で編集パーセンテージが示される。各ガイドについて、二本鎖ＲＮＡの領域は、赤い長方形で示される。図５３Ｃ）Ｃｌｕｃ標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲット部位Ｃｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図５３Ｄ）非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。

【図５３Ｃ】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性の特徴付け図５３Ａ）ＫＲＡＳ標的部位及びガイド設計の概略図。（配列番号７１３～７２０）図５３Ｂ）タイルされたＫＲＡＳ標的化ガイドについての編集パーセントの定量化。オンターゲット及び近傍するアデノシン部位で編集パーセンテージが示される。各ガイドについて、二本鎖ＲＮＡの領域は、赤い長方形で示される。図５３Ｃ）Ｃｌｕｃ標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲット部位Ｃｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図５３Ｄ）非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。

【図５３Ｄ】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性の特徴付け図５３Ａ）ＫＲＡＳ標的部位及びガイド設計の概略図。（配列番号７１３～７２０）図５３Ｂ）タイルされたＫＲＡＳ標的化ガイドについての編集パーセントの定量化。オンターゲット及び近傍するアデノシン部位で編集パーセンテージが示される。各ガイドについて、二本鎖ＲＮＡの領域は、赤い長方形で示される。図５３Ｃ）Ｃｌｕｃ標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲット部位Ｃｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図５３Ｄ）非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。

【００９８】

【図５４Ａ】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性を改善するためのＡＤＡＲ２の合理的変異誘発図５４Ａ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化、同様に主要なＡＤＡＲ２デアミナーゼ残基とｄｓＲＮＡ標的との間の接触について概略図に沿ってプロットされたそれらの特異性スコア。特異性スコアは、標的化ガイドと非標的化ガイド条件との間のルシフェラーゼシグナルの比として定義される。配列番号７３８及び７３９が示される。図５４Ｂ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化対それらの特異性スコア。図５４Ｃ）ｍＲＮＡのトランスクリプトームワイドシークエンシングによる、各ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体に

ついてのオンターゲット編集画分、同様に有意なオフターゲットの数の測定。図５４Ｄ）Ｃｌｕｃにおいてプレ終結部位を標的化するガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図５４Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１とＲＥＰＡＩＲｖ２との間のオフターゲット編集における差異を強調するオンターゲットＣｌｕｃ編集部位（配列番号７２１、７４０～７４５、及び７６３～７９２）（２５４Ａ＞Ｇ）を取り囲むＲＮＡシークエンシング読み取り。全てのＡ＞Ｇ編集は赤色で強調され、シークエンシング誤差は青色で強調される。図５４Ｆ）内因性ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ転写産物におけるフレーム外ＵＡＧ部位を標的化するガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２によるＲＮＡ編集。オンターゲット編集画分は、各条件行について右側に横向きの棒グラフとして示される。ガイドＲＮＡによって形成される二本鎖領域は、赤色の輪郭ボックスによって示される。

【図５４Ｂ】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性を改善するためのＡＤＡＲ２の合理的変異誘発図５４Ａ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化、同様に主要なＡＤＡＲ２デアミナーゼ残基とｄｓＲＮＡ標的との間の接触について概略図に沿ってプロットされたそれらの特異性スコア。特異性スコアは、標的化ガイドと非標的化ガイド条件との間のルシフェラーゼシグナルの比として定義される。配列番号７３８及び７３９が示される。図５４Ｂ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化対それらの特異性スコア。図５４Ｃ）ｍＲＮＡのトランスクリプトームワイドシークエンシングによる、各ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体についてのオンターゲット編集画分、同様に有意なオフターゲットの数の測定。図５４Ｄ）Ｃｌｕｃにおいてプレ終結部位を標的化するガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図５４Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１とＲＥＰＡＩＲｖ２との間のオフターゲット編集における差異を強調するオンターゲットＣｌｕｃ編集部位（配列番号７２１、７４０～７４５、及び７６３～７９２）（２５４Ａ＞Ｇ）を取り囲むＲＮＡシークエンシング読み取り。全てのＡ＞Ｇ編集は赤色で強調され、シークエンシング誤差は青色で強調される。図５４Ｆ）内因性ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ転写産物におけるフレーム外ＵＡＧ部位を標的化するガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２によるＲＮＡ編集。オンターゲット編集画分は、各条件行について右側に横向きの棒グラフとして示される。ガイドＲＮＡによって形成される二本鎖領域は、赤色の輪郭ボックスによって示される。

【図５４Ｃ】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性を改善するためのＡＤＡＲ２の合理的変異誘発図５４Ａ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化、同様に主要なＡＤＡＲ２デアミナーゼ残基とｄｓＲＮＡ標的との間の接触について概略図に沿ってプロットされたそれらの特異性スコア。特異性スコアは、標的化ガイドと非標的化ガイド条件との間のルシフェラーゼシグナルの比として定義される。配列番号７３８及び７３９が示される。図５４Ｂ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化対それらの特異性スコア。図５４Ｃ）ｍＲＮＡのトランスクリプトームワイドシークエンシングによる、各ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体についてのオンターゲット編集画分、同様に有意なオフターゲットの数の測定。図５４Ｄ）Ｃｌｕｃにおいてプレ終結部位を標的化するガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図５４Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１とＲＥＰＡＩＲｖ２との間のオフターゲット編集における差異を強調するオンターゲットＣｌｕｃ編集部位（配列番号７２１、７４０～７４５、及び７６３～７９２）（２５４Ａ＞Ｇ）を取り囲むＲＮＡシークエンシング読み取り。全てのＡ＞Ｇ編集は赤色で強調され、シークエンシング誤差は青色で強調される。図５４Ｆ）内因性ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ転写産物におけるフレーム外ＵＡＧ部位を標的化するガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２によるＲＮＡ編集。オンターゲット編集画分は、各条件行について右

側に横向きの棒グラフとして示される。ガイドＲＮＡによって形成される二本鎖領域は、赤色の輪郭ボックスによって示される。

【図５４Ｄ】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性を改善するためのＡＤＡＲ２の合理的変異誘発図５４Ａ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化、同様に主要なＡＤＡＲ２デアミナーゼ残基とｄｓＲＮＡ標的との間の接触について概略図に沿ってプロットされたそれらの特異性スコア。特異性スコアは、標的化ガイドと非標的化ガイド条件との間のルシフェラーゼシグナルの比として定義される。配列番号７３８及び７３９が示される。図５４Ｂ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化対それらの特異性スコア。図５４Ｃ）ｍＲＮＡのトランスクリプトームワイドシークエンシングによる、各ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体についてのオンターゲット編集画分、同様に有意なオフターゲットの数の測定。図５４Ｄ）Ｃｌｕｃにおいてプレ終結部位を標的化するガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図５４Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１とＲＥＰＡＩＲｖ２との間のオフターゲット編集における差異を強調するオンターゲットＣｌｕｃ編集部位（配列番号７２１、７４０～７４５、及び７６３～７９２）（２５４Ａ＞Ｇ）を取り囲むＲＮＡシークエンシング読み取り。全てのＡ＞Ｇ編集は赤色で強調され、シークエンシング誤差は青色で強調される。図５４Ｆ）内因性ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ転写産物におけるフレーム外ＵＡＧ部位を標的化するガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２によるＲＮＡ編集。オンターゲット編集画分は、各条件行について右側に横向きの棒グラフとして示される。ガイドＲＮＡによって形成される二本鎖領域は、赤色の輪郭ボックスによって示される。

【図５４Ｅ】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性を改善するためのＡＤＡＲ２の合理的変異誘発図５４Ａ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化、同様に主要なＡＤＡＲ２デアミナーゼ残基とｄｓＲＮＡ標的との間の接触について概略図に沿ってプロットされたそれらの特異性スコア。特異性スコアは、標的化ガイドと非標的化ガイド条件との間のルシフェラーゼシグナルの比として定義される。配列番号７３８及び７３９が示される。図５４Ｂ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化対それらの特異性スコア。図５４Ｃ）ｍＲＮＡのトランスクリプトームワイドシークエンシングによる、各ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体についてのオンターゲット編集画分、同様に有意なオフターゲットの数の測定。図５４Ｄ）Ｃｌｕｃにおいてプレ終結部位を標的化するガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図５４Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１とＲＥＰＡＩＲｖ２との間のオフターゲット編集における差異を強調するオンターゲットＣｌｕｃ編集部位（配列番号７２１、７４０～７４５、及び７６３～７９２）（２５４Ａ＞Ｇ）を取り囲むＲＮＡシークエンシング読み取り。全てのＡ＞Ｇ編集は赤色で強調され、シークエンシング誤差は青色で強調される。図５４Ｆ）内因性ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ転写産物におけるフレーム外ＵＡＧ部位を標的化するガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２によるＲＮＡ編集。オンターゲット編集画分は、各条件行について右側に横向きの棒グラフとして示される。ガイドＲＮＡによって形成される二本鎖領域は、赤色の輪郭ボックスによって示される。

【図５４Ｆ】ＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性を改善するためのＡＤＡＲ２の合理的変異誘発図５４Ａ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化、同様に主要なＡＤＡＲ２デアミナーゼ残基とｄｓＲＮＡ標的との間の接触について概略図に沿ってプロットされたそれらの特異性スコア。特異性スコアは、標的化ガイドと非標的化ガイド条件との間のルシフェラーゼシグナルの比として定義される。配列番号７３８及び７３９が示される。図５４Ｂ）様々なｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化対それらの特異性スコア。図５４Ｃ）ｍＲＮＡのトランスクリプトームワイドシークエンシングによる、各ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２変異体に

ついてのオンターゲット編集画分、同様に有意なオフターゲットの数の測定。図５４Ｄ）Ｃｌｕｃにおいてプレ終結部位を標的化するガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図５４Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１とＲＥＰＡＩＲｖ２との間のオフターゲット編集における差異を強調するオンターゲットＣｌｕｃ編集部位（配列番号７２１、７４０～７４５、及び７６３～７９２）（２５４　Ａ＞Ｇ）を取り囲むＲＮＡシークエンシング読み取り。全てのＡ＞Ｇ編集は赤色で強調され、シークエンシング誤差は青色で強調される。図５４Ｆ）内因性ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ転写産物におけるフレーム外ＵＡＧ部位を標的化するガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２によるＲＮＡ編集。オンターゲット編集画分は、各条件行について右側に横向きの棒グラフとして示される。ガイドＲＮＡによって形成される二本鎖領域は、赤色の輪郭ボックスによって示される。

【００９９】

【図５５Ａ】インビボ効率及びＰＦＳ決定のためのＣａｓ１３ｂオーソログの細菌スクリーニング。図５５Ａ）Ｃａｓ１３ｂオーソログのＰＦＳを決定するための細菌アッセイの概略図。ベーターラクタマーゼ標的化スペーサー（配列番号７２２）を有するＣａｓ１３ｂオーソログをベーターラクタマーゼ発現プラスミドと共形質転換し、二重選択に供する。図５５Ｂ）コロニー形成単位（ｃｆｕ）によって測定される、ベーターラクタマーゼを標的化するＣａｓ１３ｂオーソログの干渉活性の定量化。図５５Ｃ）細菌アッセイからの枯渇配列によって決定される、Ｃａｓ１３ｂオーソログについてのＰＦＳロゴ。

【図５５Ｂ】インビボ効率及びＰＦＳ決定のためのＣａｓ１３ｂオーソログの細菌スクリーニング。図５５Ａ）Ｃａｓ１３ｂオーソログのＰＦＳを決定するための細菌アッセイの概略図。ベーターラクタマーゼ標的化スペーサー（配列番号７２２）を有するＣａｓ１３ｂオーソログをベーターラクタマーゼ発現プラスミドと共形質転換し、二重選択に供する。図５５Ｂ）コロニー形成単位（ｃｆｕ）によって測定される、ベーターラクタマーゼを標的化するＣａｓ１３ｂオーソログの干渉活性の定量化。図５５Ｃ）細菌アッセイからの枯渇配列によって決定される、Ｃａｓ１３ｂオーソログについてのＰＦＳロゴ。

【図５５Ｃ】インビボ効率及びＰＦＳ決定のためのＣａｓ１３ｂオーソログの細菌スクリーニング。図５５Ａ）Ｃａｓ１３ｂオーソログのＰＦＳを決定するための細菌アッセイの概略図。ベーターラクタマーゼ標的化スペーサー（配列番号７２２）を有するＣａｓ１３ｂオーソログをベーターラクタマーゼ発現プラスミドと共形質転換し、二重選択に供する。図５５Ｂ）コロニー形成単位（ｃｆｕ）によって測定される、ベーターラクタマーゼを標的化するＣａｓ１３ｂオーソログの干渉活性の定量化。図５５Ｃ）細菌アッセイからの枯渇配列によって決定される、Ｃａｓ１３ｂオーソログについてのＰＦＳロゴ。

【０１００】

【図５６Ａ】Ｃａｓ１３ｂノックダウンの最適化及びミスマッチ特異性のさらなる特徴付け。図５６Ａ）２つの異なるガイドを有するＧｌｕｃノックダウンは、様々な核局在及び核外輸送タグに融合した上位２のＣａｓ１３ａ及び上位４つのＣａｓ１３ｂオーソログを使用して測定される。図５６Ｂ）ＫＲＡＳのノックダウンは、４つの異なるガイドでＬｗａＣａｓ１３ａ、ＲａｎＣａｓ１３ｂ、ＰｇｕＣａｓ１３ｂ、及びＰｓｐＣａｓ１３ｂについて測定され、４つの位置合わせされたｓｈＲＮＡ対照と比較される。図５６Ｃ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂノックダウンの特異性を評価するために使用される一重及び二重ミスマッチプラスミドライブラリの概略図。全ての可能性のある一重及び二重ミスマッチは、標的配列において、同様に標的部位の５’端及び３’端に直接隣接する３つの位置において存在する。（配列番号７２３～７３４）図５６Ｄ）示される一重ミスマッチを有する転写産物の枯渇レベルは、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件の両方についてのヒートマップとしてプロットされる。（配列番号７２３及び７３６）図５６Ｅ）示される一重ミスマッチを有する転写産物の枯渇レベルは、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件（配列番号７２３及び７３６）の両方についてのヒートマップとしてプロットされる。

【図５６Ｂ】Ｃａｓ１３ｂノックダウンの最適化及びミスマッチ特異性のさらなる特徴付け。図５６Ａ）２つの異なるガイドを有するＧｌｕｃノックダウンは、様々な核局在及び核外輸送タグに融合した上位２のＣａｓ１３ａ及び上位４つのＣａｓ１３ｂオーソログを使用して測定される。図５６Ｂ）ＫＲＡＳのノックダウンは、４つの異なるガイドでＬｗａＣａｓ１３ａ、ＲａｎＣａｓ１３ｂ、ＰｇｕＣａｓ１３ｂ、及びＰｓｐＣａｓ１３ｂについて測定され、４つの位置合わせされたｓｈＲＮＡ対照と比較される。図５６Ｃ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂノックダウンの特異性を評価するために使用される一重及び二重ミスマッチプラスミドライブラリの概略図。全ての可能性のある一重及び二重ミスマッチは、標的配列において、同様に標的部位の５’端及び３’端に直接隣接する３つの位置において存在する。（配列番号７２３～７３４）図５６Ｄ）示される一重ミスマッチを有する転写産物の枯渇レベルは、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件の両方についてのヒートマップとしてプロットされる。（配列番号７２３及び７３６）図５６Ｅ）示される一重ミスマッチを有する転写産物の枯渇レベルは、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件（配列番号７２３及び７３６）の両方についてのヒートマップとしてプロットされる。

【図５６Ｃ】Ｃａｓ１３ｂノックダウンの最適化及びミスマッチ特異性のさらなる特徴付け。図５６Ａ）２つの異なるガイドを有するＧｌｕｃノックダウンは、様々な核局在及び核外輸送タグに融合した上位２のＣａｓ１３ａ及び上位４つのＣａｓ１３ｂオーソログを使用して測定される。図５６Ｂ）ＫＲＡＳのノックダウンは、４つの異なるガイドでＬｗａＣａｓ１３ａ、ＲａｎＣａｓ１３ｂ、ＰｇｕＣａｓ１３ｂ、及びＰｓｐＣａｓ１３ｂについて測定され、４つの位置合わせされたｓｈＲＮＡ対照と比較される。図５６Ｃ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂノックダウンの特異性を評価するために使用される一重及び二重ミスマッチプラスミドライブラリの概略図。全ての可能性のある一重及び二重ミスマッチは、標的配列において、同様に標的部位の５’端及び３’端に直接隣接する３つの位置において存在する。（配列番号７２３～７３４）図５６Ｄ）示される一重ミスマッチを有する転写産物の枯渇レベルは、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件の両方についてのヒートマップとしてプロットされる。（配列番号７２３及び７３６）図５６Ｅ）示される一重ミスマッチを有する転写産物の枯渇レベルは、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件（配列番号７２３及び７３６）の両方についてのヒートマップとしてプロットされる。

【図５６Ｄ】Ｃａｓ１３ｂノックダウンの最適化及びミスマッチ特異性のさらなる特徴付け。図５６Ａ）２つの異なるガイドを有するＧｌｕｃノックダウンは、様々な核局在及び核外輸送タグに融合した上位２のＣａｓ１３ａ及び上位４つのＣａｓ１３ｂオーソログを使用して測定される。図５６Ｂ）ＫＲＡＳのノックダウンは、４つの異なるガイドでＬｗａＣａｓ１３ａ、ＲａｎＣａｓ１３ｂ、ＰｇｕＣａｓ１３ｂ、及びＰｓｐＣａｓ１３ｂについて測定され、４つの位置合わせされたｓｈＲＮＡ対照と比較される。図５６Ｃ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂノックダウンの特異性を評価するために使用される一重及び二重ミスマッチプラスミドライブラリの概略図。全ての可能性のある一重及び二重ミスマッチは、標的配列において、同様に標的部位の５’端及び３’端に直接隣接する３つの位置において存在する。（配列番号７２３～７３４）図５６Ｄ）示される一重ミスマッチを有する転写産物の枯渇レベルは、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件の両方についてのヒートマップとしてプロットされる。（配列番号７２３及び７３６）図５６Ｅ）示される一重ミスマッチを有する転写産物の枯渇レベルは、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件（配列番号７２３及び７３６）の両方についてのヒートマップとしてプロットされる。

【図５６Ｅ】Ｃａｓ１３ｂノックダウンの最適化及びミスマッチ特異性のさらなる特徴付け。図５６Ａ）２つの異なるガイドを有するＧｌｕｃノックダウンは、様々な核局在及び核外輸送タグに融合した上位２のＣａｓ１３ａ及び上位４つのＣａｓ１３ｂオーソログを使用して測定される。図５６Ｂ）ＫＲＡＳのノックダウンは、４つの異なるガイドでＬｗａＣａｓ１３ａ、ＲａｎＣａｓ１３ｂ、ＰｇｕＣａｓ１３ｂ、及びＰｓｐＣａｓ１３ｂに

ついて測定され、４つの位置合わせされたｓｈＲＮＡ対照と比較される。図５６Ｃ）ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂノックダウンの特異性を評価するために使用される一重及び二重ミスマッチプラスミドライブラリの概略図。全ての可能性のある一重及び二重ミスマッチは、標的配列において、同様に標的部位の５’端及び３’端に直接隣接する３つの位置において存在する。（配列番号７２３～７３４）図５６Ｄ）示される一重ミスマッチを有する転写産物の枯渇レベルは、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件の両方についてのヒートマップとしてプロットされる。（配列番号７２３及び７３６）図５６Ｅ）示される一重ミスマッチを有する転写産物の枯渇レベルは、ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂ条件（配列番号７２３及び７３６）の両方についてのヒートマップとしてプロットされる。

【０１０１】

【図５７Ａ】ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２　ＲＮＡ編集のための設計パラメータの特徴付け図５７Ａ）野生型Ｃａｓ１３ｂ及び触媒的に不活性なＨ１３３Ａ／Ｈ１０５８Ａ　Ｃａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）のＧｌｕｃ標的化のノックダウン効率。図５７Ｂ）タイリングＣｌｕｃ標的化ガイドで試験された、野生型ＡＤＡＲ２触媒ドメインまたは活性型Ｅ４８８Ｑ変異体ＡＤＡＲ２触媒ドメインのいずれかに融合したｄＣａｓ１３ｂによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。図５７Ｃ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼ Ｗ８５Ｘ（配列番号７９３～８０１）を標的化する３０ｎｔガイドについてのＡ－＞Ｉ編集のガイド設計及びシークエンシング定量化。図５７Ｄ）ＰＰＩＢ（配列番号７４６～７５３）を標的化する５０ｎｔガイドについてのＡ－＞Ｉ編集のガイド設計及びシークエンシング定量化。図５７Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるルシフェラーゼ活性回復に対するリンカー選択の影響。図５７Ｆ）塩基の影響は、ＲＥＰＡＩＲｖ１（配列番号７５４及び７５５）によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的化されたアデノシンを反対に特定する。

【図５７Ｂ】ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２　ＲＮＡ編集のための設計パラメータの特徴付け図５７Ａ）野生型Ｃａｓ１３ｂ及び触媒的に不活性なＨ１３３Ａ／Ｈ１０５８Ａ　Ｃａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）のＧｌｕｃ標的化のノックダウン効率。図５７Ｂ）タイリングＣｌｕｃ標的化ガイドで試験された、野生型ＡＤＡＲ２触媒ドメインまたは活性型Ｅ４８８Ｑ変異体ＡＤＡＲ２触媒ドメインのいずれかに融合したｄＣａｓ１３ｂによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。図５７Ｃ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼ Ｗ８５Ｘ（配列番号７９３～８０１）を標的化する３０ｎｔガイドについてのＡ－＞Ｉ編集のガイド設計及びシークエンシング定量化。図５７Ｄ）ＰＰＩＢ（配列番号７４６～７５３）を標的化する５０ｎｔガイドについてのＡ－＞Ｉ編集のガイド設計及びシークエンシング定量化。図５７Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるルシフェラーゼ活性回復に対するリンカー選択の影響。図５７Ｆ）塩基の影響は、ＲＥＰＡＩＲｖ１（配列番号７５４及び７５５）によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的化されたアデノシンを反対に特定する。

【図５７Ｃ】ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２　ＲＮＡ編集のための設計パラメータの特徴付け図５７Ａ）野生型Ｃａｓ１３ｂ及び触媒的に不活性なＨ１３３Ａ／Ｈ１０５８Ａ　Ｃａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）のＧｌｕｃ標的化のノックダウン効率。図５７Ｂ）タイリングＣｌｕｃ標的化ガイドで試験された、野生型ＡＤＡＲ２触媒ドメインまたは活性型Ｅ４８８Ｑ変異体ＡＤＡＲ２触媒ドメインのいずれかに融合したｄＣａｓ１３ｂによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。図５７Ｃ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼ Ｗ８５Ｘ（配列番号７９３～８０１）を標的化する３０ｎｔガイドについてのＡ－＞Ｉ編集のガイド設計及びシークエンシング定量化。図５７Ｄ）ＰＰＩＢ（配列番号７４６～７５３）を標的化する５０ｎｔガイドについてのＡ－＞Ｉ編集のガイド設計及びシークエンシング定量化。図５７Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるルシフェラーゼ活性回復に対するリンカー選択の影響。図５７Ｆ）塩基の影響は、ＲＥＰＡＩＲｖ１（配列番号７５４及び７５５）によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的化されたアデノシンを反対に特定する。

【図５７Ｄ】ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２　ＲＮＡ編集のための設計パラメータの特徴付け図５７Ａ）野生型Ｃａｓ１３ｂ及び触媒的に不活性なＨ１３３Ａ／Ｈ１０５８Ａ　Ｃａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）のＧｌｕｃ標的化のノックダウン効率。図５７Ｂ）タイリング

Ｃｌｕｃ標的化ガイドで試験された、野生型ＡＤＡＲ２触媒ドメインまたは活性型Ｅ４８８Ｑ変異体ＡＤＡＲ２触媒ドメインのいずれかに融合したｄＣａｓ１３ｂによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。図５７Ｃ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼ Ｗ８５Ｘ（配列番号７９３～８０１）を標的化する３０ｎｔガイドについてのＡ－＞Ｉ編集のガイド設計及びシークエンシング定量化。図５７Ｄ）ＰＰＩＢ（配列番号７４６～７５３）を標的化する５０ｎｔガイドについてのＡ－＞Ｉ編集のガイド設計及びシークエンシング定量化。図５７Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるルシフェラーゼ活性回復に対するリンカー選択の影響。図５７Ｆ）塩基の影響は、ＲＥＰＡＩＲｖ１（配列番号７５４及び７５５）によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的化されたアデノシンを反対に特定する。

【図５７Ｅ】ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２　ＲＮＡ編集のための設計パラメータの特徴付け図５７Ａ）野生型Ｃａｓ１３ｂ及び触媒的に不活性なＨ１３３Ａ／Ｈ１０５８Ａ　Ｃａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）のＧｌｕｃ標的化のノックダウン効率。図５７Ｂ）タイリングＣｌｕｃ標的化ガイドで試験された、野生型ＡＤＡＲ２触媒ドメインまたは活性型Ｅ４８８Ｑ変異体ＡＤＡＲ２触媒ドメインのいずれかに融合したｄＣａｓ１３ｂによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。図５７Ｃ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼ Ｗ８５Ｘ（配列番号７９３～８０１）を標的化する３０ｎｔガイドについてのＡ－＞Ｉ編集のガイド設計及びシークエンシング定量化。図５７Ｄ）ＰＰＩＢ（配列番号７４６～７５３）を標的化する５０ｎｔガイドについてのＡ－＞Ｉ編集のガイド設計及びシークエンシング定量化。図５７Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるルシフェラーゼ活性回復に対するリンカー選択の影響。図５７Ｆ）塩基の影響は、ＲＥＰＡＩＲｖ１（配列番号７５４及び７５５）によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的化されたアデノシンを反対に特定する。

【図５７Ｆ】ｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２　ＲＮＡ編集のための設計パラメータの特徴付け図５７Ａ）野生型Ｃａｓ１３ｂ及び触媒的に不活性なＨ１３３Ａ／Ｈ１０５８Ａ　Ｃａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）のＧｌｕｃ標的化のノックダウン効率。図５７Ｂ）タイリングＣｌｕｃ標的化ガイドで試験された、野生型ＡＤＡＲ２触媒ドメインまたは活性型Ｅ４８８Ｑ変異体ＡＤＡＲ２触媒ドメインのいずれかに融合したｄＣａｓ１３ｂによるルシフェラーゼ活性回復の定量化。図５７Ｃ）Ｃｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼ Ｗ８５Ｘ（配列番号７９３～８０１）を標的化する３０ｎｔガイドについてのＡ－＞Ｉ編集のガイド設計及びシークエンシング定量化。図５７Ｄ）ＰＰＩＢ（配列番号７４６～７５３）を標的化する５０ｎｔガイドについてのＡ－＞Ｉ編集のガイド設計及びシークエンシング定量化。図５７Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ１によるルシフェラーゼ活性回復に対するリンカー選択の影響。図５７Ｆ）塩基の影響は、ＲＥＰＡＩＲｖ１（配列番号７５４及び７５５）によるルシフェラーゼ活性回復に対する標的化されたアデノシンを反対に特定する。

【０１０２】

【図５８】Ｇ＞Ａ変異についてのＣｌｉｎＶａｒモチーフ分布。全てのＧ＞Ａ変異についてのＣｌｉｎＶａｒデータベースにおいて観察された各可能性のあるトリプレットモチーフの数。

【０１０３】

【図５９】ｄＣａｓ１３ｂのトランケーションは、依然として機能的ＲＮＡ編集を有する。ｄＣａｓ１３ｂの様々なＮ末端及びＣ末端トランケーションにより、ルシフェラーゼシグナルの修復によって測定されるＲＮＡ編集が可能になる。

【０１０４】

【図６０Ａ】他のプログラマブルＡＤＡＲシステムとｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２エディタとの比較。図６０Ａ）２つのプログラム可能なＡＤＡＲスキームの概略図：ＢｏｘＢベースの標的化及び完全長ＡＤＡＲ２標的化。ＢｏｘＢスキーム（上）では、ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメイン（$ADAR2_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ））は、ＢｏｘＢ－と呼ばれる小ＲＮＡ配列に特異的に結合するラムダＮ（Ｎ）と呼ばれる小細菌ウイルスタンパク質に融合される。そして、２つのＢｏｘＢ－ヘアピンを含有するガイドＲＮＡは、部位特異的編集のために$ADAR2_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）、－Ｎをガイドすることができる。完全長ＡＤＡＲ２スキーム（下）において、ＡＤＡＲ２のｄｓＲＮＡ結合ドメインは、ガイドＲＮＡにおけ

るヘアピンに結合し、プログラマブルＡＤＡＲ２編集（配列番号７５６～７６０）を可能にする。図６０Ｂ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｃ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＡＤＡＲ２による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｄ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｅ）Ｃｌｕｃに対する標的化ガイドについてのＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）、ＡＤＡＲ２、及びＲＥＰＡＩＲｖ１についてのオンターゲット編集率百分率の定量化。図６０Ｆ）プログラマブルＡＤＡＲシステムについての異なる標的化と非標的化条件との間のオフターゲット部位のオーバーラップ。

【図６０Ｂ】他のプログラマブルＡＤＡＲシステムとｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２エディタとの比較。図６０Ａ）２つのプログラム可能なＡＤＡＲスキームの概略図：ＢｏｘＢベースの標的化及び完全長ＡＤＡＲ２標的化。ＢｏｘＢスキーム（上）では、ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメイン（ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ））は、ＢｏｘＢ－と呼ばれる小ＲＮＡ配列に特異的に結合するラムダＮ（Ｎ）と呼ばれる小細菌ウイルスタンパク質に融合される。そして、２つのＢｏｘＢ－ヘアピンを含有するガイドＲＮＡは、部位特異的編集のためにＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）、－Ｎをガイドすることができる。完全長ＡＤＡＲ２スキーム（下）において、ＡＤＡＲ２のｄｓＲＮＡ結合ドメインは、ガイドＲＮＡにおけるヘアピンに結合し、プログラマブルＡＤＡＲ２編集（配列番号７５６～７６０）を可能にする。図６０Ｂ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｃ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＡＤＡＲ２による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｄ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｅ）Ｃｌｕｃに対する標的化ガイドについてのＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）、ＡＤＡＲ２、及びＲＥＰＡＩＲｖ１についてのオンターゲット編集率百分率の定量化。図６０Ｆ）プログラマブルＡＤＡＲシステムについての異なる標的化と非標的化条件との間のオフターゲット部位のオーバーラップ。

【図６０Ｃ】他のプログラマブルＡＤＡＲシステムとｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２エディタとの比較。図６０Ａ）２つのプログラム可能なＡＤＡＲスキームの概略図：ＢｏｘＢベースの標的化及び完全長ＡＤＡＲ２標的化。ＢｏｘＢスキーム（上）では、ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメイン（ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ））は、ＢｏｘＢ－と呼ばれる小ＲＮＡ配列に特異的に結合するラムダＮ（Ｎ）と呼ばれる小細菌ウイルスタンパク質に融合される。そして、２つのＢｏｘＢ－ヘアピンを含有するガイドＲＮＡは、部位特異的編集のためにＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）、－Ｎをガイドすることができる。完全長ＡＤＡＲ２スキーム（下）において、ＡＤＡＲ２のｄｓＲＮＡ結合ドメインは、ガイドＲＮＡにおけるヘアピンに結合し、プログラマブルＡＤＡＲ２編集（配列番号７５６～７６０）を可能にする。図６０Ｂ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｃ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＡＤＡＲ２による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｄ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部

位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｅ）ＣｌｕｃにＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）、ＡＤＡＲ２、及びＲＥＰＡＩＲｖ１についてのオンターゲット編集率百分率の定量化。図６０Ｆ）プログラマブルＡＤＡＲシステムについての異なる標的化と非標的化条件との間のオフターゲット部位のオーバーラップ。

【図６０Ｄ】他のプログラマブルＡＤＡＲシステムとｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２エディタとの比較。図６０Ａ）２つのプログラム可能なＡＤＡＲスキームの概略図：ＢｏｘＢベースの標的化及び完全長ＡＤＡＲ２標的化。ＢｏｘＢスキーム（上）では、ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメイン（ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ））は、ＢｏｘＢ－と呼ばれる小ＲＮＡ配列に特異的に結合するラムダＮ（Ｎ）と呼ばれる小細菌ウイルスタンパク質に融合される。そして、２つのＢｏｘＢ－ヘアピンを含有するガイドＲＮＡは、部位特異的編集のためにＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）、－Ｎをガイドすることができる。完全長ＡＤＡＲ２スキーム（下）において、ＡＤＡＲ２のｄｓＲＮＡ結合ドメインは、ガイドＲＮＡにおけるヘアピンに結合し、プログラマブルＡＤＡＲ２編集（配列番号７５６～７６０）を可能にする。図６０Ｂ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｃ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＡＤＡＲ２による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｄ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｅ）ＣｌｕｃにＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）、ＡＤＡＲ２、及びＲＥＰＡＩＲｖ１についてのオンターゲット編集率百分率の定量化。図６０Ｆ）プログラマブルＡＤＡＲシステムについての異なる標的化と非標的化条件との間のオフターゲット部位のオーバーラップ。

【図６０Ｅ】他のプログラマブルＡＤＡＲシステムとｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２エディタとの比較。図６０Ａ）２つのプログラム可能なＡＤＡＲスキームの概略図：ＢｏｘＢベースの標的化及び完全長ＡＤＡＲ２標的化。ＢｏｘＢスキーム（上）では、ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメイン（ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ））は、ＢｏｘＢ－と呼ばれる小ＲＮＡ配列に特異的に結合するラムダＮ（Ｎ）と呼ばれる小細菌ウイルスタンパク質に融合される。そして、２つのＢｏｘＢ－ヘアピンを含有するガイドＲＮＡは、部位特異的編集のためにＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）、－Ｎをガイドすることができる。完全長ＡＤＡＲ２スキーム（下）において、ＡＤＡＲ２のｄｓＲＮＡ結合ドメインは、ガイドＲＮＡにおけるヘアピンに結合し、プログラマブルＡＤＡＲ２編集（配列番号７５６～７６０）を可能にする。図６０Ｂ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｃ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＡＤＡＲ２による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｄ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｅ）ＣｌｕｃにＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）、ＡＤＡＲ２、及びＲＥＰＡＩＲｖ１についてのオンターゲット編集率百分率の定量化。図６０Ｆ）プログラマブルＡＤＡＲシステムについての異なる標的化と非標的化条件との間のオフターゲット部位のオーバーラップ。

【図６０Ｆ】他のプログラマブルＡＤＡＲシステムとｄＣａｓ１３－ＡＤＡＲ２エディタとの比較。図６０Ａ）２つのプログラム可能なＡＤＡＲスキームの概略図：ＢｏｘＢベースの標的化及び完全長ＡＤＡＲ２標的化。ＢｏｘＢスキーム（上）では、ＡＤＡＲ２デア

ミナーゼドメイン（ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ））は、ＢｏｘＢ－と呼ばれる小ＲＮＡ配列に特異的に結合するラムダＮ（Ｎ）と呼ばれる小細菌ウイルスタンパク質に融合される。そして、２つのＢｏｘＢ－ヘアピンを含有するガイドＲＮＡは、部位特異的編集のためにＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）、－Ｎをガイドすることができる。完全長ＡＤＡＲ２スキーム（下）において、ＡＤＡＲ２のｄｓＲＮＡ結合ドメインは、ガイドＲＮＡにおけるヘアピンに結合し、プログラマブルＡＤＡＲ２編集（配列番号７５６～７６０）を可能にする。図６０Ｂ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｃ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＡＤＡＲ２による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｄ）Ｃｌｕｃを標的化するガイド及び非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６０Ｅ）Ｃｌｕｃに対する標的化ガイドについてのＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）、ＡＤＡＲ２、及びＲＥＰＡＩＲｖ１についてのオンターゲット編集率百分率の定量化。図６０Ｆ）プログラマブルＡＤＡＲシステムについての異なる標的化と非標的化条件との間のオフターゲット部位のオーバーラップ。

【０１０５】

【図６１Ａ】ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２変異体の効率及び特異性図６１Ａ）Ｃｌｕｃ標的化及び非標的化ガイドについてのｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体によるルシフェラーゼ活性回復の定量化。図６１Ｂ）標的化及び非標的化ガイドの比とトランスクリプトームワイドシークエンシングによって定量化されるＲＮＡ編集オフターゲットの数との間の関係図６１Ｃ）ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体についてのトランスクリプトームワイドなオフターゲットＲＮＡ編集部位対オンターゲットＣｌｕｃ編集効率の数の定量化。

【図６１Ｂ】ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２変異体の効率及び特異性図６１Ａ）Ｃｌｕｃ標的化及び非標的化ガイドについてのｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体によるルシフェラーゼ活性回復の定量化。図６１Ｂ）標的化及び非標的化ガイドの比とトランスクリプトームワイドシークエンシングによって定量化されるＲＮＡ編集オフターゲットの数との間の関係図６１Ｃ）ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体についてのトランスクリプトームワイドなオフターゲットＲＮＡ編集部位対オンターゲットＣｌｕｃ編集効率の数の定量化。

【図６１Ｃ】ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２変異体の効率及び特異性図６１Ａ）Ｃｌｕｃ標的化及び非標的化ガイドについてのｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体によるルシフェラーゼ活性回復の定量化。図６１Ｂ）標的化及び非標的化ガイドの比とトランスクリプトームワイドシークエンシングによって定量化されるＲＮＡ編集オフターゲットの数との間の関係図６１Ｃ）ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体についてのトランスクリプトームワイドなオフターゲットＲＮＡ編集部位対オンターゲットＣｌｕｃ編集効率の数の定量化。

【０１０６】

【図６２Ａ】ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体によるＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな特異性図６２Ａ）Ｃｌｕｃを標的化するガイドを有するｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６２Ｂ）非標的化ガイドを有するｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。

【図６２Ｂ】ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体によるＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな特異性図６２Ａ）Ｃｌｕｃを標的化するガイドを有するｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体による有意なＲＮＡ編集のトラ

ンスクリプトームワイドな部位。オンターゲットＣｌｕｃ部位（２５４　Ａ＞Ｇ）は、橙色で強調される。図６２Ｂ）非標的化ガイドを有するｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体による有意なＲＮＡ編集のトランスクリプトームワイドな部位。

【０１０７】

【図６３Ａ】ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）編集のオフターゲットにおけるモチーフバイアスの特徴付け。図６３Ａ）各ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体について、転写産物における全てのＡ＞Ｇオフターゲット編集にわたって存在するモチーフが示される。図６３Ｂ）モチーフ同一性当たりのオフターゲットＡ＞Ｇ編集の分布は、標的化及び非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１について示される。図６３Ｃ）モチーフ同一性当たりのオフターゲットＡ＞Ｇ編集の分布は、標的化及び非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ２について示される。

【図６３Ｂ】ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）編集のオフターゲットにおけるモチーフバイアスの特徴付け。図６３Ａ）各ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体について、転写産物における全てのＡ＞Ｇオフターゲット編集にわたって存在するモチーフが示される。図６３Ｂ）モチーフ同一性当たりのオフターゲットＡ＞Ｇ編集の分布は、標的化及び非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１について示される。図６３Ｃ）モチーフ同一性当たりのオフターゲットＡ＞Ｇ編集の分布は、標的化及び非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ２について示される。

【図６３Ｃ】ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）編集のオフターゲットにおけるモチーフバイアスの特徴付け。図６３Ａ）各ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）変異体について、転写産物における全てのＡ＞Ｇオフターゲット編集にわたって存在するモチーフが示される。図６３Ｂ）モチーフ同一性当たりのオフターゲットＡ＞Ｇ編集の分布は、標的化及び非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ１について示される。図６３Ｃ）モチーフ同一性当たりのオフターゲットＡ＞Ｇ編集の分布は、標的化及び非標的化ガイドを有するＲＥＰＡＩＲｖ２について示される。

【０１０８】

【図６４Ａ】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットのさらなる特徴付け。図６４Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１についての転写産物当たりのオフターゲットの数のヒストグラム。図６４Ｂ）ＲＥＰＡＩＲｖ２についての転写産物当たりのオフターゲットの数のヒストグラム。図６４Ｃ）ＲＥＰＡＩＲｖ１オフターゲットのバリアント効果予測。図６４Ｄ）ＲＥＰＡＩＲｖ１オフターゲットの潜在的な発がん作用の分布。図６４Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットのバリアント効果予測。図６４Ｆ）ＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットの潜在的な発がん作用の分布。

【図６４Ｂ】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットのさらなる特徴付け。図６４Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１についての転写産物当たりのオフターゲットの数のヒストグラム。図６４Ｂ）ＲＥＰＡＩＲｖ２についての転写産物当たりのオフターゲットの数のヒストグラム。図６４Ｃ）ＲＥＰＡＩＲｖ１オフターゲットのバリアント効果予測。図６４Ｄ）ＲＥＰＡＩＲｖ１オフターゲットの潜在的な発がん作用の分布。図６４Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットのバリアント効果予測。図６４Ｆ）ＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットの潜在的な発がん作用の分布。

【図６４Ｃ】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットのさらなる特徴付け。図６４Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１についての転写産物当たりのオフターゲットの数のヒストグラム。図６４Ｂ）ＲＥＰＡＩＲｖ２についての転写産物当たりのオフターゲットの数のヒストグラム。図６４Ｃ）ＲＥＰＡＩＲｖ１オフターゲットのバリアント効果予測。図６４Ｄ）ＲＥＰＡＩＲｖ１オフターゲットの潜在的な発がん作用の分布。図６４Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットのバリアント効果予測。図６４Ｆ）ＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットの潜在的な発がん作用の分布。

【図６４Ｄ】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットのさらなる特徴付け。図６４Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１についての転写産物当たりのオフターゲットの数のヒストグラム。図６４Ｂ）ＲＥＰＡＩＲｖ２についての転写産物当たりのオフターゲットの数の

ヒストグラム。図６４Ｃ）ＲＥＰＡＩＲｖ１オフターゲットのバリアント効果予測。図６４Ｄ）ＲＥＰＡＩＲｖ１オフターゲットの潜在的な発がん作用の分布。図６４Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットのバリアント効果予測。図６４Ｆ）ＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットの潜在的な発がん作用の分布。

【図６４Ｅ】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットのさらなる特徴付け。図６４Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１についての転写産物当たりのオフターゲットの数のヒストグラム。図６４Ｂ）ＲＥＰＡＩＲｖ２についての転写産物当たりのオフターゲットの数のヒストグラム。図６４Ｃ）ＲＥＰＡＩＲｖ１オフターゲットのバリアント効果予測。図６４Ｄ）ＲＥＰＡＩＲｖ１オフターゲットの潜在的な発がん作用の分布。図６４Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットのバリアント効果予測。図６４Ｆ）ＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットの潜在的な発がん作用の分布。

【図６４Ｆ】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットのさらなる特徴付け。図６４Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１についての転写産物当たりのオフターゲットの数のヒストグラム。図６４Ｂ）ＲＥＰＡＩＲｖ２についての転写産物当たりのオフターゲットの数のヒストグラム。図６４Ｃ）ＲＥＰＡＩＲｖ１オフターゲットのバリアント効果予測。図６４Ｄ）ＲＥＰＡＩＲｖ１オフターゲットの潜在的な発がん作用の分布。図６４Ｅ）ＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットのバリアント効果予測。図６４Ｆ）ＲＥＰＡＩＲｖ２オフターゲットの潜在的な発がん作用の分布。

【０１０９】

【図６５Ａ】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のＲＮＡ編集効率及び特異性。図６５Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２についての標的化されたアデノシン及び近傍する部位でのＫＲＡＳ標的化ガイド１を有するＫＲＡＳの編集パーセントの定量化。図６５Ｂ）ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２についての標的化されたアデノシン及び近傍する部位でのＫＲＡＳ標的化ガイド３を有するＫＲＡＳの編集パーセントの定量化。図６５Ｃ）ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２についての標的化されたアデノシン及び近傍する部位でのＰＰＩＢ標的化ガイド２を有するＰＰＩＢの編集パーセントの定量化。

【図６５Ｂ】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のＲＮＡ編集効率及び特異性。図６５Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２についての標的化されたアデノシン及び近傍する部位でのＫＲＡＳ標的化ガイド１を有するＫＲＡＳの編集パーセントの定量化。図６５Ｂ）ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２についての標的化されたアデノシン及び近傍する部位でのＫＲＡＳ標的化ガイド３を有するＫＲＡＳの編集パーセントの定量化。図６５Ｃ）ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２についての標的化されたアデノシン及び近傍する部位でのＰＰＩＢ標的化ガイド２を有するＰＰＩＢの編集パーセントの定量化。

【図６５Ｃ】ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２のＲＮＡ編集効率及び特異性。図６５Ａ）ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２についての標的化されたアデノシン及び近傍する部位でのＫＲＡＳ標的化ガイド１を有するＫＲＡＳの編集パーセントの定量化。図６５Ｂ）ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２についての標的化されたアデノシン及び近傍する部位でのＫＲＡＳ標的化ガイド３を有するＫＲＡＳの編集パーセントの定量化。図６５Ｃ）ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＲＥＰＡＩＲｖ２についての標的化されたアデノシン及び近傍する部位でのＰＰＩＢ標的化ガイド２を有するＰＰＩＢの編集パーセントの定量化。

【０１１０】

【図６６Ａ】Ａ＞Ｇ　ＲＮＡエディタを有する全ての潜在的なコドン変化の実証。図６６Ａ）Ａ＞Ｉ編集によって可能にされる全ての潜在的なコドン遷移の表。図６６Ｂ）Ａ＞Ｉ編集によって可能にされる全ての潜在的なコドン遷移を示すコドン表。図６６Ｃは、ＡＤＡＲ及びｄＣａｓ１３ｂによる遺伝子編集を示す。図６６Ｄ）ＡＤＡＲによるメンデル疾患を矯正する例を示す。図６６Ｅ）疾患予防対立遺伝子の多重作成（ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ　ｃｒｅａｔｉｏｎ）の例を示す。図６６Ｆ）調節タンパク質機能の例を示す。図６

６Ｇ）スプライシング調節の例を示す。
【図６６Ｂ】Ａ＞Ｇ　ＲＮＡエディタを有する全ての潜在的なコドン変化の実証。図６６Ａ）Ａ＞Ｉ編集によって可能にされる全ての潜在的なコドン遷移の表。図６６Ｂ）Ａ＞Ｉ編集によって可能にされる全ての潜在的なコドン遷移を示すコドン表。図６６Ｃは、ＡＤＡＲ及びｄＣａｓ１３ｂによる遺伝子編集を示す。図６６Ｄ）ＡＤＡＲによるメンデル疾患を矯正する例を示す。図６６Ｅ）疾患予防対立遺伝子の多重作成（ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ　ｃｒｅａｔｉｏｎ）の例を示す。図６６Ｆ）調節タンパク質機能の例を示す。図６６Ｇ）スプライシング調節の例を示す。
【図６６Ｃ】Ａ＞Ｇ　ＲＮＡエディタを有する全ての潜在的なコドン変化の実証。図６６Ａ）Ａ＞Ｉ編集によって可能にされる全ての潜在的なコドン遷移の表。図６６Ｂ）Ａ＞Ｉ編集によって可能にされる全ての潜在的なコドン遷移を示すコドン表。図６６Ｃは、ＡＤＡＲ及びｄＣａｓ１３ｂによる遺伝子編集を示す。図６６Ｄ）ＡＤＡＲによるメンデル疾患を矯正する例を示す。図６６Ｅ）疾患予防対立遺伝子の多重作成（ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ　ｃｒｅａｔｉｏｎ）の例を示す。図６６Ｆ）調節タンパク質機能の例を示す。図６６Ｇ）スプライシング調節の例を示す。
【図６６Ｄ】Ａ＞Ｇ　ＲＮＡエディタを有する全ての潜在的なコドン変化の実証。図６６Ａ）Ａ＞Ｉ編集によって可能にされる全ての潜在的なコドン遷移の表。図６６Ｂ）Ａ＞Ｉ編集によって可能にされる全ての潜在的なコドン遷移を示すコドン表。図６６Ｃは、ＡＤＡＲ及びｄＣａｓ１３ｂによる遺伝子編集を示す。図６６Ｄ）ＡＤＡＲによるメンデル疾患を矯正する例を示す。図６６Ｅ）疾患予防対立遺伝子の多重作成（ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ　ｃｒｅａｔｉｏｎ）の例を示す。図６６Ｆ）調節タンパク質機能の例を示す。図６６Ｇ）スプライシング調節の例を示す。
【図６６Ｅ】Ａ＞Ｇ　ＲＮＡエディタを有する全ての潜在的なコドン変化の実証。図６６Ａ）Ａ＞Ｉ編集によって可能にされる全ての潜在的なコドン遷移の表。図６６Ｂ）Ａ＞Ｉ編集によって可能にされる全ての潜在的なコドン遷移を示すコドン表。図６６Ｃは、ＡＤＡＲ及びｄＣａｓ１３ｂによる遺伝子編集を示す。図６６Ｄ）ＡＤＡＲによるメンデル疾患を矯正する例を示す。図６６Ｅ）疾患予防対立遺伝子の多重作成（ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ　ｃｒｅａｔｉｏｎ）の例を示す。図６６Ｆ）調節タンパク質機能の例を示す。図６６Ｇ）スプライシング調節の例を示す。
【図６６Ｆ】Ａ＞Ｇ　ＲＮＡエディタを有する全ての潜在的なコドン変化の実証。図６６Ａ）Ａ＞Ｉ編集によって可能にされる全ての潜在的なコドン遷移の表。図６６Ｂ）Ａ＞Ｉ編集によって可能にされる全ての潜在的なコドン遷移を示すコドン表。図６６Ｃは、ＡＤＡＲ及びｄＣａｓ１３ｂによる遺伝子編集を示す。図６６Ｄ）ＡＤＡＲによるメンデル疾患を矯正する例を示す。図６６Ｅ）疾患予防対立遺伝子の多重作成（ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ　ｃｒｅａｔｉｏｎ）の例を示す。図６６Ｆ）調節タンパク質機能の例を示す。図６６Ｇ）スプライシング調節の例を示す。
【図６６Ｇ】Ａ＞Ｇ　ＲＮＡエディタを有する全ての潜在的なコドン変化の実証。図６６Ａ）Ａ＞Ｉ編集によって可能にされる全ての潜在的なコドン遷移の表。図６６Ｂ）Ａ＞Ｉ編集によって可能にされる全ての潜在的なコドン遷移を示すコドン表。図６６Ｃは、ＡＤＡＲ及びｄＣａｓ１３ｂによる遺伝子編集を示す。図６６Ｄ）ＡＤＡＲによるメンデル疾患を矯正する例を示す。図６６Ｅ）疾患予防対立遺伝子の多重作成（ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ　ｃｒｅａｔｉｏｎ）の例を示す。図６６Ｆ）調節タンパク質機能の例を示す。図６６Ｇ）スプライシング調節の例を示す。
【０１１１】
【図６７】Ｐｓｐ　ｄＣａｓ１３ｂの追加的なトランケーション。
【０１１２】
【図６８】オフターゲット活性に対する用量の潜在的効果。
【０１１３】
【図６９】選別されたＡＤＡＲ変異の活性を示す。
【０１１４】

【図７０】異なるモチーフ上の変異Ｐ４６２Ａの活性を示す。
【０１１５】
【図７１】変異Ｐ４６２がモチーフを改善したことを示す。
【０１１６】
【図７２】Ｎ５７９Ｉを特定したＡＤＡＲ変異スクリーニングの活性を示す。
【０１１７】
【図７３】Ｎ５７９Ｉの検証を示す。
【０１１８】
【図７４】３０ｂｐガイドを有するＲＥＳＣＵＥｖ３の性能を示す。
【０１１９】
【図７５】５０ｂｐガイド及び３０ｂｐガイドと様々なＡＤＡＲ変異体との比較を示す。
【０１２０】
【図７６】ＡＤＡＲ変異の活性がＣａｓ１３依存的であったことを示す。　本明細書における図面は、例示の目的のみのためにあり、必ずしも縮尺どおりに描画されるものではない。
【発明を実施するための形態】
【０１２１】
全般的定義
　別途定義されない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本開示が関連する当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。分子生物学における一般的な用語及び技術の定義は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９）（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ，ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ）、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，４ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１２）（Ｇｒｅｅｎ ａｎｄ Ｓａｍｂｒｏｏｋ）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９８７）（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．）、シリーズＭｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）、ＰＣＲ ２：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（１９９５）（Ｍ．Ｊ．ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ，Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ，ａｎｄ Ｇ．Ｒ．Ｔａｙｌｏｒ ｅｄｓ．）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｏｔｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９８８）（Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，ｅｄｓ．）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａ Ｌａｂｏｒａｏｔｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ ２０１３（Ｅ．Ａ．Ｇｒｅｅｎｆｉｅｌｄ ｅｄ．）、Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（１９８７）（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，ｅｄ．）、Ｂｅｎｊａｍｉｎ Ｌｅｗｉｎ，Ｇｅｎｅｓ ＩＸ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｂｙ Ｊｏｎｅｓ ａｎｄ Ｂａｒｔｌｅｔ，２００８（ＩＳＢＮ ０７６３７５２２２３）、Ｋｅｎｄｒｅｗ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｔｈｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｂｙ Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｌｔｄ．，１９９４（ＩＳＢＮ ０６３２０２１８２９）、Ｒｏｂｅｒｔ Ａ．Ｍｅｙｅｒｓ（ｅｄ．），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：ａ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｂｙ ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．，１９９５（ＩＳＢＮ ９７８０４７１１８５７１０）、Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２ｎｄ ｅｄ．，Ｊ．Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．１９９４）、Ｍａｒｃｈ，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ４ｔｈ ｅｄ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．１９９２）、及びＭａｒｔｅｎ Ｈ．Ｈｏｆｋｅｒ ａｎｄ Ｊａｎ ｖａｎ Ｄｅｕｒｓｅｎ，Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｍｏｕｓｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１１）において発見さ

れ得る。

【０１２２】

２０１６年６月１７日に出願された米国仮第６２／３５１，６６２号及び第６２／３５１，８０３号、２０１６年８月１７日に出願された米国仮第６２／３７６，３７７号、２０１６年１０月１９日に出願された米国仮第６２／４１０，３６６号、２０１６年１２月９日に出願された米国仮第６２／４３２，２４０号、２０１７年３月１５日に出願された米国仮第６２／４７１，７９２号、及び２０１７年４月１２日に出願された米国仮第６２／４８４，７８６号を参照されたい。２０１７年６月１９日に出願された国際ＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０３８１５４号を参照されたい。２０１７年３月１５日に出願されたＵＳ仮第６２／４７１，７１０号（「Ｎｏｖｅｌ　Ｃａｓ１３Ｂ　Ｏｒｔｈｏｌｏｇｕｅｓ　ＣＲＩＳＰＲ　Ｅｎｚｙｍｅｓ　ａｎｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ」と題された、代理人整理番号：ＢＩ－１０１５７　ＶＰ　４７６２７．０４．２１４９）を参照されたい。２０１６年１２月９日に出願されたＵＳ仮第６２／４３２，５５３号、２０１７年２月８日に出願されたＵＳ仮第６２／４５６，６４５号、及び２０１７年３月１５日に出願されたＵＳ仮第６２／４７１，９３０号（「ＣＲＩＳＰＲ　Ｅｆｆｅｃｔｏｒ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｂａｓｅｄ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ」と題された、代理人整理番号ＢＩ－１０１２１　ＢＲＯＤ　０８４２Ｐ）及び、２０１７年４月１２日に出願され譲渡される予定のＵＳ仮（「ＣＲＩＳＰＲ　Ｅｆｆｅｃｔｏｒ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｂａｓｅｄ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ」、代理人整理番号ＢＩ－１０１２１　ＢＲＯＤ　０８４３Ｐ）をさらに参照されたい。

【０１２３】

本明細書で使用されるように、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、文脈がそうでないことを明確に指示しない限り単数形及び複数形の両方を含む。

【０１２４】

用語「任意選択の」または「任意選択で」は、その後の記載された事象、状況または置換基が、発生することができるか、または発生することができない場合があることと、説明が、事象または状況が発生する例及び発生しない例を含むことと、を含む。

【０１２５】

エンドポイントによる数値範囲の列挙は、それぞれの範囲内に包含される全ての数及び分数、同様に列挙されたエンドポイントを含む。

【０１２６】

パラメータ、量、持続時間などのような測定可能な値を指す場合、本明細書で使用される用語「約」または「およそ」は、かかる変形例が開示された発明において実行するのに適切である限り、指定された値の＋／－１０％以下、＋／－５％以下、＋／－１％以下、及び＋／－０．１％以下の変形例のような指定された値の変形例及び指定された値からの変形例を包含することを意味する。修飾語「約」または「およそ」が参照する値がそれ自体でも明確に、かつ好ましく開示されることが理解されるであろう。

【０１２７】

本明細書全体を通じた「一実施形態」、「実施形態」、「例示的実施形態」への参照は、実施形態に関連して記載される特定の特徴、構造、または特徴が、本発明の少なくとも１つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体にわたる様々な場所における「一実施形態では」、「実施形態では」、または「例示的実施形態」という語句の出現は、必ずしも全てが同じ実施形態を指すものではないが、指すことができる。さらに、特定の特徴、構造または特徴は、１つ以上の実施形態において、本開示から当業者に明らかであろうように、任意の好適な様式で組み合わされ得る。さらに、本明細書に記載のいくつかの実施形態は、他の実施形態に含まれる他のものではないいくつかの特徴を含むが、異なる実施形態の特徴の組み合わせは、本発明の範囲内であることが意味される。例えば、添付の特許請求の範囲において、特許請求の範囲の実施形態のいずれかは、任意の組み合わせで使用され得る。

【０１２８】

Ｃ２ｃ２は、現在Ｃａｓ１３ａとして知られる。本明細書における用語「Ｃ２ｃ２」が「Ｃａｓ１３ａ」と互換的に使用されることが理解されるであろう。

【０１２９】

本明細書に引用される全ての刊行物、公開された特許文献、及び特許出願は、各個別の刊行物、公開された特許文献、または特許出願が、参照により組み込まれると具体的かつ個別に示されたのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１３０】

以下、様々な実施形態が記載される。具体的な実施形態が、徹底的な説明として、または本明細書で論じられるより広範な態様への限定として意図されるものではないことに注目されたい。特定の実施形態と共に記載される一態様は、必ずしもその実施形態に限定されず、任意の他の実施形態（複数可）と併せて実施され得る。

【０１３１】

概観

本明細書に開示される実施形態は、標的化された塩基編集のためのシステム、構築物、及び方法を提供する。一般に、本明細書に開示されるシステムは、標的化成分及び塩基編集成分を含む。標的化成分は、１つ以上のヌクレオチドが編集される標的ヌクレオチド配列に対して塩基編集成分に特異的に標的化するように機能する。そして、塩基編集成分は、標的配列における第１のヌクレオチドを第２のヌクレオチドに変換する化学反応を触媒することができる。例えば、塩基エディタは、アデニンが細胞の転写または翻訳機構によってグアニンとして読み取られ、その逆も同様であるように、アデニンの変換を触媒することができる。同様に、塩基編集成分は、シチジンのウラシルへの変換、またはその逆も同様に触媒することができる。ある特定の例示的実施形態において、塩基エディタは、アデニンデアミナーゼまたはシチジンデアミナーゼのような既知の塩基エディタで開始することにより送達され得、新しい機能性を誘導するために指向性進化のような方法を使用して修飾され得る。指向性進化技術は、当該技術分野において既知であり、ＷＯ２０１５／１８４０１６「Ｈｉｇｈ－Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ　ｏｆ　Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ｐｅｒｍｕａｔａｔｉｏｎｓ」に記載のものを含むことができる。

【０１３２】

ある特定の例示的実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、ＲＮＡ結合タンパク質またはそのＲＮＡ結合機能的ドメインへの融合または連結によって目的の標的座位に動員される。ＲＮＡ結合タンパク質は、標的座位でまたは標的座位に隣接する配列、モチーフ、または構造的特徴に結合することができる。構造特徴は、ヘアピン、テトラループ、または核酸の他の二次構造特徴を含むことができる。本明細書で使用される場合、「隣接する」とは、アデノシンデアミナーゼがその塩基編集機能を完了することができる標的座位の距離及び／または配向内を意味する。ある特定の例示的実施形態では、ＲＮＡ結合タンパク質またはその機能的ドメインは、ガイド分子の配列、モチーフ、または構造配列に結合することができる。ガイド分子は、目的の標的座位にハイブリダイズし、それによってアデノシンデアミナーゼを標的座位に導く配列を含む。

【０１３３】

ある特定の例示的実施形態では、ＲＮＡ結合タンパク質またはその機能的ドメインは、ＲＮＡ認識モチーフを含む。ＲＮＡ認識モチーフを含む例示的なＲＮＡ結合タンパク質は、Ａ２ＢＰ１、ＡＣＦ、ＢＯＬＬ、ＢＲＵＮＯＬ４、ＢＲＵＮＯＬ５、ＢＲＵＮＯＬ６、ＣＣＢＬ２、ＣＧＩ９６、ＣＩＲＢＰ、ＣＮＯＴ４、ＣＰＥＢ２、ＣＰＥＢ３、ＣＰＥＢ４、ＣＰＳＦ７、ＣＳＴＦ２、ＣＳＴＦ２Ｔ、ＣＵＧＢＰ１、ＣＵＧＢＰ２、Ｄ１０Ｓ１０２、ＤＡＺ１、ＤＡＺ２、ＤＡＺ３、ＤＡＺ４、ＤＡＺＡＰ１、ＤＡＺＬ、ＤＮＡＪＣ１７、ＤＮＤ１、ＥＩＦ３Ｓ４、ＥＩＦ３Ｓ９、ＥＩＦ４Ｂ、ＥＩＦ４Ｈ、ＥＬＡＶＬ１、ＥＬＡＶＬ２、ＥＬＡＶＬ３、ＥＬＡＶＬ４、ＥＮＯＸ１、ＥＮＯＸ２、ＥＷＳＲ１、ＦＵＳ、ＦＵＳＩＰ１、Ｇ３ＢＰ、Ｇ３ＢＰ１、Ｇ３ＢＰ２、ＧＲＳＦ１、ＨＮＲＮＰＬ、ＨＮＲＰＡ０、ＨＮＲＰＡ１、ＨＮＲＰＡ２Ｂ１、ＨＮＲＰＡ３、ＨＮＲＰＡＢ、ＨＮＲＰＣ、ＨＮＲＰＣＬ１、ＨＮＲＰＤ、ＨＮＲＰＤＬ、ＨＮＲＰＦ、ＨＮＲＰＨ１、ＨＮ

ＲＰＨ２、ＨＮＲＰＨ３、ＨＮＲＰＬ、ＨＮＲＰＬＬ、ＨＮＲＰＭ、ＨＮＲＰＲ、ＨＲＮＢＰ１、ＨＳＵ５３２０９、ＨＴＡＴＳＦ１、ＩＧＦ２ＢＰ１、ＩＧＦ２ＢＰ２、ＩＧＦ２ＢＰ３、ＬＡＲＰ７、ＭＫＩ６７ＩＰ、ＭＳＩ１、ＭＳＩ２、ＭＳＳＰ２、ＭＴＨＦＳＤ、ＭＹＥＦ２、ＮＣＢＰ２、ＮＣＬ、ＮＯＬ８、ＮＯＮＯ、Ｐ１４、ＰＡＢＰＣ１、ＰＡＢＰＣ１Ｌ、ＰＡＢＰＣ３、ＰＡＢＰＣ４、ＰＡＢＰＣ５、ＰＡＢＰＮ１、ＰＯＬＤＩＰ３、ＰＰＡＲＧＣ１、ＰＰＡＲＧＣ１Ａ、ＰＰＡＲＧＣ１Ｂ、ＰＰＩＥ、ＰＰＩＬ４、ＰＰＲＣ１、ＰＳＰＣ１、ＰＴＢＰ１、ＰＴＢＰ２、ＰＵＦ６０、ＲＡＬＹ、ＲＡＬＹＬ、ＲＡＶＥＲ１、ＲＡＶＥＲ２、ＲＢＭ１０、ＲＢＭ１１、ＲＢＭ１２、ＲＢＭ１２Ｂ、ＲＢＭ１４、ＲＢＭ１５、ＲＢＭ１５Ｂ、ＲＢＭ１６、ＲＢＭ１７、ＲＢＭ１８、ＲＢＭ１９、ＲＢＭ２２、ＲＢＭ２３、ＲＢＭ２４、ＲＢＭ２５、ＲＢＭ２６、ＲＢＭ２７、ＲＢＭ２８、ＲＢＭ３、ＲＢＭ３２Ｂ、ＲＢＭ３３、ＲＢＭ３４、ＲＢＭ３５Ａ、ＲＢＭ３５Ｂ、ＲＢＭ３８、ＲＢＭ３９、ＲＢＭ４、ＲＢＭ４１、ＲＢＭ４２、ＲＢＭ４４、ＲＢＭ４５、ＲＢＭ４６、ＲＢＭ４７、ＲＢＭ４Ｂ、ＲＢＭ５、ＲＢＭ７、ＲＢＭ８Ａ、ＲＢＭ９、ＲＢＭＳ１、ＲＢＭＳ２、ＲＢＭＳ３、ＲＢＭＸ、ＲＢＭＸ２、ＲＢＭＸＬ２、ＲＢＭＹ１Ａ１、ＲＢＭＹ１Ｂ、ＲＢＭＹ１Ｅ、ＲＢＭＹ１Ｆ、ＲＢＭＹ２ＦＰ、ＲＢＰＭＳ、ＲＢＰＭＳ２、ＲＤＢＰ、ＲＮＰＣ３、ＲＮＰＣ４、ＲＮＰＳ１、ＲＯＤ１、ＳＡＦＢ、ＳＡＦＢ２、ＳＡＲＴ３、ＳＥＴＤ１Ａ、ＳＦ３Ｂ１４、ＳＦ３Ｂ４、ＳＦＰＱ、ＳＦＲＳ１、ＳＦＲＳ１０、ＳＦＲＳ１１、ＳＦＲＳ１２、ＳＦＲＳ１５、ＳＦＲＳ２、ＳＦＲＳ２Ｂ、ＳＦＲＳ３、ＳＦＲＳ４、ＳＦＲＳ５、ＳＦＲＳ６、ＳＦＲＳ７、ＳＦＲＳ９、ＳＬＩＲＰ、ＳＬＴＭ、ＳＮＲＰ７０、ＳＮＲＰＡ、ＳＮＲＰＢ２、ＳＰＥＮ、ＳＲ１４０、ＳＲＲＰ３５、ＳＳＢ、ＳＹＮＣＲＩＰ、ＴＡＦ１５、ＴＡＲＤＢＰ、ＴＨＯＣ４、ＴＩＡ１、ＴＩＡＬ１、ＴＮＲＣ４、ＴＮＲＣ６Ｃ、ＴＲＡ２Ａ、ＴＲＳＰＡＰ１、ＴＵＴ１、Ｕ１ＳＮＲＮＰＢＰ、Ｕ２ＡＦ１、Ｕ２ＡＦ２、ＵＨＭＫ１、ＺＣＲＢ１、ＺＮＦ６３８、ＺＲＳＲ１、及びＺＲＳＲ２を含むが、これらに限定されない。

【０１３４】

ある特定の例示的実施形態では、ＲＮＡ結合タンパク質またはその機能的タンパク質は、Ｋ相同ドメインを含むことができる。Ｋ相同ドメインを含む例示的なＲＮＡ結合タンパク質は、ＡＫＡＰ１、ＡＮＫＨＤ１、ＡＮＫＲＤ１７、ＡＳＣＣ１、ＢＩＣＣ１、ＤＤＸ４３、ＤＤＸ５３、ＤＰＰＡ５、ＦＭＲ１、ＦＵＢＰ１、ＦＵＢＰ３、ＦＸＲ１、ＦＸＲ２、ＧＬＤ１、ＨＤＬＢＰ、ＨＮＲＰＫ、ＩＧＦ２ＢＰ１、ＩＧＦ２ＢＰ２、ＩＧＦ２ＢＰ３、ＫＨＤＲＢＳ１、ＫＨＤＲＢＳ２、ＫＨＤＲＢＳ３、ＫＨＳＲＰ、ＫＲＲ１、ＭＥＸ３Ａ、ＭＥＸ３Ｂ、ＭＥＸ３Ｃ、ＭＥＸ３Ｄ、ＮＯＶＡ１、ＮＯＶＡ２、ＰＣＢＰ１、ＰＣＢＰ２、ＰＣＢＰ３、ＰＣＢＰ４、ＰＮＯ１、ＰＮＰＴ１、ＱＫＩ、ＳＦ１、及びＴＤＲＫＨを含むが、これらに限定されない。

【０１３５】

ある特定の例示的実施形態では、ＲＮＡ結合タンパク質は、ジンクフィンガーモチーフを含む。ＲＮＡ結合タンパク質またはその機能的ドメインは、Ｃｙｓ２－Ｈｉｓ２、Ｇａｇ－ｋｎｕｃｋｌｅ、Ｔｒｅｂｌｅ－ｃｌｅｔ、ジンクリボン、Ｚｎ２／Ｃｙｓ６クラスモチーフを含むことができる。

【０１３６】

ある特定の例示的実施形態では、ＲＮＡ結合タンパク質は、Ｐｕｍｉｌｉｏ相同ドメインを含むことができる。

【０１３７】

一態様では、本発明は、ＲＮＡにおいて、より具体的には目的のＲＮＡ配列において、アデニンの標的化脱アミノのための方法を提供する。本発明の方法によれば、アデノシンデアミナーゼ（ＡＤ）タンパク質は、標的配列に特異的に結合することができるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体によって、目的のＲＮＡ配列における適切なアデニンに特異的に動員される。このことを達成するために、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ酵素に共有結合で連結され得るか、または別個のタンパク質として提供され得るが、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体へのそれらの動員を確実にするように適合され得る。

【０１３８】
本発明の方法の特定の実施形態では、アデノシンデアミナーゼの標的座位への動員は、アデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインをＣａｓ１３タンパク質であるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質に融合させることによって確実にされる。２つの別個のタンパク質から融合タンパク質を生成する方法は、当該技術分野において既知であり、典型的には、スペーサーまたはリンカーの使用を伴う。Ｃａｓ１３タンパク質は、そのＮ末端またはＣ末端のいずれかの上でアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインに融合され得る。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、不活性または死んだＣａｓ１３タンパク質であり、デアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインのＮ末端に連結される。

【０１３９】
融合タンパク質に関して使用される用語「リンカー」は、タンパク質を結合して融合タンパク質を形成する分子を指す。一般に、かかる分子は、タンパク質間のある程度の最小距離または他の空間関係を結合または維持するため以外に特異的な生物学的活性を有しない。しかしながら、ある特定の実施形態では、リンカーは、リンカーの折り畳み、正味電荷、または疎水性のようなリンカー及び／または融合タンパク質のいくつかの特性に影響を与えるように選択され得る。

【０１４０】
本発明の方法における使用に適したリンカーは、当業者に周知であり、直鎖または分枝鎖炭素リンカー、複素環式炭素リンカー、またはペプチドリンカーを含むが、これらに限定されない。しかしながら、本明細書で使用される場合、リンカーは、共有結合（炭素－炭素結合または炭素－ヘテロ原子結合）でもあり得る。特定の実施形態では、リンカーは、各タンパク質がその必要な機能特性を保持することを確実にする十分な距離でＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質とアデノシンデアミナーゼを分離するために使用される。好ましいペプチドリンカー配列は、可撓性伸長構造を採用し、順序付き二次構造を開発する傾向を示さない。ある特定の実施形態では、リンカーは、単量体、二量体、多量体、または重合体であり得る化学的部分であり得る。好ましくは、リンカーはアミノ酸を含む。可撓性リンカーにおける典型的なアミノ酸は、Ｇｌｙ、Ａｓｎ及びＳｅｒを含む。したがって、特定の実施形態では、リンカーは、Ｇｌｙ、Ａｓｎ及びＳｅｒアミノ酸のうちの１つ以上の組み合わせを含む。Ｔｈｒ及びＡｌａのような他の中性近傍のアミノ酸は、リンカー配列においても使用され得る。例示的なリンカーは、Ｍａｒａｔｅａ ｅｔ ａｌ．（１９８５），Ｇｅｎｅ ４０：３９－４６、Ｍｕｒｐｈｙ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８３：８２５８－６２、Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．４，９３５，２３３、及びＵ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．４，７５１，１８０において開示される。例えば、ＧｌｙＳｅｒリンカーＧＧＳ、ＧＧＧＳ、またはＧＳＧが、使用され得る。ＧＧＳ、ＧＳＧ、ＧＧＧＳ、またはＧＧＧＧＳリンカーは、好適な長さを提供するために、３（（ＧＧＳ）３（配列番号１２）、（ＧＧＧＧＳ）３のような）または５、６、７、９、または１２（配列番号１３）またはそれ以上の反復において使用され得る。特定の実施形態では、（ＧＧＧＧＳ）３のようなリンカーは、本明細書において好ましく使用される。（ＧＧＧＧＳ）６（ＧＧＧＧＳ）９または（ＧＧＧＧＳ）１２は、代替として好ましく使用され得る。他の好ましい代替手段は、（ＧＧＧＧＳ）１（配列番号１４）、（ＧＧＧＧＳ）２（配列番号１５）、（ＧＧＧＧＳ）４、（ＧＧＧＧＳ）５、（ＧＧＧＧＳ）７、（ＧＧＧＧＳ）８、（ＧＧＧＧＳ）１０、または（ＧＧＧＧＳ）１１である。またさらなる実施形態では、ＬＥＰＧＥＫＰＹＫＣＰＥＣＧＫＳＦＳＱＳＧＡＬＴＲＨＱＲＴＨＴＲ（配列番号１１）は、リンカーとして使用される。また追加的な実施形態では、リンカーは、ＸＴＥＮリンカーである。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ１３タンパク質であり、ＬＥＰＧＥＫＰＹＫＣＰＥＣＧＫＳＦＳＱＳＧＡＬＴＲＨＱＲＴＨＴＲ（配列番号１１）リンカーの手段によってデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインに連結される。さらに特定の実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質は、ＬＥＰＧＥＫＰＹＫＣＰＥＣＧＫＳＦＳＱＳＧＡＬＴＲＨＱＲＴＨＴＲ（配列番

号１１）リンカーの手段によってデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインのＮ末端にＣ末端で連結される。加えて、Ｎ末端及びＣ末端ＮＬＳは、リンカー（例えば、ＰＫＫＫＲＫＶＥＡＳＳＰＫＫＲＫＶＥＡＳ（配列番号１６））としても機能することができる。

【０１４１】

本発明の方法の特定の実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、細胞に送達されるか、または細胞内で別個のタンパク質として発現されるが、Ｃａｓ１３タンパク質またはガイド分子のいずれかに連結できるように修飾される。特定の実施形態では、このことは、バクテリオファージ外被タンパク質の多様性内に存在する直交ＲＮＡ結合タンパク質またはアダプタータンパク質／アプタマー組み合わせの使用によって確実にされる。かかる外被タンパク質の例は、ＭＳ２、Ｑβ、Ｆ２、ＧＡ、ｆｒ、ＪＰ５０１、Ｍ１２、Ｒ１７、ＢＺ１３、ＪＰ３４、ＪＰ５００、ＫＵ１、Ｍ１１、ＭＸ１、ＴＷ１８、ＶＫ、ＳＰ、ＦＩ、ＩＤ２、ＮＬ９５、ＴＷ１９、ＡＰ２０５、φＣｂ５、φＣｂ８ｒ、φＣｂ１２ｒ、φＣｂ２３ｒ、７ｓ、及びＰＲＲ１を含むが、これらに限定されない。アプタマーは、特定の標的に結合するために、インビトロ選択またはＳＥＬＥＸ（指数的濃縮によるリガンドの系統的進化）の繰り返しラウンドを通じて操作されている天然型のまたは合成オリゴヌクレオチドであり得る。

【０１４２】

本発明の方法及びシステムの特定の実施形態では、ガイド分子は、アダプタータンパク質を動員することができる１つ以上の異なるＲＮＡループ（複数可）または異なる配列（複数可）が提供される。ガイド分子は、異なるＲＮＡループ（複数可）または異なる配列（複数可）に結合することができるアダプタータンパク質を動員することができる異なるＲＮＡループ（複数可）または異なる配列（複数可）の挿入によって、Ｃａｓ１３タンパク質と衝突することなく延長され得る。エフェクタードメインのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体への動員における修飾されたガイド及びそれらの使用の例は、Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ（Ｎａｔｕｒｅ　２０１５，５１７（７５３６）：５８３－５８８）に提供される。特定の実施形態では、アプタマーは、哺乳動物細胞内における二量体化ＭＳ２バクテリオファージ外被タンパク質に選択的に結合し、ステムループ及び／またはテトラループにおけるようなガイド分子に導入される最小ヘアピンアプタマーである。これらの実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、ＭＳ２に融合される。そして、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び対応するガイドＲＮＡと共に共送達される。

【０１４３】

本明細書で使用される用語「ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム」は、（ａ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、より具体的には触媒的に不活性であるＣａｓ１３タンパク質、（ｂ）ガイド配列を含むガイド分子、及び（ｃ）アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを含む核酸標的化及び編集システムを指し、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはガイド分子に共有結合または非共有結合的で連結されているか、または送達後にそれらに連結するように適合されており、ガイド配列は、標的配列に実質的に相補的であるが、脱アミノのために標的化されているＡに対応する非対合Ｃを含み、ガイド配列及び標的配列によって形成されるＲＮＡ二本鎖においてＡ－Ｃミスマッチをもたらす。真核細胞における用途について、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び／またはアデノシンデアミナーゼは、好ましくＮＬＳ標識される。

【０１４４】

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

【０１４５】

いくつかの実施形態では、成分（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ

タンパク質、アデノシンデアミナーゼタンパク質、及び任意選択でアダプタータンパク質をコードする１つ以上のガイドＲＮＡ及び１つ以上のｍＲＮＡ分子のような１つ以上のＲＮＡ分子として細胞に送達される。ＲＮＡ分子は、１つ以上の脂質ナノ粒子を介して送達され得る。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、成分（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）は、１つ以上のＤＮＡ分子として細胞に送達される。いくつかの実施形態では、１つ以上のＤＮＡ分子は、ウイルスベクター（例えば、ＡＡＶ）のような１つ以上のベクター内に含まれる。いくつかの実施形態では、１つ以上のＤＮＡ分子は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、ガイド分子、及びアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインを発現するように動作可能に構成された１つ以上の調節エレメントを含み、任意選択で、該１つ以上の調節エレメントは誘導性プロモーターを含む。

【０１４７】

いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、死んだＣａｓ１３である。いくつかの実施形態では、死んだＣａｓ１３は、ＨＥＰＮドメインにおける１つ以上の変異を含む死んだＣａｓ１３ａタンパク質である。いくつかの実施形態では、死んだＣａｓ１３ａは、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ　ｗａｄｅｉにおけるＲ４７４Ａ及びＲ１０４６Ａに対応する変異（ＬｗａＣａｓ１３ａ）を含む。いくつかの実施形態では、死んだＣａｓ１３は、Ｂｅｒｇｅｙｅｌｌａ　ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ　ＡＴＣＣ　４３７６７に由来するＣａｓ１３ｂタンパク質のＲ１１６Ａ、Ｈ１２１Ａ、Ｒ１１７７Ａ、Ｈ１１８２Ａのうちの１つ以上、またはＣａｓ１３ｂオーソログのそれらに対応するアミノ酸位置を含む死んだＣａｓ１３ｂである。

【０１４８】

ガイドのいくつかの実施形態では、分子は、該アデニンと反対側の非対合シトシンを含むＲＮＡ二本鎖を形成するためのＲＮＡ配列内で脱アミノされるアデニンを含む標的配列とハイブリダイズすることができる。ＲＮＡ二本鎖形成時、ガイド分子は、Ｃａｓ１３タンパク質と複合体を形成し、目的の標的ＲＮＡ配列でＲＮＡポリヌクレオチドに結合するよう複合体を導く。ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムのガイドの態様に関する詳細は、以下の本明細書に提供される。

【０１４９】

いくつかの実施形態では、例えば、ＬａｗＣａｓ１３の基準長を有するＣａｓ１３ガイドＲＮＡは、標的ＤＮＡとＲＮＡ二本鎖を形成するために使用される。いくつかの実施形態では、例えば、ＬａｗＣａｓ１３ａのための基準長より長いＣａｓ１３ガイド分子は、Ｃａｓ１３ガイドＲＮＡ標的ＤＮＡ複合体の外側を含む標的ＤＮＡとＲＮＡ二本鎖を形成するために使用される。

【０１５０】

少なくとも第１の設計では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、（ａ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質と融合または連結したアデノシンデアミナーゼであって、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は触媒的に不活性であるアデノシンデアミナーゼと、及び（ｂ）ガイド配列と標的配列との間に形成されるＲＮＡ二本鎖にＡ－Ｃミスマッチを導入するように設計されたガイド配列を含むガイド分子と、を含む。いくつかの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び／またはアデノシンデアミナーゼは、Ｎ末端またはＣ末端または両方のいずれかでＮＬＳ標識される。

【０１５１】

少なくとも第２の設計では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、（ａ）触媒的に不活性であるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質と、（ｂ）ガイド配列と標的配列との間に形成されるＲＮＡ二本鎖にＡ－Ｃミスマッチを導入するように設計されたガイド配列、及びアダプタータンパク質（例えば、ＭＳ２コーティングタンパク質またはＰＰ７外被タンパク質）に結合することができるアプタマー配列（例えば、ＭＳ２　ＲＮＡモチーフまたはＰＰ７　ＲＮＡモチーフ）を含むガイド分子と、（ｃ）アダプタータンパク質に融合または

連結されたアデノシンデアミナーゼであって、アプタマー及びアダプタータンパク質の結合が、Ａ－ＣミスマッチのＡでの標的化脱アミノのために、ガイド配列と標的配列との間に形成されるＲＮＡ二本鎖にアデノシンデアミナーゼを動員するアデノシンデアミナーゼと、を含む。いくつかの実施形態では、アダプタータンパク質及び／またはアデノシンデアミナーゼは、Ｎ末端またはＣ末端または両方のいずれかでＮＬＳ標識される。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質はまた、ＮＬＳ標識され得る。

【０１５２】

異なるアプタマー及び対応するアダプタータンパク質の使用は、直交遺伝子編集が実施されることも可能にする。アデノシンデアミナーゼが直交遺伝子編集／脱アミノのためにシチジンデアミナーゼと組み合わせて使用される一例では、異なる座位を標的化するｓｇＲＮＡは、ＭＳ２－アデノシンデアミナーゼ及びＰＰ７－シチジンデアミナーゼ（またはＰＰ７－アデノシンデアミナーゼ及びＭＳ２－シチジンデアミナーゼ）をそれぞれ動員するために異なるＲＮＡループで修飾され、それぞれ目的の標的座位でＡまたはＣの直交脱アミノをもたらす。ＰＰ７は、バクテリオファージＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓのＲＮＡ結合外被タンパク質である。ＭＳ２と同様に、ＰＰ７は、特異的ＲＮＡ配列及び二次構造に結合する。ＰＰ７　ＲＮＡ認識モチーフは、ＭＳ２のものとは異なる。その結果、ＰＰ７及びＭＳ２は、同時に異なるゲノム座位で異なる効果を媒介するよう多重化され（ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｅｄ）得る。例えば、ｓｇＲＮＡ標的化座位Ａは、ＭＳ２アデノシンデアミナーゼを動員してＭＳ２ループで修飾され得、別のｓｇＲＮＡ標的化座位Ｂは、ＰＰ７シチジンデアミナーゼを動員してＰＰ７ループで修飾され得る。したがって、同じ細胞では、直交の座位特異的修飾が実現される。この原理は、他の直交ＲＮＡ結合タンパク質を組み込むために延長され得る。

【０１５３】

少なくとも第３の設計では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、（ａ）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の内部ループまたは非構造領域に挿入されるアデノシンデアミナーゼであって、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質が触媒的に不活性またはニッカーゼである、アデノシンデアミナーゼと、（ｂ）ガイド配列と標的配列との間に形成されるＲＮＡ二本鎖にＡ－Ｃミスマッチを導入するように設計されたガイド配列を含むガイド分子と、を含む。

【０１５４】

アデノシンデアミナーゼの挿入に適したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質分割部位は、結晶構造の支援で特定され得る。オーソログと意図されるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質との間に比較的高い相同性が存在する場合、オーソログの結晶構造が使用され得る。

【０１５５】

分割位置は、領域またはループ内に位置され得る。好ましくは、アミノ酸配列の中断が構造特徴（例えば、アルファヘリックスまたはβシート）の部分的または完全な破壊をもたらさない場合、分割位置が生じる。非構造領域（これらの領域は結晶において「凍結」されるほど十分に構造化されていないため、結晶構造に現れなかった領域）は、好ましい選択肢であることが多い。非構造化領域または外部ループ内の位置は、正確には上記に提供される数値である必要はないが、分割位置が外部ループの非構造化領域内にある限り、例えば、ループのサイズに応じて、上記に挙げられた位置のいずれかの側の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個ものアミノ酸によって変化することができる。

【０１５６】

本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、脱アミノのためのＲＮＡポリヌクレオチド配列内の特定のアデニンを標的化するために使用され得る。例えば、ガイド分子は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質と複合体を形成することができ、目的のＲＮＡポリヌクレオチドにおける標的ＲＮＡ配列に結合するように複合体を導く。ガイド配列は非対合Ｃを有するように設計されているため、ガイド配列と標的配列との間に形成されるＲＮＡ二本鎖は、アデノシンデアミナーゼが非対合Ｃとは反対のＡに接触して脱アミノし、Ａをイノシン（Ｉ）に変換するＡ－Ｃミスマッチを含む。イノシン（Ｉ）塩基がＣと対合

し細胞過程においてＧのように機能するため、本明細書に記載のＡの標的化された脱アミノは、望ましくないＧ－Ａ及びＣ－Ｔ変異の補正について、同様に望ましいＡ－Ｇ及びＴ－Ｃ変異を得ることについて有用である。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、インビトロでのＲＮＡポリヌクレオチド分子における標的化された脱アミノに使用される。いくつかの実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、細胞内のＤＮＡ分子における標的化された脱アミノに使用される。細胞は、動物細胞、哺乳動物細胞、ヒト、または植物細胞のような真核細胞であり得る。

【０１５８】

本発明は、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを使用した標的化された脱アミノによる疾患を治療または予防する方法にも関し、病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ点変異を含有する転写産物によって引き起こされる疾患を治療するＡの脱アミノ。本発明で治療または予防され得る疾患の例は、がん、Ｍｅｉｅｒ－Ｇｏｒｌｉｎ症候群、Ｓｅｃｋｅｌ症候群４、Ｊｏｕｂｅｒｔ症候群５、Ｌｅｂｅｒ先天性黒内障１０、２型Ｃｈａｒｃｏｔ－Ｍａｒｉｅ－Ｔｏｏｔｈ病、２型Ｃｈａｒｃｏｔ－Ｍａｒｉｅ－Ｔｏｏｔｈ病、２Ｃ型Ｕｓｈｅｒ症候群、脊髄小脳失調症２８、脊髄小脳失調症２８、脊髄小脳失調症２８、ＱＴ延長症候群２、Ｓｊｏｇｒｅｎ－Ｌａｒｓｓｏｎ症候群、遺伝性果糖尿症、遺伝性果糖尿症、神経芽細胞腫、神経芽細胞腫、Ｋａｌｌｍａｎｎ症候群１、Ｋａｌｌｍａｎｎ症候群１、Ｋａｌｌｍａｎｎ症候群１、異染性白質ジストロフィーを含む。

【０１５９】

したがって、特定の実施形態では、本発明は療法における使用のための組成物を含む。このことは、方法がインビボ、エクスビボ、またはインビトロで実行され得ることを意味する。特定の実施形態では、方法は、動物もしくはヒト体の治療の方法またはヒト細胞の生殖系遺伝的同一性を修飾するための方法ではない。特定の実施形態では、方法を行う際、標的ＲＮＡは、ヒトまたは動物細胞内に含まれない。特定の実施形態では、標的がヒトまたは動物標的である際、方法は、エクスビボまたはインビトロで行われる。

【０１６０】

本発明はまた、遺伝子の望ましくない活性をノックアウトまたはノックダウンするための方法に関し、遺伝子の転写産物でのＡの脱アミノは、機能の喪失をもたらす。例えば、一実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムによる標的化された脱アミノ酸化は、内因性遺伝子における中途終止コドンをもたらすナンセンス変異を引き起こすことができる。このことは内因性遺伝子の発現を改変することができ、編集された細胞において望ましい形質を引き起こすことができる。別の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムによる標的化された脱アミノは、内因性遺伝子における異なるアミノ酸残基のためのコードをもたらす非保存的ミスセンス変異を引き起こすことができる。このことは、発現される内因性遺伝子の機能を改変することができ、編集された細胞に望ましい形質を引き起こすこともできる。

【０１６１】

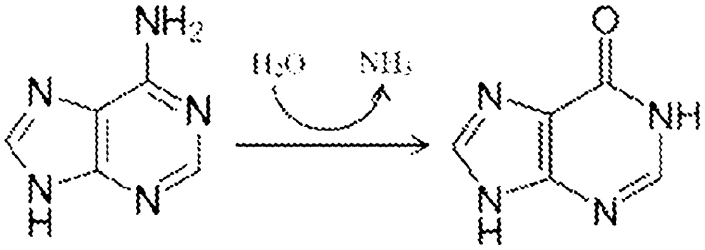
本発明は、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムまたはその後代を使用する標的化された脱アミノによって得られる修飾された細胞にも関し、修飾された細胞は、標的化された脱アミノ前の対応する細胞と比較して、目的の標的ＲＮＡ配列におけるＡを置き換えたＩまたはＧを含む。修飾された細胞は、動物細胞、植物細胞、哺乳動物細胞、またはヒト細胞のような真核細胞であり得る。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、修飾された細胞は、ＣＡＲ－Ｔ療法に適したＴ細胞のような治療用Ｔ細胞である。修飾は、免疫チェックポイント受容体（例えば、ＰＤＡ、ＣＴＬＡ４）の低減した発現、ＨＬＡタンパク質（例えば、Ｂ２Ｍ、ＨＬＡ－Ａ）の低減した発現、及び内因性ＴＣＲの低減した発現を含むが、これらに限定されない、治療用Ｔ細胞における１つ以上の望ましい形質をもたらすことができる。

【０１６３】
いくつかの実施形態では、修飾された細胞は、抗体産生Ｂ細胞である。修飾は、増強された抗体産生を含むが、これらに限定されない、Ｂ細胞における１つ以上の望ましい形質をもたらすことができる。
【０１６４】
本発明は、修飾された非ヒト動物または修飾された植物にも関する。修飾された非ヒト動物は、農場動物であり得る。修飾された植物は、農作物であり得る。
【０１６５】
本発明は、細胞療法のための方法にさらに関し、それを必要とする患者に、本明細書に記載の修飾された細胞を投与することを含み、修飾された細胞の存在は、患者における疾患を治療する。一実施形態では、細胞療法のための修飾された細胞は、腫瘍細胞を認識及び／または攻撃することができるＣＡＲ－Ｔ細胞である。別の実施形態では、細胞療法のための修飾された細胞は、神経幹細胞、間葉幹細胞、造血幹細胞、またはｉＰＳＣ細胞のような幹細胞である。
【０１６６】
本発明は、追加的に、目的の標的座位におけるアデニンを修飾するのに適した操作された非天然型のシステムに関し、ガイド配列またはガイド分子を含むガイド分子をコードするヌクレオチド配列、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質をコードする１つ以上のヌクレオチド配列、アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメイン、またはコードする１つ以上のヌクレオチド配列を含み、アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質もしくはガイド分子に共有結合もしくは非共有結合で連結されているか、または送達後にそれらに連結するように適合されており、ガイド配列は目的のＲＮＡポリヌクレオチド内のアデニンを含む標的配列とハイブリダイズすることができるが、アデニンに対応する位置でシトシンを含む。
【０１６７】
本発明は、追加的に、ガイド配列を含むガイド分子をコードする１つ以上のヌクレオチド配列に動作可能に連結される第１の調節エレメント、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結される第２の調節エレメント、及び任意選択で、第１もしくは第２の調節エレメントの制御下にあるか、または第３の調節エレメントに動作可能に連結されるアデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む１つ以上のベクターを含み、アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列が第３の調節エレメントに動作可能に連結される場合、アデノシンデアミナーゼタンパク質もしくはその触媒ドメインは、発現後にガイド分子もしくはＣｒｉｓｐｒ－Ｃａｓタンパク質に連結するように適合され、ガイド配列は、標的座位内のアデニンを含む標的配列とハイブリダイズすることができるが、アデニンに対応する位置でシトシンを含み、成分（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）は、システムの同一または異なるベクター上に位置する、操作された非天然型のベクターに関する。
【０１６８】
本発明は、本明細書に記載の操作された非天然型のシステムまたはベクターシステムを含む、インビトロ、エクスビボ、またはインビボ宿主細胞または細胞株またはその後代に追加的に関する。宿主細胞は、動物細胞、植物細胞、哺乳動物細胞、またはヒト細胞のような真核細胞であり得る。
【０１６９】
アデノシンデアミナーゼ
本明細書で使用される用語「アデノシンデアミナーゼ」または「アデノシンデアミナーゼタンパク質」は、以下に示すように、アデニン（または分子のアデニン部分）をヒポキサンチン（または分子のヒポキサンチン部分）に変換する加水分解脱アミノ反応を触媒することができるタンパク質、ポリペプチド、またはタンパク質もしくはポリペプチドの１

つ以上の機能的ドメイン（複数可）を指す。いくつかの実施形態では、アデニン含有分子はアデノシン（Ａ）であり、ヒポキサンチン含有分子はイノシン（Ｉ）である。アデニン含有分子は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）またはリボ核酸（ＲＮＡ）であり得る。



アデニン　　ヒポキサンチン

【０１７０】

本開示によれば、本開示に関連して使用され得るアデノシンデアミナーゼは、ＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＲ）として知られる酵素ファミリーのメンバー、ｔＲＮＡに作用するアデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡＴ）として知られる酵素ファミリーのメンバー、及び他のアデノシンデアミナーゼドメイン含有（ＡＤＡＤ）ファミリーのメンバーを含むが、これらに限定されない。本開示によれば、アデノシンデアミナーゼは、ＲＮＡ／ＤＮＡ及びＲＮＡ二本鎖においてアデニンを標的化することができる。確かに、Ｚｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２０１７，４５（６）：３３６９－３３７７）は、ＡＤＡＲがＲＮＡ／ＤＮＡ及びＲＮＡ／ＲＮＡ二本鎖上のアデノシンからイノシンへの反応を実行することができることを実証する。特定の実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、本明細書で以下に詳述するように、ＲＮＡ／ＤＮＡｎ　ＲＮＡ二本鎖においてＤＮＡを編集するその能力を増加させるように修飾されている。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、哺乳動物、鳥類、カエル、イカ、魚、ハエ、及び虫を含むが、これらに限定されない１つ以上の後生動物種に由来する。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ヒト、イカ、またはＤｒｏｓｏｐｈｉｌａアデノシンデアミナーゼである。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ１、ｈＡＤＡＲ２、ｈＡＤＡＲ３を含むヒトＡＤＡＲである。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ＡＤＲ－１及びＡＤＲ－２を含むＣａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ　ｅｌｅｇａｎｓ　ＡＤＡＲタンパク質である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｄＡｄａｒを含むＤｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ＡＤＡＲタンパク質である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｓｑＡＤＡＲ２ａ及びｓｑＡＤＡＲ２ｂを含むイカＬｏｌｉｇｏ　ｐｅａｌｅｉｉ　ＡＤＡＲタンパク質である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ヒトＡＤＡＴタンパク質である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ＡＤＡＴタンパク質である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ＴＥＮＲ（ｈＡＤＡＤ１）及びＴＥＮＲＬ（ｈＡＤＡＤ２）を含むヒトＡＤＡＤタンパク質である。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、二本鎖核酸基質における１つ以上の標的アデノシン残基（複数可）を認識し、イノシン残基（複数可）に変換する。いくつかの実施形態では、二本鎖核酸基質は、ＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッド二本鎖である。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、二本鎖基質上の結合ウィンドウを認識する。いくつかの実施形態では、結合ウィンドウは、少なくとも１つの標的アデノシン残基（複数可）を含有する。いくつかの実施形態では、結合ウィンドウは、約３ｂｐ～約１００ｂｐの範囲にある。いくつかの実施形態では、結合ウィンド

ウは、約５ｂｐ～約５０ｂｐの範囲にある。いくつかの実施形態では、結合ウィンドウは、約１０ｂｐ～約３０ｂｐの範囲にある。いくつかの実施形態では、結合ウィンドウは、約１ｂｐ、２ｂｐ、３ｂｐ、５ｂｐ、７ｂｐ、１０ｂｐ、１５ｂｐ、２０ｂｐ、２５ｂｐ、３０ｂｐ、４０ｂｐ、４５ｂｐ、５０ｂｐ、５５ｂｐ、６０ｂｐ、６５ｂｐ、７０ｂｐ、７５ｂｐ、８０ｂｐ、８５ｂｐ、９０ｂｐ、９５ｂｐ、または１００ｂｐである。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、１つ以上のデアミナーゼドメインを含む。理論に束縛されることを意図しないが、デアミナーゼドメインが、二本鎖核酸基質に含まれる１つ以上の標的アデノシン（Ａ）残基（複数可）を認識し、イノシン（Ｉ）残基（複数可）に変換するように機能することが企図される。いくつかの実施形態では、デアミナーゼドメインは、活性中心を含む。いくつかの実施形態では、活性中心は、亜鉛イオンを含む。いくつかの実施形態では、Ａ－ｔｏ－Ｉ編集プロセス中、標的アデノシン残基での塩基対合は破壊され、標的アデノシン残基は二重螺旋から「反転」されて、アデノシンデアミナーゼによってアクセス可能になる。いくつかの実施形態では、活性中心におけるまたは活性中心近傍のアミノ酸残基は、標的アデノシン残基に対して１つ以上のヌクレオチド（複数可）５’と相互作用する。いくつかの実施形態では、活性中心におけるまたは活性中心近傍のアミノ酸残基は、標的アデノシン残基に対して１つ以上のヌクレオチド（複数可）３’と相互作用する。いくつかの実施形態では、活性中心におけるまたは活性中心近傍のアミノ酸残基は、反対鎖上の標的アデノシン残基に相補的なヌクレオチドとさらに相互作用する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、ヌクレオチドの２’ヒドロキシル基と水素結合を形成する。

【０１７５】

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

【０１７６】

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

【０１７７】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄの野生型アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄの編集効率及び／または基質編集嗜好性が、特定のニーズに従って変化するように、ｈＡＤＡＲ２－Ｄ配列において１つ以上の変異を含む。

【０１７８】

ｈＡＤＡＲ１及びｈＡＤＡＲ２タンパク質のある特定の変異は、Ｋｕｔｔａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ．（２０１２）１０９（４８）：Ｅ３２９５－３０４、Ｗａｎｔ　ｅｔ　ａｌ．ＡＣＳ　Ｃｈｅｍ　Ｂｉｏｌ．（２０１５）１０（１１）：２５１２－９、及びＺｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．（２０１７）４５（６）：３３６９－３３７に記載されており、それらの各々は本明細書にその全体を参照して組み込まれる。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のグリシン３３６、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含む。いくつかの実施形態では、位置３３６でのグリシン残基は、アスパラギン酸残基によって置き換えられる（Ｇ３３６Ｄ）。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のグリシン４８７、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含む。いくつかの実施形態では、位置４８７でのグリシン残基は、比較的小さな側鎖を有する非極性アミノ酸残基によって置き換えられる。例えば、いくつかの実施形態では、位置４８７でのグリシン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｇ４８７Ａ）。いくつかの実施形態では、位置４８７でのグリシン残基は、バリン残基によって置き換えられる（Ｇ４８７Ｖ）。いくつかの実施形態では、位置４８７でのグリシン残基は、比較的大きな側鎖を有するアミノ酸残基によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、位置４８７でのグリシン残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｇ４８７Ｒ）。いくつかの実施形態では、位置４８７でのグリシン残基は、リシン残基によって置き換えられる（Ｇ４８７Ｋ）。いくつかの実施形態では、位置４８７でのグリシン残基は、トリプトファン残基によって置き換えられる（Ｇ４８７Ｗ）。いくつかの実施形態では、位置４８７でのグリシン残基は、チロシン残基によって置き換えられる（Ｇ４８７Ｙ）。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のグルタミン酸４８８、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含む。いくつかの実施形態では、位置４８８でのグルタミン酸残基は、グルタミン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｑ）。いくつかの実施形態では、位置４８８でのグルタミン酸残基は、ヒスチジン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｈ）。いくつかの実施形態では、位置４８８でのグルタミン酸残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｒ）。いくつかの実施形態では、位置４８８でのグルタミン酸残基は、リシン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｋ）。いくつかの実施形態では、位置４８８でのグルタミン酸残基は、アスパラギン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｎ）。いくつかの実施形態では、位置４８８でのグルタミン酸残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ａ）。いくつかの実施形態では、位置４８８でのグルタミン酸残基は、メチオニン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｍ）。いくつかの実施形態では、位置４８８でのグルタミン酸残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｓ）。いくつかの実施形態では、位置４８８でのグルタミン酸残基は、フェニルアラニン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｆ）。いくつかの実施形態では、位置４８８でのグルタミン酸残基は、リシン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｌ）。いくつかの実施形態では、位置４８８でのグルタミン酸残基は、トリプトファン残基によって置き換えられる（Ｅ４８８Ｗ）。

【０１８２】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のトレオニン４９０、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含む。いくつかの実施形態では、位置４９０でのトレオニン残基は、システイン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｃ）。いくつかの実施形態では、位置４９０でのトレオニン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｓ）。いくつかの実施形態では、位置４９０でのトレオニン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ａ）。いくつかの実施形態では、位置４９０でのトレオニン残基は、フェニルアラニン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｆ）。いくつかの実施形態では、位置４９０でのトレオニン残基は、チロシン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｙ）。いくつかの実施形態では、位置４９０でのトレオニン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｒ）。いくつかの実施形態では、位置４９０でのトレオニン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｋ）。いくつかの実施形態では、位置４９０でのトレオニン残基は、フェニルアラニン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｐ）。いくつかの実施形態では、位置４９０でのトレオニン残基は、チロシン残基によって置き換えられる（Ｔ４９０Ｅ）。

【０１８３】

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

のバリン４９３、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含む。いくつかの実施形態では、位置４９３でのバリン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｖ４９３Ａ）。いくつかの実施形態では、位置４９３でのバリン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｖ４９３Ｓ）。いくつかの実施形態では、位置４９３でのバリン残基は、トレオニン残基によって置き換えられる（Ｖ４９３Ｔ）。いくつかの実施形態では、位置４９３でのバリン残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｖ４９３Ｒ）。いくつかの実施形態では、位置４９３のバリン残基は、アスパラギン酸残基によって置き換えられる（Ｖ４９３Ｄ）。いくつかの実施形態では、位置４９３でのバリン残基は、プロリン残基によって置き換えられる（Ｖ４９３Ｐ）。いくつかの実施形態では、位置４９３でのバリン残基は、グリシン残基によって置き換えられる（Ｖ４９３Ｇ）。

【０１８４】

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

【０１８５】

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

【０１８６】

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

【０１８７】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のアスパラギン６１３、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含む。いくつかの実施形態では、位置６１３でのアスパラギン残基は、リシン残基によって置き換えられる（Ｎ６１３Ｋ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、野生型配列においてアスパラギン残基を有するアミノ酸配列の位置６１３で変異を含む

。いくつかの実施形態では、位置６１３でのアスパラギン残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｎ６１３Ｒ）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、野生型配列においてアスパラギン残基を有するアミノ酸配列の位置６１３で変異を含む。いくつかの実施形態では、位置６１３でのアスパラギン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｎ６１３Ａ）いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、野生型配列においてアスパラギン残基を有するアミノ酸配列の位置６１３で変異を含む。いくつかの実施形態では、位置６１３でのアスパラギン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ｎ６１３Ｅ）。

【０１８８】

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

【０１８９】

いくつかの実施形態では、編集効率を低減させるために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列位置及び上記に対応する相同ＡＤＡＲタンパク質における変異に基づいて、変異Ｅ４８８Ｆ、Ｅ４８８Ｌ、Ｅ４８８Ｗ、Ｔ４９０Ａ、Ｔ４９０Ｆ、Ｔ４９０Ｙ、Ｔ４９０Ｒ、Ｔ４９０Ｋ、Ｔ４９０Ｐ、Ｔ４９０Ｅ、Ｎ５９７Ｆのうちの１つ以上を含むことができる。特定の実施形態では、オフターゲット効果を低減するために低減した有効性を有するアデノシンデアミナーゼ酵素を使用することが、興味深くなり得る。

【０１９０】

いくつかの実施形態では、オフターゲット効果を低減するために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列位置、及び上記に対応する相同ＡＤＡＲタンパク質における変異に基づいて、Ｒ３４８、Ｖ３５１、Ｔ３７５、Ｋ３７６、Ｅ３９６、Ｃ４５１、Ｒ４５５、Ｎ４７３、Ｒ４７４、Ｋ４７５、Ｒ４７７、Ｒ４８１、Ｓ４８６、Ｅ４８８、Ｔ４９０、Ｓ４９５、Ｒ５１０での変異のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８及びＲ３４８、Ｖ３５１、Ｔ３７５、Ｋ３７６、Ｅ３９６、Ｃ４５１、Ｒ４５５、Ｎ４７３、Ｒ４７４、Ｋ４７５、Ｒ４７７、Ｒ４８１、Ｓ４８６、Ｔ４９０、Ｓ４９５、Ｒ５１０から選択される１つ以上の追加的な位置で変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｔ３７５で、及び任意選択で１つ以上の追加的な位置で変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｎ４７３で、及び任意選択で１つ以上の追加的な位置で変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１で、及び任意選択で１つ以上の追加的な位置で変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８及びＴ３７５で、ならびに任意選択で１つ以上の追加的な位置で変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８及びＮ４７３で、ならびに任意選択で１つ以上の追加的な位置で変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、変異Ｅ４８８及びＶ３５１を含み、任意選択で１つ以上の追加的な位置で含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ４８８ならびにＴ３７５、Ｎ４７３、及びＶ３５１のうちの１つ以上で変異を含む。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、オフターゲット効果を低減するために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列位置、及び上記に対応する相同ＡＤＡＲタンパク質における変異に基づいて、Ｒ３４８Ｅ、Ｖ３５１Ｌ、Ｔ３７５Ｇ、Ｔ３７５Ｓ、Ｒ４５５Ｇ、Ｒ４５５Ｓ、Ｒ４５５Ｅ、Ｎ４７３Ｄ、Ｒ４７４Ｅ、Ｋ４７５Ｑ、Ｒ４７７Ｅ、

Ｒ４８１Ｅ、Ｓ４８６Ｔ、Ｅ４８８Ｑ、Ｔ４９０Ａ、Ｔ４９０Ｓ、Ｓ４９５Ｔ、及びＲ５１０Ｅから選択される変異のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、変異Ｅ４８８Ｑならびに Ｒ３４８Ｅ、Ｖ３５１Ｌ、Ｔ３７５Ｇ、Ｔ３７５Ｓ、Ｒ４５５Ｇ、Ｒ４５５Ｓ、Ｒ４５５Ｅ、Ｎ４７３Ｄ、Ｒ４７４Ｅ、Ｋ４７５Ｑ、Ｒ４７７Ｅ、Ｒ４８１Ｅ、Ｓ４８６Ｔ、Ｔ４９０Ａ、Ｔ４９０Ｓ、Ｓ４９５Ｔ、及びＲ５１０Ｅから選択される１つ以上の追加的な変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、変異Ｔ３７５ＧまたはＴ３７５Ｓ、及び任意選択で１つ以上の追加的な変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、変異Ｎ４７３Ｄ、及び任意選択で１つ以上の追加的な変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、変異Ｖ３５１Ｌ、及び任意選択で１つ以上の追加的な変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、変異Ｅ４８８Ｑ、及びＴ３７５ＧまたはＴ３７５Ｇ、ならびに任意選択で１つ以上の追加的な変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、変異Ｅ４８８Ｑ及びＮ４７３Ｄ、ならびに任意選択で１つ以上の追加的な変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、変異Ｅ４８８Ｑ及びＶ３５１Ｌ、ならびに任意選択で１つ以上の追加的な変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、変異Ｅ４８８ＱならびにＴ３７５Ｇ／Ｓ、Ｎ４７３Ｄ及びＶ３５１Ｌのうちの１つ以上を含む。

【０１９２】

二本鎖ＲＮＡに結合したヒトＡＤＡＲ２デアミナーゼドメインの結晶構造は、修飾部位の５’側のＲＮＡに結合するタンパク質ループを明らかにする。この５’結合ループは、ＡＤＡＲファミリーメンバー間の基質特異性差異の一因である。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Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，４４（２０）：９８７２－９８８０（２０１６）を参照されたい。加えて、ＡＤＡＲ２特異的ＲＮＡ結合ループを酵素活性部位近傍で特定した。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Ｍａｔｈｅｗｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２３（５）：４２６－３３（２０１６）を参照されたい。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、編集特異性及び／または効率を向上させるためにＲＮＡ結合ループにおいて１つ以上の変異を含む。

【０１９３】

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

【０１９４】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のアルギニン４５５、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含む。いくつかの実施形態では、位置４５５でのアルギニン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｒ４５５Ａ）。いくつかの実施形態では、位置４５５でのアルギニン残基は、バリン残基によって置き換えられる（Ｒ４５５Ｖ）。いくつかの実施形態では、位置４５５でのアルギニン残基は、ヒスチジン残基によって置き換えられる（Ｒ４５５Ｈ）。いくつかの実施形態では、位置４５５でのアルギニン残基は、グリシン残基によって置き換えられる（Ｒ４５５Ｇ）。いくつかの実施形態では、位置４５５でのアルギニン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｒ４５５Ｓ）。いくつかの実施形態では、位置４５５でのアルギニン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ｒ４５５Ｅ）。

【０１９５】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のイソロイシン４５６、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を

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

【０１９６】

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

【０１９７】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のセリン４５８、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含む。いくつかの実施形態では、位置４５８でのセリン残基は、バリン残基によって置き換えられる（Ｓ４５８Ｖ）。いくつかの実施形態では、位置４５８でのセリン残基は、フェニルアラニン残基によって置き換えられる（Ｓ４５８Ｆ）。いくつかの実施形態では、位置４５８でのセリン残基は、プロリン残基によって置き換えられる（Ｓ４５８Ｐ）。

【０１９８】

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

【０１９９】

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

【０２００】

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

【０２０１】

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

施形態では、位置４６９でのアスパラギン酸残基は、チロシン残基によって置き換えられる（Ｄ４６９Ｙ）。

【０２０２】

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

【０２０３】

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

【０２０４】

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

【０２０５】

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

【０２０６】

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

【０２０７】

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

【０２０８】

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

【０２０９】

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

【０２１０】

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

【０２１１】

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

【０２１２】

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

【０２１３】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のバリン３５１、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含む。いくつかの実施形態では、位置３５１でのバリン残基は、ロイシン残基によって置き換えられる（Ｖ３５１Ｌ）。

【０２１４】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のトレオニン３７５、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含む。いくつかの実施形態では、位置３７５でのトレオニン残基は、グリシン残基によって置き換えられる（Ｔ３７５Ｇ）。いくつかの実施形態では、位置３７５でのトレオニン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｔ３７５Ｓ）。

【０２１５】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列のアルギニン４８１、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含

む。いくつかの実施形態では、位置４８１でのアルギニン残基は、グルタミン酸残基によって置き換えられる（Ｒ４８１Ｅ）。

【０２１６】

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

【０２１７】

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

【０２１８】

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

【０２１９】

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

【０２２０】

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

【０２２１】

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

【０２２２】

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

【０２２３】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄアミノ酸配列の変異Ａ４５４Ｓ、Ａ４５４Ｃ、Ａ４５４Ｄ、Ｒ４５５Ａ、Ｒ４５５Ｖ、Ｒ４５５Ｈ、Ｉ４５６Ｖ、Ｉ４５６Ｌ、Ｉ４５６Ｄ、Ｆ４５７Ｙ、Ｆ４５７Ｒ、Ｆ４５７Ｅ、Ｓ４５８Ｖ、Ｓ４５８Ｆ、Ｓ４５８Ｐ、Ｐ４５９Ｃ、Ｐ４５９Ｈ、Ｐ４５９Ｗ、Ｈ４６０Ｒ、Ｈ４６０Ｉ、Ｈ４６０Ｐ、Ｐ４６２Ｓ、Ｐ４６２Ｗ、Ｐ４６２Ｅ、Ｄ４６９Ｑ、Ｄ４６９Ｓ、Ｄ

４６９Ｙ、Ｒ４７０Ａ、Ｒ４７０Ｉ、Ｒ４７０Ｄ、Ｈ４７１Ｋ、Ｈ４７１Ｔ、Ｈ４７１Ｖ、Ｐ４７２Ｋ、Ｐ４７２Ｔ、Ｐ４７２Ｄ、Ｎ４７３Ｒ、Ｎ４７３Ｗ、Ｎ４７３Ｐ、Ｒ４７４Ｋ、Ｒ４７４Ｇ、Ｒ４７４Ｄ、Ｋ４７５Ｑ、Ｋ４７５Ｎ、Ｋ４７５Ｄ、Ａ４７６Ｓ、Ａ４７６Ｒ、Ａ４７６Ｅ、Ｒ４７７Ｋ、Ｒ４７７Ｔ、Ｒ４７７Ｆ、Ｇ４７８Ａ、Ｇ４７８Ｒ、Ｇ４７８Ｙ、Ｑ４７９Ｎ、Ｑ４７９Ｓ、Ｑ４７９Ｐ、Ｒ３４８Ａ、Ｒ５１０Ｑ、Ｒ５１０Ａ、Ｇ５９３Ａ、Ｇ５９３Ｅ、Ｋ５９４Ａのうちのいずれか１つ以上、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置で変異を含む。

【０２２４】

ある特定の実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、活性をシチジンデアミナーゼに変換するように変異される。したがっていくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｅ３９６、Ｃ４５１、Ｖ３５１、Ｒ４５５、Ｔ３７５、Ｋ３７６？Ｓ４８６、Ｑ４８８、Ｒ５１０、Ｋ５９４、Ｒ３４８、Ｇ５９３、Ｓ３９７、Ｈ４４３、Ｌ４４４、Ｙ４４５、Ｆ４４２、Ｅ４３８、Ｔ４４８、Ａ３５３、Ｖ３５５、Ｔ３３９、Ｐ５３９、Ｔ３３９、Ｐ５３９、Ｖ５２５　Ｉ５２０、Ｐ４６２及びＮ５７９から選択される位置において１つ以上の変異を含む。特定の実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｖ３５１、Ｌ４４４、Ｖ３５５、Ｖ５２５及びＩ５２０から選択される位置において１つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列位置、及び上記に対応する相同ＡＤＡＲタンパク質における変異に基づいて、Ｅ４８８、Ｖ３５１、Ｓ４８６、Ｔ３７５、Ｓ３７０、Ｐ４６２、Ｎ５９７での変異のうちの１つ以上を含むことができる。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄ、及び対応する相同ＡＤＡＲタンパク質における変異に基づき、変異Ｅ４８８Ｑ、Ｖ３５１Ｇ、Ｓ４８６Ａ、Ｔ３７５Ｓ、Ｓ３７０Ｃ、Ｐ４６２Ａ、Ｎ５９７Ｉのうちの１つ以上を含むことができるこれらの修飾は、目的の標的ＲＮＡにおけるシトシンを修飾するための方法における使用について興味深く、該標的ＲＮＡに（ａ）触媒的に不活性な（死んだ）Ｃａｓ１３タンパク質と、（ｂ）直接反復配列に連結されるガイド配列を含むガイド分子と、（ｃ）シトシンデアミナーゼ活性を確実にするために上記の本明細書に記載されるように修飾されたアデノシンデアミナーゼであるシトシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインと、を送達することを含み、該シトシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、共有結合または非共有結合で該死んだＣａｓ１３タンパク質もしくは該ガイド分子に連結されるか、または送達後にそれらに連結するよう適合されており、ガイド分子は、該死んだＣａｓ１３タンパク質と複合体を形成し、目的の該標的ＲＮＡ配列に結合するように該複合体を導き、該ガイド配列は、ＲＮＡ二本鎖を形成するために該シトシンを含む標的配列とハイブリダイズすることができ、該ガイド配列は、形成されたＲＮＡ二本鎖においてＣ－Ａ／Ｕミスマッチをもたらす該シトシンに対応する位置で非対合アデニンまたはウラシルを含み、該シトシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、該ＲＮＡ二本鎖において該シトシンを脱アミノする。これらの方法は、Ｔ→ＣまたはＡ→Ｇ点変異または病原性ＳＮＰによって引き起こされる疾患の治療または予防において興味深い。

【０２２５】

上記の通り。

【０２２６】

ある特定の実施形態において、編集の向上及びオフターゲット修飾の低減は、ｇＲＮＡの化学的修飾によって達成される。Ｖｏｇｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４），Ａｎｇｅｗ　Ｃｈｅｍ　Ｉｎｔ　Ｅｄ，５３：６２６７－６２７１，ｄｏｉ：１０．１００２／ａｎｉｅ．２０１４０２６３４（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）において例示されるように化学的に修飾されたｇＲＮＡは、オフターゲット活性を低減しオンターゲット効率を向上させる。２′－Ｏ－メチル及びチオリン酸修飾ガイドＲＮＡは、一般に細胞における編集効率を改善する。

【０２２７】

ＡＤＡＲは、編集されたＡのいずれかの側で隣接するヌクレオチドに対する嗜好性を示

すことが知られている（ｗｗｗ．ｎａｔｕｒｅ．ｃｏｍ／ｎｓｍｂ／ｊｏｕｒｎａｌ／ｖ２３／ｎ５／ｆｕｌｌ／ｎｓｍｂ．３２０３．ｈｔｍｌ，Ｍａｔｔｈｅｗｓ ｅｔ ａｌ．（２０１７），Ｎａｔｕｒｅ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ，２３（５）：４２６－４３３、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。したがって、ある特定の実施形態では、ｇＲＮＡ、標的、及び／またはＡＤＡＲは、モチーフ嗜好性について選択され最適化される。

【０２２８】

意図的なミスマッチは、好まれないモチーフの編集を可能にするためにインビトロで示されている（ｈｔｔｐｓ：／／ａｃａｄｅｍｉｃ．ｏｕｐ．ｃｏｍ／ｎａｒ／ａｒｔｉｃｌｅ－ｌｏｏｋｕｐ／ｄｏｉ／１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｕ２７２；Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ ｅｔ ａｌ（２０１４），Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ，４２（１０）：ｅ８７）、Ｆｕｋｕｄａ ｅｔ ａｌ．（２０１７），Ｓｃｉｅｎｔｉｃｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ，７，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓｒｅｐ４１４７８、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。したがって、ある特定の実施形態では、好まれない５’または３’隣接塩基に対してＲＮＡ編集効率を増強するため、隣接する塩基における意図的なミスマッチが導入される。

【０２２９】

結果は、ＡＤＡＲデアミナーゼドメインの標的化窓におけるＣに対向するＡが他の塩基よりも優先的に編集されることを示唆する。追加的に、標的化された塩基のいくつかの塩基内のＵと塩基対合するＡは、低レベルのＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合による編集を示し、複数のＡを編集するために酵素に柔軟性があることを示唆する。例えば、図１８を参照されたい。これらの２つの観察は、Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合の活動窓における複数のＡがＣで編集される全てのＡをミスマッチさせることによって編集のために指定され得ることを示唆する。したがって、ある特定の実施形態では、活動窓における複数のＡ：Ｃミスマッチは、複数のＡ：Ｉ編集を作成するように設計される。ある特定の実施形態では、活動窓における潜在的なオフターゲット編集を抑制するために、非ターゲットＡは、ＡまたはＧと対合される。

【０２３０】

用語「編集特異性」及び「編集嗜好性」は、二本鎖基質における特定のアデノシン部位でのＡ－ｔｏ－Ｉ編集の程度を指すために本明細書において互換的に使用される。いくつかの実施形態では、基質編集嗜好性は、標的アデノシン残基の５’最寄りの隣接物及び／または３’最寄りの隣接物によって決定される。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｕ＞Ａ＞Ｃ＞Ｇとしてランク付けされる基質の５’最寄りの隣接物に対する嗜好性を有する（「＞」は、より大きな嗜好性を示す）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ＞Ｃ～Ａ＞Ｕとしてランク付けされる基質の３’最寄りの隣接物に対する嗜好性を有する（「＞」はより大きな嗜好性を示し、「～」は同様の嗜好性を示す）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ＞Ｃ＞Ｕ～Ａとしてランク付けされる基質の３’最寄りの隣接物に対する嗜好性を有する（「＞」はより大きな嗜好性を示し、「～」は同様の嗜好性を示す）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｇ＞Ｃ＞Ａ＞Ｕとしてランク付けされる基質の３’最寄りの隣接物に対する嗜好性を有する（「＞」は、より大きな嗜好性を示す）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、Ｃ～Ｇ～Ａ＞Ｕとしてランク付けされる基質の３’最寄りの隣接物に対する嗜好性を有する（「＞」はより大きな嗜好性を示し、「～」は同様の嗜好性を示す）。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ＴＡＧ＞ＡＡＧ＞ＣＡＣ＞ＡＡＴ＞ＧＡＡ＞ＧＡＣとしてランク付けされる標的アデノシン残基を含有するトリプレット配列に対する嗜好性を有し（「＞」は、より大きな嗜好性を示す）、中心Ａは標的アデノシン残基である。

【０２３１】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼの基質編集嗜好性は、アデノシンデアミナーゼタンパク質における核酸結合ドメインの有無に影響される。いくつかの実施形

態では、基質編集嗜好性を修飾するために、デアミナーゼドメインは、二本鎖ＲＮＡ結合ドメイン（ｄｓＲＢＤ）または二本鎖ＲＮＡ結合モチーフ（ｄｓＲＢＭ）と接続される。いくつかの実施形態では、ｄｓＲＢＤまたはｄｓＲＢＭは、ｈＡＤＡＲ１またはｈＡＤＡＲ２のようなＡＤＡＲタンパク質に由来することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのｄｓＲＢＤ及びデアミナーゼドメインを含む完全長ＡＤＡＲタンパク質が、使用される。いくつかの実施形態では、１つ以上のｄｓＲＢＭまたはｄｓＲＢＤは、デアミナーゼドメインのＮ末端にある。他の実施形態では、１つ以上のｄｓＲＢＭまたはｄｓＲＢＤは、デアミナーゼドメインのＣ末端にある。

【０２３２】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼの基質編集好みは、酵素の活性中心近傍または活性中心におけるアミノ酸残基によって影響される。いくつかの実施形態では、基質編集嗜好性を修飾するために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列位置、及び上記に対応する相同ＡＤＡＲタンパク質における変異に基づき、変異Ｇ３３６Ｄ、Ｇ４８７Ｒ、Ｇ４８７Ｋ、Ｇ４８７Ｗ、Ｇ４８７Ｙ、Ｅ４８８Ｑ、Ｅ４８８Ｎ、Ｔ４９０Ａ、Ｖ４９３Ａ、Ｖ４９３Ｔ、Ｖ４９３Ｓ、Ｎ５９７Ｋ、Ｎ５９７Ｒ、Ａ５８９Ｖ、Ｓ５９９Ｔ、Ｎ６１３Ｋ、Ｎ６１３Ｒのうちの１つ以上を含むことができる。

【０２３３】

特に、いくつかの実施形態では、編集特異性を低減させるために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列位置、及び上記に対応する相同ＡＤＡＲタンパク質における変異に基づいて、変異Ｅ４８８Ｑ、Ｖ４９３Ａ、Ｎ５９７Ｋ、Ｎ６１３Ｋのうちの１つ以上を含むことができる。いくつかの実施形態では、編集特異性を増加させるために、アデノシンデアミナーゼは、変異Ｔ４９０Ａを含むことができる。

【０２３４】

いくつかの実施形態では、中心Ａが標的アデノシン残基であるトリプレット配列ＧＡＣを含む基質のような即時型５’Ｇで標的アデノシン（Ａ）に対する編集嗜好性を増加させるために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ２－Ｄのアミノ酸配列位置、及び上記に対応する相同ＡＤＡＲタンパク質における変異に基づいて、変異Ｇ３３６Ｄ、Ｅ４８８Ｑ、Ｅ４８８Ｎ、Ｖ４９３Ｔ、Ｖ４９３Ｓ、Ｖ４９３Ａ、Ａ５８９Ｖ、Ｎ５９７Ｋ、Ｎ５９７Ｒ、Ｓ５９９Ｔ、Ｎ６１３Ｋ、Ｎ６１３Ｒのうちの１つ以上を含むことができる。

【０２３５】

特に、いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、以下のトリプレット配列中心Ａが標的アデノシン残基であるＧＡＣ、ＧＡＡ、ＧＡＵ、ＧＡＧ、ＣＡＵ、ＡＡＵ、ＵＡＣを含む編集基質に対する相同ＡＤＡＲタンパク質において変異Ｅ４８８Ｑまたは対応する変異を含む。

【０２３６】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、配列番号７６１に定義されるｈＡＤＡＲ１－Ｄの野生型アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ１－Ｄの編集効率及び／または基質編集好みが特定のニーズに応じて変化するように、ｈＡＤＡＲ１－Ｄ配列において１つ以上の変異を含む。

【０２３７】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ１－Ｄアミノ酸配列のグリシン１００７、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含む。いくつかの実施形態では、位置１００７でのグリシン残基は、比較的小さな側鎖を有する非極性アミノ酸残基によって置き換えられる。例えば、いくつかの実施形態では、位置１００７でのグリシン残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ａ）。いくつかの実施形態では、位置１００７でのグリシン残基は、バリン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｖ）。いくつかの実施形態では、位置１００７でのグリシン残基は、比較的大きな側鎖を有するアミノ酸残基によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、位置１００７でのグリシン残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｒ）。いくつかの実施形態では、位置１００７でのグリシン残基は、リシン残基

によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｋ）。いくつかの実施形態では、位置１００７でのグリシン残基は、トリプトファン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｗ）。いくつかの実施形態では、位置１００７でのグリシン残基は、チロシン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｙ）。追加的に、他の実施形態では、位置１００７でのグリシン残基は、ロイシン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｌ）。他の実施形態では、位置１００７でのグリシン残基は、トレオニン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｔ）。他の実施形態では、位置１００７でのグリシン残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｇ１００７Ｓ）。

【０２３８】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ１－Ｄアミノ酸配列のグルタミン酸１００８、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含む。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、比較的大きな側鎖を有する極性アミノ酸残基によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、グルタミン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｑ）。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、ヒスチジン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｈ）。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、アルギニン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｒ）。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、リシン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｋ）。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、非極性または小さな極性アミノ酸残基によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、フェニルアラニン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｆ）。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、トリプトファン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｗ）。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、グリシン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｇ）。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、イソロイシン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｉ）。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、バリン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｖ）。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、プロリン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｐ）。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、セリン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｓ）。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、アスパラギン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｎ）。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、アラニン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ａ）。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、メチオニン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｍ）。いくつかの実施形態では、位置１００８でのグルタミン酸残基は、ロイシン残基によって置き換えられる（Ｅ１００８Ｌ）。

【０２３９】

いくつかの実施形態では、編集効率を改善させるために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ１－Ｄのアミノ酸配列位置、及び上記に対応する相同ＡＤＡＲタンパク質における変異に基づき、変異Ｅ１００７Ｓ、Ｅ１００７Ａ、Ｅ１００７Ｖ、Ｅ１００８Ｑ、Ｅ１００８Ｒ、Ｅ１００８Ｈ、Ｅ１００８Ｍ、Ｅ１００８Ｎ、Ｅ１００８Ｋのうちの１つ以上を含むことができる。

【０２４０】

いくつかの実施形態では、編集効率を低減させるために、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ１－Ｄのアミノ酸配列位置、及び上記に対応する相同ＡＤＡＲタンパク質における変異に基づき、変異Ｅ１００７Ｒ、Ｅ１００７Ｋ、Ｅ１００７Ｙ、Ｅ１００７Ｌ、Ｅ１００７Ｔ、Ｅ１００８Ｇ、Ｅ１００８Ｉ、Ｅ１００８Ｐ、Ｅ１００８Ｖ、Ｅ１００８Ｆ、Ｅ１００８Ｗ、Ｅ１００８Ｓ、Ｅ１００８Ｎ、Ｅ１００８Ｋのうちの１つ以上を含むことができる。

【０２４１】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼの基質編集嗜好性、効率、及び／または選択性は、酵素の活性中心近傍または活性中心におけるアミノ酸残基によって影響される。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼは、ｈＡＤＡＲ１－Ｄ配列におけるグルタミン酸１００８位、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する位置での変異を含む。いくつかの実施形態では、変異は、Ｅ１００８Ｒであるか、または相同ＡＤＡＲタンパク質における対応する変異である。いくつかの実施形態では、Ｅ１００８Ｒ変異体は、反対鎖上にミスマッチしたＧ残基を有する標的アデノシン残基についての増加した編集効率を有する。

【０２４２】

いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、二本鎖核酸基質を認識して結合するための１つ以上の二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）結合モチーフ（ｄｓＲＢＭ）またはドメイン（ｄｓＲＢＤ）をさらに含むか、またはそれらに結合している。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼと二本鎖基質との相互作用は、ＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳタンパク質因子を含む、１つ以上の追加的なタンパク質因子（複数可）によって媒介される。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼと二本鎖基質との相互作用は、ガイドＲＮＡを含む、１つ以上の核酸成分（複数可）によってさらに媒介される。

【０２４３】

ある特定の実施形態では、指向性進化は、アデニンからヒポキサンチンアデニンのヒポキサンチンへの脱アミノの他に追加的な反応を触媒することができる修飾されたＡＤＡＲタンパク質を設計するために使用され得る。例えば

【０２４４】

本発明によれば、アデノシンデアミナーゼの基質は、ガイド分子がそのＤＮＡ標的に結合する時に形成されるＲＮＡ／ＤＮＡｎ　ＲＮＡ二本鎖であり、次いで、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ酵素とＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体を形成する。ＲＮＡ／ＤＮＡまたはＤＮＡ／ＲＮＡｎ　ＲＮＡ二本鎖は、本明細書において「ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッド」、「ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド」、または「二本鎖基質」とも称される。ガイド分子及びＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ酵素の特定の特徴が、以下に詳述される。

【０２４５】

本明細書で使用される用語「編集選択性」は、アデノシンデアミナーゼによって編集される二本鎖基質上の全ての部位の画分を指す。理論に束縛されることなく、アデノシンデアミナーゼの編集選択性が、ミスマッチした塩基、バルジ、及び／または内部ループの存在のような二本鎖基質の長さ及び二次構造に影響されることが企図される。

【０２４６】

いくつかの実施形態では、基質が５０ｂｐより長い完全に塩基対の二本鎖である際、アデノシンデアミナーゼは、二本鎖内の複数のアデノシン残基を脱アミノする（例えば、全てのアデノシン残基の５０％）ことが可能であり得る。いくつかの実施形態では、基質が５０ｂｐよりも短い際、アデノシンデアミナーゼの編集選択性は、標的アデノシン部位でのミスマッチの存在によって影響される。特に、いくつかの実施形態では、反対の鎖上にミスマッチしたシチジン（Ｃ）残基を有するアデノシン（Ａ）残基は、高効率で脱アミノされる。いくつかの実施形態では、反対鎖上にミスマッチされたグアノシン（Ｇ）残基を有するアデノシン（Ａ）残基は、編集なしにスキップされる。

【０２４７】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及びガイド

本発明の方法及びシステムでは、使用は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び対応するガイド分子からなる。より具体的には、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、クラス２のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質である。ある特定の実施形態では、該ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ１３である。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、特定の配列を標的化するためにカスタマイズされたタンパク質の生成を必要としないが、むしろ、単一のＣａｓタンパク質は、特定の核酸標的を認識するためにガイド分子によってプログラムされ得、言い換えれば、Ｃａｓ酵素タンパク質は、該ガイド分子を使用して目的の特定

の核酸標的座位に動員され得る。
【０２４８】
ガイド分子
クラス２のＶ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質のガイド分子またはガイドＲＮＡは、ｔｒａｃｒ－ｍａｔｅ配列（内因性ＣＲＩＳＰＲシステムの文脈において「直接反復」を包含する）及びガイド配列（内因性ＣＲＩＳＰＲシステムの文脈において「スペーサー」とも称される）を含む。確かに、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質とは対照的に、Ｃａｓ１３タンパク質は、ｔｒａｃｒ配列の存在に依存しない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムまたは複合体は、ｔｒａｃｒ配列（例えば、Ｃａｓタンパク質がＣａｓ１３である場合）の存在を含まない、及び／またはそれに依存しない。ある特定の実施形態では、ガイド分子は、ガイド配列またはスペーサー配列に融合または連結された直接反復配列を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれらからなることができる。
【０２４９】
一般に、ＣＲＩＳＰＲシステムは、標的配列の部位でのＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進するエレメントによって特徴付けられる。ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成の文脈では、「標的配列」は、ガイド配列が相補性を有するように設計される配列を指し、標的ＤＮＡ配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションはＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する。
【０２５０】
用語「ガイド分子」及び「ガイドＲＮＡ」は、本明細書で互換的に使用され、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質と複合体を形成することができるＲＮＡベースの分子を指し、標的核酸配列とハイブリダイズし、複合体の配列特異的結合を標的核酸配列へ導くために標的核酸配列と十分な相補性を有するガイド配列を含む。ガイド分子またはガイドＲＮＡは、本明細書に記載されるように、１つ以上の化学的な修飾（例えば、２つのリボヌクレオチドの化学的連結によって、または１つ以上のリボヌクレオチドの１つ以上のデオキシリボヌクレオチドへの置き換えによって）を有するＲＮＡベースの分子を特異的に包含する。
【０２５１】
本明細書で使用される場合、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの文脈における用語「ガイド配列」は、標的核酸配列とハイブリダイズするための標的核酸配列との十分な相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列と、標的核酸配列への核酸標的化複合体の直接配列特異的結合とを含む。本発明の文脈では、標的核酸配列または標的配列は、本明細書において「標的アデノシン」とも称される脱アミノされる標的アデノシンを含む配列である。いくつかの実施形態では、意図されるｄＡ－Ｃミスマッチを除いて、適切なアラインメントアルゴリズムを使用して最適に整列される際の相補性の程度は、約または約５０％超、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、それ以上である。最適なアラインメントは、配列を整列させるのに適した任意のアルゴリズムの使用で決定され得、その非限定的な例は、Ｓｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズム、Ｂｕｒｒｏｗｓ－Ｗｈｅｅｌｅｒ変換に基づくアルゴリズム（例えば、Ｂｕｒｒｏｗｓ Ｗｈｅｅｌｅｒ Ａｌｉｇｎｅｒ）、ＣｌｕｓｔａｌＷ、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｘ、ＢＬＡＴ、Ｎｏｖｏａｌｉｇｎ（Ｎｏｖｏｃｒａｆｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ｗｗｗ．ｎｏｖｏｃｒａｆｔ．ｃｏｍで入手可能）、ＥＬＡＮＤ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）、ＳＯＡＰ（ｓｏａｐ．ｇｅｎｏｍｉｃｓ．ｏｒｇ．ｃｎで入手可能）、及びＭａｑ（ｍａｑ．ｓｏｕｒｃｅｆｏｒｇｅ．ｎｅｔで入手可能）を含む。核酸標的化複合体の配列特異的結合を標的核酸配列に導くガイド配列（核酸標的化ガイドＲＮＡ内）の能力は、任意の好適なアッセイによって評価され得る。例えば、試験されるガイド配列を含む核酸標的化複合体を形成するのに十分な核酸標的化ＣＲＩＳＰＲシステムの成分は、本明細書に記載されるＳｕｒｖｅｙｏｒアッセイのような標的核酸配列中の優先的標的化（例えば、切断）の評価が後に続く、核酸標的化複合体の成分をコードするベクターでのトランスフェクションによるような、対応する

標的核酸配列を有する宿主細胞に提供され得る。同様に、標的核酸配列（またはその知覚の配列）の切断は、標的核酸配列、試験されるガイド配列及び試験ガイド配列とは異なる対照ガイド配列、を提供することと、試験及び対照ガイド配列反応間で標的配列でまたは近くで結合または切断率を比較することとによって、試験管において評価され得る。他のアッセイは、可能であり、当業者に生じる。ガイド配列、したがって核酸標的化ガイドＲＮＡは、任意の標的核酸配列を標的化するように選択され得る。

【０２５２】

いくつかの実施形態では、ガイド分子は、ガイド配列と標的配列との間に形成されるＲＮＡ二本鎖が、標的配列上の脱アミノのために標的Ａと反対のガイド配列において非対合Ｃを含むように、標的配列と少なくとも１つのミスマッチを有するように設計されたガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、このＡ－Ｃミスマッチを除いて、好適なアラインメントアルゴリズムを使用して最適に整列される際の相補性の程度は、約または約５０％超、６０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７．５％、９９％、またはそれ以上である。

【０２５３】

ある特定の実施形態では、ガイド分子のガイド配列またはスペーサー長は、１５～５０ｎｔである。ある特定の実施形態では、ガイドＲＮＡのスペーサー長は、少なくとも１５ヌクレオチドである。ある特定の実施形態において、スペーサー長は、１５～１７ｎｔ、例えば１５、１６、または１７ｎｔ、１７～２０ｎｔ、例えば１７、１８、１９、または２０ｎｔ、２０～２４ｎｔ、例えば２０、２１、２２、２３、または２４ｎｔ、２３～２５ｎｔ、例えば２３、２４、または２５ｎｔ、２４～２７ｎｔ、例えば２４、２５、２６、または２７ｎｔ、２７～３０ｎｔ、例えば２７、２８、２９、または３０ｎｔ、３０～３５ｎｔ、例えば３０、３１、３２、３３、３４、または３５ｎｔ、または３５ｎｔ以上である。ある特定の実施形態において、ガイド配列は、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、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００ｎｔである。

【０２５４】

いくつかの実施形態では、ガイド配列は、長さで１０～５０ｎｔのＲＮＡ配列であるが、より具体的には約２０～３０ｎｔ有利には約２０ｎｔ、２３～２５ｎｔまたは２４ｎｔである。ガイド配列は、それが脱アミノされるアデノシンを含む標的配列にハイブリダイズすることを確実にするように選択される。このことは、以下で詳しく記載される。選択は、脱アミノの有効性及び特異性を増加させるさらなるステップを包含することができる。

【０２５５】

いくつかの実施形態では、ガイド配列は、約２０ｎｔ～約３０ｎｔの長さであり、標的ＤＮＡ鎖にハイブリダイズして、標的アデノシン部位にｄＡ－Ｃミスマッチを有することを除いて、ほぼ完全にマッチした二本鎖を形成する。特に、いくつかの実施形態では、ｄＡ－Ｃミスマッチは、標的配列の中心（したがって、標的配列へのガイド配列のハイブリダイゼーション時の二本鎖の中心）に近い位置に位置し、それによって、アデノシンデアミナーゼを狭い編集窓（例えば、約４ｂｐの幅）に制限する。いくつかの実施形態では、標的配列は、脱アミノされる２つ以上の標的アデノシンを含むことができる。さらなる実施形態では、標的配列は、標的アデノシン部位への１つ以上のｄＡ－Ｃミスマッチ３’をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、標的配列における意図しないアデニン部位でのオフターゲット編集を回避するために、ガイド配列は、ＡＤＡＲ１及びＡＤＡＲ２のようなある特的のアデノシンデアミナーゼに触媒的に適さないｄＡ－Ｇミスマッチ

を導入するための該意図しないアデニンに内応する位置で非対合グアニンを含むよう設計され得る。参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＷｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，ＲＮＡ　７：８４６－８５８（２００１）を参照されたい。

【０２５６】

いくつかの実施形態では、基準長を有するＣａｓ１３ガイド配列（例えば、ＡｓＣａｓ１３については約２４ｎｔ）は、標的ＤＮＡとのＲＮＡ二本鎖を形成するために使用される。いくつかの実施形態では、基準長より長い（例えば、ＡｓＣａｓ１３について＞２４ｎｔ）Ｃａｓ１３ガイド分子は、Ｃａｓ１３ガイドＲＮＡ標的ＤＮＡ複合体の外側を含む標的ＤＮＡとＲＮＡ二本鎖を形成するために使用される。これは、目的の所与のヌクレオチドの広がりの中で２つ以上のアデニンの脱アミノが興味深い場合、興味深くあり得る。代替的な実施形態では、基準ガイド配列長の制限を維持することが興味深い。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、アデノシンデアミナーゼとｄＡ－Ｃミスマッチとの間で立体障害をＣａｓ１３によって減少させ接触頻度を増加させるＣａｓ１３ガイドの基準長の外側にｄＡ－Ｃミスマッチを導入するように設計される。

【０２５７】

いくつかの実施形態では、ガイド分子の配列（直接反復及び／またはスペーサー）は、ガイド分子内の二次構造程度を低減するように選択される。いくつかの実施形態では、核酸標的化ガイドＲＮＡのヌクレオチドの約または約７５％未満、５０％、４０％、３０％、２５％、２０％、１５％、１０％、５％、１％、またはそれ以下は、最適に折り畳まれる際に自己相補的塩基対合に参加する。最適な折り畳みは、任意の好適なポリヌクレオチド折り畳みアルゴリズムによって決定され得る。いくつかのプログラムは、最小限のＧｉｂｂｓ自由エネルギーを計算することに基づく。１つのかかるアルゴリズムの例は、Ｚｕｋｅｒ　ａｎｄ　Ｓｔｉｅｇｌｅｒ（Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．９（１９８１），１３３－１４８）により説明されるｍＦｏｌｄである。別の例示的な折り畳みアルゴリズムは、中心構造予測アルゴリズムを使用するＩｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｆｏｒ　Ｔｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｔ　ｔｈｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｖｉｅｎｎａで開発されたオンラインウェブサーバＲＮＡｆｏｌｄである（例えば、Ａ．Ｒ．Ｇｒｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００８，Ｃｅｌｌ　１０６（１）：２３－２４、及びＰＡ　Ｃａｒｒ　ａｎｄ　ＧＭ　Ｃｈｕｒｃｈ，２００９，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２７（１２）：１１５１－６２を参照されたい）。

【０２５８】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３による切断のような、ＲＮＡ切断に対するガイド分子の感受性を低減させることは興味深い。したがって、特定の実施形態では、ガイド分子は、Ｃａｓ１３または他のＲＮＡ切断酵素による切断を回避するように調整される。

【０２５９】

ある特定の実施形態では、ガイド分子は、非天然型の核酸及び／または非天然型のヌクレオチド及び／またはヌクレオチド類似体、及び／または化学的修飾を含む。好ましくは、これらの非天然型の核酸及び非天然型のヌクレオチドは、ガイド配列の外側に位置する。非天然型の核酸は、例えば、天然型と非天然型のヌクレオチドとの混合物を含むことができる。非天然型のヌクレオチド及び／またはヌクレオチド類似体は、リボース、リン酸及び／または塩基部分で修飾され得る。本発明の実施形態では、ガイド核酸は、リボヌクレオチド及び非リボヌクレオチドを含む。１つのかかる実施形態では、ガイドは、１つ以上のリボヌクレオチド及び１つ以上のデオキシリボヌクレオチドを含む。本発明の実施形態では、ガイドは、リボース環の２’と４’炭素との間でメチレン架橋、または架橋型核酸（ＢＮＡ）を含むホスホロチオエート連結、ロックド核酸（ＬＮＡ）ヌクレオチドのような１つ以上の非天然型のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を含む。修飾されたヌクレオチドの他の例は、２’－Ｏ－メチル類似体、２’－デオキシ類似体、または２’－フルオロ類似体を含む。修飾された塩基のさらなる例は、２－アミノプリン、５－ブロモウリジン、シュードウリジン、イノシン、７－メチルグアノシンを含むが、これらに限定されない。ガイドＲＮＡ化学的修飾の例は、１つ以上の末端ヌクレオチドでの２’－Ｏ－

メチル（Ｍ）、２’－Ｏ－メチル３’ホスホロチオエート（ＭＳ）、Ｓ－拘束エチル（ｃＥｔ）、または２’－Ｏ－メチル３’チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）の組み込みを含むが、限定しない。かかる化学的に修飾されたガイドは、非修飾ガイドと比較して増加した安定性及び増加した活性を含むことができるが、オンターゲット対オフターゲット特異性は予測可能でない。（Ｈｅｎｄｅｌ，２０１５，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３３（９）：９８５－９，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３２９０，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｏｎｌｉｎｅ ２９ Ｊｕｎｅ ２０１５ Ｒａｇｄａｒｍ ｅｔ ａｌ．，０２１５，ＰＮＡＳ，Ｅ７１１０－Ｅ７１１１、Ａｌｌｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２００５，４８：９０１－９０４、Ｂｒａｍｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ．Ｇｅｎｅｔ．，２０１２，３：１５４、Ｄｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ，２０１５，１１２：１１８７０－１１８７５、Ｓｈａｒｍａ ｅｔ ａｌ．，ＭｅｄＣｈｅｍＣｏｍｍ．，２０１４，５：１４５４－１４７１、Ｈｅｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（２０１５）３３（９）：９８５－９８９、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２０１７，１，００６６ ＤＯＩ：１０．１０３８／ｓ４１５５１－０１７－００６６を参照されたい）。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの５’及び／または３’末端は、蛍光色素、ポリエチレングリコール、コレステロール、タンパク質、または検出タグを含む様々な機能的部分によって修飾される。（Ｋｅｌｌｙ ｅｔ ａｌ．，２０１６，Ｊ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２３３：７４－８３を参照されたい）。ある特定の実施形態では、ガイドは、標的ＤＮＡに結合する領域におけるリボヌクレオチドと、Ｃａｓ１３に結合する領域における１つ以上のデオキシリボヌクレオチド及び／またはヌクレオチド類似体とを含む。本発明の実施形態では、デオキシリボヌクレオチド及び／またはヌクレオチド類似体は、限定しないが、ステムループ領域及びシード領域のような操作ガイド構造に組み込まれる。Ｃａｓ１３ガイドに関しては、ある特定の実施形態では、修飾は、ステムループ領域の５’－ハンドルにはない。ガイドのステムループ領域の５’ハンドルにおける化学的修飾は、その機能を廃止することができる（Ｌｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２０１７，１：００６６）。ある特定の実施形態では、ガイドの少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５、５０、または７５ヌクレオチドが化学的に修飾される。いくつかの実施形態では、ガイドの３’末端または５’末端のいずれかで３～５のヌクレオチドは、化学的に修飾される。いくつかの実施形態では、小規模の修飾のみが、２’－Ｆ修飾のようなシード領域に導入される。いくつかの実施形態では、２’－Ｆ修飾は、ガイドの３’末端で導入される。ある特定の実施形態では、ガイドの５’及び／または３’末端の３～５のヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）、２’－Ｏ－メチル３’ホスホロチオエート（ＭＳ）、Ｓ－拘束エチル（ｃＥｔ）、または２’－Ｏ－メチル３’チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）で化学的に修飾される。このような修飾は、ゲノム編集効率を増強することができる（Ｈｅｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（２０１５）３３（９）：９８５－９８９を参照されたい）。ある特定の実施形態では、ガイドのホスホジエステル結合の全ては、遺伝子破壊のレベルを増強するためのホスホロチオエート（ＰＳ）で置換される。ある特定の実施形態では、ガイドの５’及び／または３’末端の６以上のヌクレオチドは、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－ＦまたはＳ－拘束エチル（ｃＥｔ）で化学的に修飾される。かかる化学的に修飾されたガイドは、遺伝子破壊の増強されたレベルを媒介することができる（Ｒａｇｄａｒｍ ｅｔ ａｌ．，０２１５，ＰＮＡＳ，Ｅ７１１０－Ｅ７１１１を参照されたい）。本発明の実施形態では、ガイドは、その３’及び／または５’末端で化学的部分を含むように修飾される。かかる部分は、アミン、アジド、アルキン、チオ、ジベンゾシクロオクチン（ＤＢＣＯ）、またはローダミンを含むが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、化学的部分は、アルキル鎖のようなリンカーによってガイドにコンジュゲートされる。ある特定の実施形態では、修飾されたガイドの化学的部分は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、またはナノ粒子のような別の分子にガイド

を結合させるために使用され得る。かかる化学的に修飾されたガイドは、ＣＲＩＳＰＲシステムによって一般に編集された細胞を特定または濃縮するために使用され得る（Ｌｅｅ　ｅｔ　ａｌ．，ｅＬｉｆｅ，２０１７，６：ｅ２５３１２，ＤＯＩ：１０．７５５４を参照されたい）。

【０２６０】

いくつかの実施形態では、ガイドは、５’ハンドル、ならびにシード領域及び３’末端をさらに含むガイドセグメントを有する修飾されたＣａｓ１３　ｃｒＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、修飾されたガイドは、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６　Ｃａｓ１３（ＡｓＣａｓ１３）、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ　ｓｕｂｓｐ．Ｎｏｖｉｃｉｄａ　Ｕ１１２　Ｃａｓ１３（ＦｎＣａｓ１３）、Ｌ．ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＭＣ２０１７　Ｃａｓ１３（Ｌｂ３Ｃａｓ１３）、Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ　ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉｃｕｓ　Ｃａｓ１３（ＢｐＣａｓ１３）、Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＧＷＣ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７　Ｃａｓ１３（ＰｂＣａｓ１３）、Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ＿３３＿１０　Ｃａｓ１３（ＰｅＣａｓ１３）、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ　ｉｎａｄａｉ　Ｃａｓ１３（ＬｉＣａｓ１３）、Ｓｍｉｔｈｅｌｌａ　ｓｐ．ＳＣ＿Ｋ０８Ｄ１７　Ｃａｓ１３（ＳｓＣａｓ１３）、Ｌ．ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＭＡ２０２０　Ｃａｓ１３（Ｌｂ２Ｃａｓ１３）、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ　ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ　Ｃａｓ１３（ＰｃＣａｓ１３）、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ　ｍａｃａｃａｅ　Ｃａｓ１３（ＰｍＣａｓ１３）、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ　Ｍｅｔｈａｎｏｐｌａｓｍａ　ｔｅｒｍｉｔｕｍ　Ｃａｓ１３（ＣＭｔＣａｓ１３）、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｅｌｉｇｅｎｓ　Ｃａｓ１３（ＥｅＣａｓ１３）、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ　ｂｏｖｏｃｕｌｉ　２３７　Ｃａｓ１３（ＭｂＣａｓ１３）、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｄｉｓｉｅｎｓ　Ｃａｓ１３（ＰｄＣａｓ１３）、またはＬ．ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＮＤ２００６　Ｃａｓ１３（ＬｂＣａｓ１３）のうちのいずれか１つのＣａｓ１３と共に使用され得る。

【０２６１】

いくつかの実施形態では、ガイドへの修飾は、化学的修飾、挿入、欠失または分割である。いくつかの実施形態では、化学的修飾は、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）類似体、２’－デオキシ類似体、２’－チオウリジン類似体、Ｎ６－メチルアデノシン類似体、２’－フルオロ類似体、２－アミノプリン、５－ブロモ－ウリジン、シュードウリジン（Ψ）、Ｎ１－メチルシュードウリジン（ｍｅ１Ψ）、５－メトキシウリジン（５ｍｏＵ）、イノシン、７－メチルグアノシン、２’－Ｏ－メチル３’－ホスホロチオエート（ＭＳ）、Ｓ－拘束エチル（ｃＥｔ）、ホスホロチオエート（ＰＳ）、または２’－Ｏ－メチル３’－チオＰＡＣＥ（ＭＳＰ）を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ガイドは、ホスホロチオエート修飾のうちの１つ以上を含む。ある特定の実施形態では、ガイドの少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、または２５ヌクレオチドは、化学的に修飾される。ある特定の実施形態では、シード領域における１つ以上のヌクレオチドは、化学的に修飾される。ある特定の実施形態では、３’末端における１つ以上のヌクレオチドは、化学的に修飾される。ある特定の実施形態では、５’ハンドルにおけるヌクレオチドのいずれも化学的に修飾されていない。いくつかの実施形態では、シード領域における化学的修飾は、２’－フルオロ類似体の組み込みのような小規模の修飾である。特定の実施形態では、シード領域の１つのヌクレオチドは、２’－フルオロ類似体で置き換えられる。いくつかの実施形態では、３’末端における５～１０のヌクレオチドは、化学的に修飾される。Ｃａｓ１３　ＣｒＲＮＡの３’末端でのかかる化学的修飾は、Ｃａｓ１３活性を向上することができる（Ｌｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，２０１７，１：００６６を参照されたい）。特定の実施形態では、３’末端における１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０のヌクレオチドは、２’－フルオロ類似体で置き換えられる。特定の実施形態では、３’末端における１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０のヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル（Ｍ）類似体で

置き換えられる。

【０２６２】

いくつかの実施形態では、ガイドの５’－ハンドルのループは、修正される。いくつかの実施形態では、ガイドの５’－ハンドルのループは、欠失、挿入、分割、または化学的修飾を有するように修正される。ある特定の実施形態では、修飾されたループは、３、４、または５のヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、ループは、ＵＣＵＵ、ＵＵＵＵ、ＵＡＵＵ、またはＵＧＵＵの配列を含む。

【０２６３】

いくつかの実施形態では、ガイド分子は、ＤＮＡまたはＲＮＡであり得る別個の非共有結合で連結された配列を有するステムループを形成する。特定の実施形態では、ガイドを形成する配列は、まず標準的なホスホラミダイト合成プロトコルを使用して合成される（Ｈｅｒｄｅｗｉｊｎ，Ｐ．，ｅｄ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｃｏｌ ２８８，Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ（２０１２））。いくつかの実施形態では、これらの配列は、当該技術分野で既知の標準プロトコルを使用してライゲーションのための適切な官能基を含有するように官能化され得る（Ｈｅｒｍａｎｓｏｎ，Ｇ．Ｔ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（２０１３））。官能基の例は、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、カルボン酸ハロゲン化物、カルボン酸活性エステル、アルデヒド、カルボニル、クロロカルボニル、イミダゾリルカルボニル、ヒドロジド、セミカルバジド、チオセミカルバジド、チオール、マレイミド、ハロアルキル、スホニル、同類、プロパルギル、ジエン、アルキン、及びアジドを含むが、これらに限定されない。この配列が一度官能化されると、共有化学結合または連結は、この配列と直接反復配列との間で形成され得る。化学結合の例は、カルバメート、エーテル、エステル、アミド、イミン、アミジン、アミノトリジン、ヒドロゾーン、ジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、スルホンアミド、スルホン酸塩、フルホン、スルホキシド、尿素、チオウレア、ヒドラジド、オキシム、トリアゾール、光不安定性結合、Ｄｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒシクロ付加対または環閉鎖転移対合のようなＣ－Ｃ結合形成基、及びＭｉｃｈａｅｌ反応対合を含むが、これらに限定されない。

【０２６４】

いくつかの実施形態では、ステムループ形成配列は、化学的に合成され得る。いくつかの実施形態では、化学的合成は、２’－アセトキシエチルオルトエステル（２’－ＡＣＥ）（Ｓｃａｒｉｎｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（１９９８）１２０：１１８２０－１１８２１、Ｓｃａｒｉｎｇｅ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．（２０００）３１７：３－１８）または２’－チオノカルバメート（２’－ＴＣ）化学反応（Ｄｅｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（２０１１）１３３：１１５４０－１１５４６、Ｈｅｎｄｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（２０１５）３３：９８５－９８９）を有する自動固相オリゴヌクレオチド合成機を使用する。

【０２６５】

ある特定の実施形態では、ガイド分子（Ｃａｓ１３を標的座位に誘導することができる）は、（１）標的座位にハイブリダイズすることができるガイド配列、及び（２）直接反復配列がガイド配列から上流（すなわち、５’）に位置するｔｒａｃｒメイトまたは直接反復配列を含む。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３ガイド配列のシード配列（すなわち、標的座位での配列の認識及び／またはハイブリダイゼーションに必須で重大な配列）は、およそガイド配列の最初の１０ヌクレオチド内にある。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３はＦｎＣａｓ１３であり、シード配列はおよそガイド配列の５’末端の最初の５ｎｔ内にある。

【０２６６】

特定の実施形態では、ガイド分子は、直接反復配列に連結されたガイド配列を含み、直

接反復配列は、１つ以上のステムループまたは最適化された二次構造を含む。特定の実施形態では、直接反復は、１６ｎｔの最小長さ及び単一のステムループを有する。さらなる実施形態では、直接反復は、１６ｎｔより長い、好ましくは１７ｎｔ超の長さを有し、２つ以上のステムループまたは最適化された二次構造を有する。特定の実施形態では、ガイド分子は、天然の直接反復配列の全部または一部に連結されたガイド配列を含むか、またはそれらからなる。典型的なＶ型Ｃａｓ１３ガイド分子は、（３’～５’方向で）、ガイド配列第１の相補的広がり（「反復」）、ループ（典型的には４または５ヌクレオチド長）、第２の相補的広がり（「抗反復」は反復に対して相補的である）、及びポリＡ（ＲＮＡにおいて多くの場合ポリＵである）尾部（ターミネーター）を含む。ある特定の実施形態では、直接反復配列は、その天然アーキテクチャを保持し、単一のステムループを形成する。特定の実施形態では、ガイド構造のある特定の態様は、例えば、特徴の追加、減算、または置換によって修正され得るが、ガイドアーキテクチャのある特定の他の態様は維持される。挿入、欠失、及び置換を含むが、これらに限定されない、操作されたガイド分子修飾の好ましい位置は、ガイド末端、ならびにＣａｓ１３タンパク質及び／または標的、例えば、直接反復配列のステムループと組み合わされた際に曝露されるガイド分子の領域を含む。

【０２６７】

特定の実施形態では、ステムは相補的Ｘ及びＹ配列を含む少なくとも約４ｂｐを含むが、より多く、例えば、５、６、７、８、９、１０、１１または１２以下、例えば、３、２の塩基対のステムも企図される。したがって、例えば、Ｘ２－１０及びＹ２－１０（式中、Ｘ及びＹは、ヌクレオチドの任意の相補的なセットを表す）が、企図され得る。一態様では、ＸヌクレオチドおよびＹヌクレオチドから作製されるステムは、ループと共に、全体的な二次構造において完全なヘアピンを形成し、これは有利であり得、塩基対の量は完全なヘアピンを形成する任意の量であり得る。一態様では、ガイド分子全体の二次構造が保存される限り、任意の相補的Ｘ：Ｙ塩基対合配列は（例えば、長さに関して）、許容される。一態様では、Ｘ：Ｙ塩基対から作製されるステムを接続するループは、ガイド分子の全体的な二次構造を中断しない、同じ長さ（例えば、４または５ヌクレオチド）以上の任意の配列であり得る。一態様では、ステムループは、例えば、ＭＳ２アプタマーをさらに含むことができる。一態様では、ステムは、相補的Ｘ及びＹ配列を含む約５～７ｂｐを含むが、それ以上またはそれ以下の塩基対のステムも企図される。一態様では、非ワトソンクリック塩基対合が企図され、かかる対合は、一般に、その位置でステムループのアーキテクチャを保存する。

【０２６８】

特定の実施形態では、ガイド分子の天然ヘアピンまたはステムループ構造は、延長ステムループによって延長されるか、または置き換えられる。ステムの延長は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質とのガイド分子の組み立てを増強することができることが示されている（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ．（２０１３）；１５５（７）：１４７９－１４９１）。特定の実施形態では、ステムループのステムは、少なくとも１、２、３、４、５以上の相補的塩基対（すなわち、ガイド分子における２、４、６、８、１０以上のヌクレオチドの付加に対応する）によって延長される。特定の実施形態では、これらは、ステムループのループに隣接して、ステムの末端に位置する。

【０２６９】

特定の実施形態では、ＲＮＡｓｅまたは減少した発現に対するガイド分子の感受性は、その機能に影響しないガイド分子の配列のわずかな修飾によって低減され得る。例えば、特定の実施形態では、Ｕ６　Ｐｏｌ－ＩＩＩの中途転写のような転写の中途終結は、ガイド分子配列中の推定Ｐｏｌ－ＩＩＩターミネーター（４つの連続するＵ）を修飾することによって除去され得る。かかる配列修飾がガイド分子のステムループにおいて必要とされる場合、好ましくは塩基対フリップによって確実にされる。

【０２７０】

好ましい実施形態では、直接反復は、１つ以上のタンパク質結合ＲＮＡアプタマーを含

むように修飾され得る。特定の実施形態では、最適化された二次構造の一部のような１つ以上のアプタマーが含まれ得る。かかるアプタマーは、本明細書でさらに詳細に記載されるように、バクテリオファージ外被タンパク質に結合することができる。

【０２７１】

いくつかの実施形態では、ガイド分子は、編集される少なくとも１つの標的アデノシン残基を含む標的ＤＮＡ鎖と二本鎖を形成する。標的ＤＮＡ鎖へのガイドＲＮＡ分子のハイブリダイゼーション時、アデノシンデアミナーゼは、二本鎖に結合し、ＤＮＡ－ＲＮＡ二本鎖内に含まれる１つ以上の標的アデノシン残基の脱アミノを触媒する。

【０２７２】

ガイド配列、したがって核酸標的化ガイドＲＮＡは、任意の標的核酸配列を標的化するように選択され得る。標的配列はＤＮＡであり得る。標的配列は、ゲノムＤＮＡであり得る。標的配列は、ミトコンドリアＤＮＡであり得る。

【０２７３】

ある特定の実施形態では、標的配列は、ＰＡＭ（プロトスペーサー隣接モチーフ）またはＰＦＳ（プロトスペーサー隣接配列または部位）、すなわちＣＲＩＳＰＲ複合体によって認識される短い配列と会合すべきである。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の性質に応じて、標的配列は、ＤＮＡ二本鎖（本明細書では非標的配列とも称される）におけるその相補配列がＰＡＭの上流または下流であるように選択されるべきである。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質がＣａｓ１３タンパク質である本発明の実施形態では、ａにおける標的配列の相補配列は、ＰＡＭの下流または３’である。ＰＡＭについての正確な配列及び長さ要件は使用されるＣａｓ１３タンパク質に応じて異なるが、ＰＡＭは典型的には、プロトスペーサー（すなわち、標的配列）に隣接する２～５塩基対配列である。異なるＣａｓ１３オーソログの天然ＰＡＭ配列の例は本明細書の以下に提供され、当業者は所与のＣａｓ１３タンパク質での使用のためのさらなるＰＡＭ配列を特定することができるであろう。

【０２７４】

さらに、ＰＡＭ相互作用（ＰＩ）ドメインの操作は、ＰＡＭ特異性のプログラミングを可能にし、標的部位認識忠実度を向上させ、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の汎用性を増加させ得、例えば、Ｃａｓ９について、Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ ＢＰ ｅｔ ａｌ．Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｎｕｃｌｅａｓｅｓ ｗｉｔｈ ａｌｔｅｒｅｄ ＰＡＭ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｉｅｓ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１５ Ｊｕｌ ２３；５２３（７５６１）：４８１－５．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ１４５９２において記載される。本明細書でさらに詳細に説明されるように、当業者は、Ｃａｓ１３タンパク質が類似的に修飾され得ることを理解するであろう。

【０２７５】

特定の実施形態では、ガイド配列は、脱アミノされるアデニンに対する脱アミナーゼの最適な効率を確実にするために選択される。Ｃａｓ１３ニッカーゼの切断部位に対する標的鎖中におけるアデニンの位置は、考慮され得る。特定の実施形態では、ニッカーゼが、非標的鎖上で、脱アミノされるアデニンの付近において作用するであろうことを確実にすることが興味深い。例えば、特定の実施形態では、Ｃａｓ１３ニッカーゼは、ＰＡＭの１７ヌクレオチド下流（例えば、ＡｓＣａｓ１３、ＬｂＣａｓ１３）またはＰＡＭの１８ヌクレオチド下流（例えば、ＦｎＣａｓ１３）の非標的化鎖を切断し、脱アミノされるアデニンに対応するシトシンが対応する非標的鎖の配列におけるニッカーゼ切断部位の上流または下流１０ｂｐ内のガイド配列に位置することが興味深くあり得る。

【０２７６】

特定の実施形態では、ガイドは、エスコートされたガイドである。「エスコート」によって、Ｃａｓ１３ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムまたは複合体またはガイドが細胞内の選択された時間または場所に送達され、Ｃａｓ１３ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムまたは複合体またはガイドの活性が空間的または時間的に制御されることが意味される。例えば、Ｃａｓ１３ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムまたは複合体またはガイドの活性及び目

的地は、細胞表面タンパク質または他の局在化された細胞成分のようなアプタマーリガンドに対して結合親和性を有するエスコートＲＮＡアプタマー配列によって制御され得る。代替的に、エスコートアプタマーは、例えば、特定の時間で細胞に適用される外部エネルギー源のような、一過性エフェクターのような、細胞上または細胞内のアプタマーエフェクターに応答性があり得る。

【０２７７】

エスコートされたＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムまたは複合体は、ガイド分子構造、アーキテクチャ、安定性、遺伝子発現、またはこれらの任意の組み合わせを向上するように設計された機能構造を有するガイド分子を有する。かかる構造は、アプタマーを含むことができる。

【０２７８】

アプタマーは、例えば、指数的濃縮によるリガンドの系統的進化と呼ばれる技術を用いて、他のリガンドに密接に結合するように設計または選択され得る生物分子である（ＳＥＬＥＸ、Ｔｕｅｒｋ Ｃ，Ｇｏｌｄ Ｌ：”Ｓｙｓｔｅｍａｔｉｃ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ ｌｉｇａｎｄｓ ｂｙ ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ：ＲＮＡ ｌｉｇａｎｄｓ ｔｏ ｂａｃｔｅｒｉｏｐｈａｇｅ Ｔ４ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ．”Ｓｃｉｅｎｃｅ １９９０，２４９：５０５－５１０）。核酸アプタマーは、例えば、幅広い生物医学的に関連する標的に対して高い結合親和性及び特異性を有するランダム配列オリゴヌクレオチドのプールから選択され得、アプタマーに対する幅広い治療上の有用性を示唆する（Ｋｅｅｆｅ，Ａｎｔｈｏｎｙ Ｄ．，Ｓｕｐｒｉｙａ Ｐａｉ，ａｎｄ Ａｎｄｒｅｗ Ｅｌｌｉｎｇｔｏｎ．”Ａｐｔａｍｅｒｓ ａｓ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ．”Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ９．７（２０１０）：５３７－５５０）。これらの特徴はまた、薬物送達ビヒクルとしてのアプタマーについての幅広い使用を示唆する（Ｌｅｖｙ－Ｎｉｓｓｅｎｂａｕｍ，Ｅｔｇａｒ，ｅｔ ａｌ．”Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ ａｐｔａｍｅｒｓ：ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ．”Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２６．８（２００８）：４４２－４４９、及びＨｉｃｋｅ ＢＪ，Ｓｔｅｐｈｅｎｓ ＡＷ．“Ｅｓｃｏｒｔ ａｐｔａｍｅｒｓ：ａ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｓｅｒｖｉｃｅ ｆｏｒ ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ａｎｄ ｔｈｅｒａｐｙ．”Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ２０００，１０６：９２３－９２８．）。また、蛍光体に結合して緑色蛍光タンパク質の活性を模倣するフルオロフォアに結合するＲＮＡアプタマーのような、特性を変化させることによりキュー（ｑｕｅ）に応答する、分子スイッチとして機能するアプタマーが、構築され得る（Ｐａｉｇｅ，Ｊｅｒｅｍｙ Ｓ．，Ｋａｒｅｎ Ｙ．Ｗｕ，ａｎｄ Ｓａｍｉｅ Ｒ．Ｊａｆｆｒｅｙ．”ＲＮＡ ｍｉｍｉｃｓ ｏｆ ｇｒｅｅｎ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ ｐｒｏｔｅｉｎ．”Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３３．６０４２（２０１１）：６４２－６４６）。アプタマーが、例えば細胞表面タンパク質を標的化する、標的化されたｓｉＲＮＡ治療送達システムの成分として使用され得ることも示唆されている（Ｚｈｏｕ，Ｊｉｅｈｕａ，ａｎｄ ＪｏｈｎＪ．Ｒｏｓｓｉ．”Ａｐｔａｍｅｒ－ｔａｒｇｅｔｅｄ ｃｅｌｌ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ＲＮＡ ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ．”Ｓｉｌｅｎｃｅ １．１（２０１０）：４）。

【０２７９】

したがって、特定の実施形態では、ガイド分子は、例えば、細胞膜にわたる送達、細胞内区画への送達、または核への送達を含む、ガイド分子送達を向上するように設計された１つ以上のアプタマー（複数可）によって修飾される。かかる構造は、１つ以上のアプタマー（複数可）に加えて、またはかかる１つ以上のアプタマー（複数可）を含まずに、ガイド分子を送達可能にする、誘導可能にする、または選択されたエフェクターに応答性があるようにする、部分（複数可）を含むことができる。したがって、本発明は、ｐＨ、低酸素、Ｏ２濃度、温度、タンパク質濃度、酵素濃度、脂質構造、光曝露、機械的破壊（例えば、超音波）、磁場、電界、または電磁放射線を含むが限定しない、正常または病理的生理学的状態に応答するガイド分子を包含する。

【０２８０】
誘導性システムの光応答性は、クリプトクロム－２及びＣＩＢ１の活性化を介して達成され得る。青色光刺激は、クリプトクロム－２における活性化構造変化を誘導し、その結合パートナーＣＩＢ１の動員をもたらす。この結合は、速く可逆的であり、パルス刺激後１５秒未満で飽和を達成し、刺激終了後１５分未満でベースラインに戻る。これらの急速な結合動態は、誘導剤の取り込み及びクリアランスよりもむしろ、転写／翻訳及び転写／タンパク質分解の速度によってのみ時間的に束縛されるシステムをもたらす。クライトクロム（ｃｒｙｔｏｃｈｒｏｍｅ）－２活性化も非常に感度があり、低い光強度刺激の使用を可能にし、光毒性のリスクを軽減する。さらに、無傷の哺乳動物の脳のような文脈では、可変光量は、刺激された領域のサイズを制御するために使用され得、ベクター送達のみが提供することができるよりも大きな精度を可能にする。

【０２８１】
本発明は、ガイドを誘導するための電磁放射線、音響エネルギーまたは熱エネルギーのようなエネルギー源を企図する。有利には、電磁放射線は、可視光の成分である。好ましい実施形態では、光は、約４５０～約４９５ｎｍの波長を有する青色光である。特に好ましい実施形態では、波長は約４８８ｎｍである。別の好ましい実施形態では、光刺激は、パルスを介する。光量は、約０～９ｍＷ／ｃｍ２からの範囲であり得る。好ましい実施形態では、１５秒毎の０．２５秒まで低い刺激パラダイムは、最大の活性化をもたらすはずである。

【０２８２】
化学的またはエネルギー感受性ガイドは、化学源の結合によってまたはそれがガイドとして機能し、Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムまたは複合機能を有することを可能にするエネルギーによって誘導される時に、立体構造変化を経ることができる。本発明は、ガイド機能及びＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムまたは複合機能を有するように化学源またはエネルギーを適用することと、任意選択でゲノム座位の発現が改変されることをさらに判定することとを伴うことができる。

【０２８３】
この化学誘導性システムのいくつかの異なる設計がある。１．アブシシン酸（ＡＢＡ）により誘導可能なＡＢＩ－ＰＹＬベースのシステム（例えば、ｈｔｔｐ：／／ｓｔｋｅ．ｓｃｉｅｎｃｅｍａｇ．ｏｒｇ／ｃｇｉ／ｃｏｎｔｅｎｔ／ａｂｓｔｒａｃｔ／ｓｉｇｔｒａｎｓ；４／１６４／ｒｓ２を参照されたい）、２．ラパマイシンにより誘導可能なＦＫＢＰ－ＦＲＢベースのシステム（またはラパマイシンに基づく関連した化学物質（例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎａｔｕｒｅ．ｃｏｍ／ｎｍｅｔｈ／ｊｏｕｒｎａｌ／ｖ２／ｎ６／ｆｕｌｌ／ｎｍｅｔｈ７６３．ｈｔｍｌを参照されたい）、３．ジベレリン（ＧＡ）により誘導可能なＧＩＤ１－ＧＡＩベースのシステム（例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎａｔｕｒｅ．ｃｏｍ／ｎｃｈｅｍｂｉｏ／ｊｏｕｒｎａｌ／ｖ８／ｎ５／ｆｕｌｌ／ｎｃｈｅｍｂｉｏ．９２２．ｈｔｍｌを参照されたい）。

【０２８４】
化学誘導性システムは、４－ヒドロキシタモキシフェン（４ＯＨＴ）により誘導可能なエストロゲン受容体（ＥＲ）ベースのシステムであり得る（例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｐｎａｓ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／１０４／３／１０２７．ａｂｓｔｒａｃｔを参照されたい）。ＥＲＴ２と呼ばれるエストロゲン受容体の変異リガンド結合ドメインは、４－ヒドロキシタモキシフェンの結合時に細胞の核内に転座する。本発明のさらなる実施形態では、任意の核受容体、甲状腺ホルモン受容体、レチノイン酸受容体、エストロゲン受容体、エストロゲン関連受容体、グルココルチコイド受容体、プロゲステロン受容体、アンドロゲン受容体の任意の天然型のまたは操作された誘導体は、ＥＲベースの誘導性システムと類似した誘導性システムに使用され得る。

【０２８５】
別の誘導性システムは、エネルギー、熱または電波によって誘導可能な一過性受容体電位（ＴＲＰ）イオンチャネルベースのシステムを使用した設計に基づく（例えば、ｈｔｔ

ｐ：／／ｗｗｗ．ｓｃｉｅｎｃｅｍａｇ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／３３６／６０８１／６０４を参照されたい）。これらのＴＲＰファミリータンパク質は、光及び熱を含む異なる刺激に応答する。このタンパク質が光または熱によって活性化されると、イオンチャネルが開き、カルシウムのようなイオンが形質膜に入ることを可能にする。このイオンの流入は、ガイド及びＣａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体またはシステムの他の成分を含むポリペプチドに連結された細胞内イオン相互作用パートナーに結合し、結合は、ポリペプチドのサブ細胞局在化の変化を誘導し、ポリペプチド全体が細胞の核に入ることを引き起こす。核内に入ると、Ｃａｓ１３　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体のガイドタンパク質及び他の成分は活性であり、細胞における標的遺伝子発現を調節する。

【０２８６】

光活性化は有利な実施形態であり得るが、それは特に光が皮膚または他の器官に透過できないインビボ用途にとって不利であり得る。この例では、エネルギー活性化の他の方法、特に、同様の効果を有する電界エネルギー及び／または超音波が企図される。

【０２８７】

電界エネルギーは、好ましくは、インビボ条件下で約１ボルト／ｃｍ～約１０ｋボルト／ｃｍの１つ以上の電気パルスを使用して、当該技術分野に記載されるように実質的に投与される。パルスの代わりに、またはパルスに加えて、電界は、連続的な様式で送達され得る。電気パルスは、１μｓ～５００ミリ秒、好ましくは１μｓ～１００ミリ秒間印加され得る。電界は、連続的に、またはパルスの様式で約５分間印加され得る。

【０２８８】

本明細書で使用される際、「電界エネルギー」は、細胞が曝露される電気エネルギーである。好ましくは、電界は、インビボ条件下で約１ボルト／ｃｍ～約１０ｋボルト／ｃｍ以上の強度を有する（ＷＯ９７／４９４５０を参照されたい）。

【０２８９】

本明細書で使用される場合、用語「電界」は、可変容量及び電圧での１つ以上のパルスを含み、指数波及び／または矩形波及び／または変調波及び／または変調矩形波形態を含む。電界や電気に対する参照は、参照細胞の環境における電位差の存在を言及することを含めるためになされるべきである。かかる環境は、当該技術分野で既知のように、静電気、交流（ＡＣ）、直流（ＤＣ）などの手段によって設定され得る。電界は、均一、不均一、またはそれ以外であり得、時間依存的に強度及び／または方向において変化することができる。

【０２９０】

電界の単一または複数の用途、同様に超音波の電界の単一または複数の用途は、任意の順序で及び任意の組み合わせでも可能である。超音波及び／または電界は、単一または複数の連続的な用途として、またはパルス（パルス送達）として送達され得る。

【０２９１】

電気穿孔は、異物を生体細胞に導入するためにインビトロ及びインビボ手順の両方で使用されてきた。インビトロ用途で、生細胞の試料は、まず目的の薬剤と混合され、平行平板のような電極の間に配置される。次いで、電極は、細胞／インプラント混合物に電界を印加する。インビトロで電気穿孔を実行するシステムの例は、Ｅｌｅｃｔｒｏ　Ｃｅｌｌ　Ｍａｎｉｐｕｌａｔｏｒ　ＥＣＭ６００製品、及びＥｌｅｃｔｒｏ　Ｓｑｕａｒｅ　Ｐｏｒａｔｏｒ　Ｔ８２０を含み、共にＧｅｎｅｔｒｏｎｉｃｓ，ＩｎｃのＢＴＸ部門によって作製されている（米国特許第５，８６９，３２６号を参照されたい）。

【０２９２】

既知の電気穿孔技術（インビトロ及びインビボの両方）は、処理領域の周囲に位置決めされた電極に短い高圧パルスを印加することによって機能する。電極間で生成される電界は、細胞膜を一時的に多孔質にし、そこで目的の薬剤の分子が細胞に入る。既知の電気穿孔用途では、この電界は、約１００．ｍｕ．ｓ持続時間の１０００Ｖ／ｃｍの次数の単一の矩形波パルスを含む。かかるパルスは、例えば、Ｅｌｅｃｔｒｏ　Ｓｑｕａｒｅ　Ｐｏｒａｔｏｒ　Ｔ８２０の既知の用途において生成され得る。

【０２９３】
好ましくは、電界は、インビトロ条件下で約１Ｖ／ｃｍ～約１０ｋＶ／ｃｍの強度を有する。したがって、電界は、１Ｖ／ｃｍ、２Ｖ／ｃｍ、３Ｖ／ｃｍ、４Ｖ／ｃｍ、５Ｖ／ｃｍ、６Ｖ／ｃｍ、７Ｖ／ｃｍ、８Ｖ／ｃｍ、９Ｖ／ｃｍ、１０Ｖ／ｃｍ、２０Ｖ／ｃｍ、５０Ｖ／ｃｍ、１００Ｖ／ｃｍ、２００Ｖ／ｃｍ、３００Ｖ／ｃｍ、４００Ｖ／ｃｍ、５００Ｖ／ｃｍ、６００Ｖ／ｃｍ、７００Ｖ／ｃｍ、８００Ｖ／ｃｍ、９００Ｖ／ｃｍ、１ｋＶ／ｃｍ、２ｋＶ／ｃｍ、５ｋＶ／ｃｍ、１０ｋＶ／ｃｍ、２０ｋＶ／ｃｍ、５０ｋＶ／ｃｍ以上の強度を有することができる。より好ましくは、インビトロ条件下で約０．５ｋＶ／ｃｍ～約４．０ｋＶ／ｃｍである。好ましくは、電界は、インビボ条件下で約１Ｖ／ｃｍ～約１０ｋＶ／ｃｍの強度を有する。しかしながら、標的部位へ送達されるパルスの数が増加する場合、電界強度は低下され得る。したがって、より低いフィールド強度での電界のパルス送達が想定される。

【０２９４】
好ましくは、電界の用途は、同じ強度及び容量の二重パルスまたは変化する強度及び／または容量の連続パルスのような複数のパルスの形態である。本明細書で使用される場合、用語「パルス」は、可変容量及び電圧での１つ以上の電気パルスを含み、指数波及び／または矩形波及び／または変調波／矩形波形態を含む。

【０２９５】
好ましくは、電気パルスは、指数波形、矩形波形、変調波形及び変調矩形波形から選択される波形として送達される。

【０２９６】
好ましい実施形態は、低電圧で直流を採用する。したがって、出願人は、１００ミリ秒以上、好ましくは１５分以上の期間、１Ｖ／ｃｍ～２０Ｖ／ｃｍのフィールド強度で、細胞、組織または組織質量に印加される電界の使用を開示する。

【０２９７】
超音波は、約０．０５Ｗ／ｃｍ２～約１００Ｗ／ｃｍ２のパワーレベルで有利に投与される。診断または治療用超音波は、使用され得、またはこれらの組み合わせ。

【０２９８】
本明細書で使用される場合、用語「超音波」は、その周波数が非常に高く、ヒトの聴覚の範囲を超える機械的振動からなるエネルギーの形態を指す。超音波スペクトルの周波数下限は、一般に約２０ｋＨｚとされ得る。超音波のほとんどの診断用途は、１～１５ＭＨｚ’の範囲の周波数を採用する（Ｕｌｔｒａｓｏｎｉｃｓ ｉｎ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ，Ｐ．Ｎ．Ｔ．Ｗｅｌｌｓ，ｅｄ．，２ｎｄ．Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｐｕｂｌ．Ｃｈｕｒｃｈｉｌｌ Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ［Ｅｄｉｎｂｕｒｇｈ，Ｌｏｎｄｏｎ＆ＮＹ，１９７７］より）。

【０２９９】
超音波は、診断用途と治療用途の両方で使用されてきた。診断ツール（「診断用超音波」）として使用される際、超音波は、典型的には最大約１００ｍＷ／ｃｍ２のエネルギー密度範囲で使用される（ＦＤＡ推奨）が、最大７５０ｍＷ／ｃｍ２のエネルギー密度が使用されてきた。理学療法では、超音波は、典型的には約３～４Ｗ／ｃｍ２の範囲でエネルギー源として使用される（ＷＨＯ推奨）。他の治療用途では、より高い強度の超音波、例えば、短期間の１００Ｗ／ｃｍ最大１ｋＷ／ｃｍ２（またはさらに高い）でのＨＩＦＵが、使用され得る。本明細書で使用される用語「超音波」は、診断、治療、及び集束超音波を包含することが意図される。

【０３００】
集束超音波（ＦＵＳ）は、浸潤プローブなしで熱エネルギーが送達されることを可能にする（Ｍｏｒｏｃｚ ｅｔ ａｌ １９９８ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍａｇｎｅｔｉｃ Ｒｅｓｏｎａｎｃｅ Ｉｍａｇｉｎｇ Ｖｏｌ．８，Ｎｏ．１，ｐｐ．１３６－１４２を参照されたい。集束超音波の別の形態は、Ｍｏｕｓｓａｔｏｖ ｅｔ ａｌ ｉｎ Ｕｌｔｒａｓｏｎｉｃｓ（１９９８）Ｖｏｌ．３６，Ｎｏ．８，ｐｐ．８９３－９００及び

ＴｒａｎＨｕｕＨｕｅ ｅｔ ａｌ ｉｎ Ａｃｕｓｔｉｃａ（１９９７）Ｖｏｌ．８３，Ｎｏ．６，ｐｐ．１１０３－１１０６においてレビューされる強力集束超音波（ＨＩＦＵ）である。

【０３０１】

好ましくは、診断用超音波と治療用超音波との組み合わせが採用される。しかしながら、この組み合わせは限定することを意図されておらず、当業者は超音波の任意の種類の組み合わせが使用され得ることを理解するであろう。追加的に、エネルギー密度、超音波の周波数、曝露期間が異なり得る。

【０３０２】

好ましくは、超音波エネルギー源への曝露は、約０．０５～約１００Ｗｃｍ－２の電力密度である。さらにより好ましくは、超音波エネルギー源への曝露は、約１～約１５Ｗｃｍ－２の電力密度である。

【０３０３】

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

【０３０４】

好ましくは、曝露は、約１０ミリ秒～約６０分の期間である。好ましくは、曝露は、約１秒～約５分の期間である。より好ましくは、超音波は、約２分間印加される。しかしながら、中断される特定の標的細胞に応じて、曝露は、より長い持続、例えば、１５分間であり得る。

【０３０５】

有利には、標的組織は、約０．０１５～約１０ＭＨｚの範囲の周波数で約０．０５Ｗｃｍ－２～約１０Ｗｃｍ－２の音響パワー密度で、超音波エネルギー源に曝露される（ＷＯ９８／５２６０９を参照されたい）。しかしながら、例えば、音響パワー密度が１００Ｗｃｍ－２を超える超音波エネルギー源に曝露することも可能であるが、短縮された期間、例えば、ミリ秒以下の期間は１０００Ｗｃｍ－２である。

【０３０６】

好ましくは、超音波の適用は複数のパルスの形態であり、したがって、連続波及びパルス波の両方（超音波のパルス送達）は任意の組み合わせで採用され得る。例えば、連続波超音波が、次いでパルス波超音波が、またはその逆も同様に、適用され得る。これは、任意の順序及び組み合わせで、任意の回数繰り返され得る。パルス波超音波は連続波超音波の背景に対して印加され得、任意の数のパルスは任意の数の群において使用され得る。

【０３０７】

好ましくは、超音波は、パルス波超音波を含むことができる。非常に好ましい実施形態では、超音波は、連続波として０．７Ｗｃｍ－２または１．２５Ｗｃｍ－２の電力密度で印加される。パルス波超音波が使用される場合、より高い電力密度が使用され得る。

【０３０８】

超音波の使用は有利であり、それは超音波が光と同様に標的に正確に焦点を合わせ得るためである。さらに、超音波は光と違ってより深く組織に焦点を合わせ得るので有利である。したがって、超音波は、全組織透過（限定されないが、肝臓の葉のような）または全器官（限定されないが、肝臓全体または心臓のような筋肉全体のような）療法により適している。別の重要な利点は、超音波が多様な診断及び治療用途において使用される非侵襲的刺激であることである。例として、超音波は、医療画像診断技術、及び追加的に、整形外科療法において周知である。さらに、対象脊椎動物への超音波の印加に適した器具は広く利用可能であり、それらの使用は当該技術分野において周知である。

【０３０９】

特定の実施形態では、ガイド分子はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの特異性を増加させるために二次構造によって修飾され、二次構造は、エキソヌクレアーゼ活性に対して保護

することができ、本明細書で保護されたガイド分子とも称されるガイド配列への５’付加を可能にする。

【０３１０】

一態様では、本発明は、「プロテクターＲＮＡ」をガイド分子の配列にハイブリダイズさせることを提供し、ここで「プロテクターＲＮＡ」は、ガイド分子の３’末端に相補的なＲＮＡ鎖であり、それによって部分的に二本鎖ガイドＲＮＡを生成する。本発明の実施形態では、完全に相補的なプロテクター配列とミスマッチした塩基（すなわち、ガイド配列の一部を形成しないガイド分子の塩基）を保護することは、３’末端でのミスマッチした塩基対への標的ＤＮＡ結合の可能性を減少させる。本発明の特定の実施形態では、延長された長さを含む追加的な配列は、ガイドがガイド分子内にプロテクター配列を含むように、ガイド分子内に存在し得る。この「プロテクター配列」は、ガイド分子が「曝露配列」（標的配列にハイブリダイズするガイド配列の部分を含む）に加えて「保護配列」を含むことを確実にする。特定の実施形態では、ガイド分子は、ヘアピンのような二次構造を含むようにプロテクターガイドの存在によって修飾される。有利には、保護配列、ガイド配列、またはその両方に対して相補性を有する３または４～３０以上、例えば、約１０以上の近接する塩基対がある。保護された部分がその標的と相互作用するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの熱力学を妨げないことは、有利である。部分的に二本鎖ガイド分子を含むかかる伸長を提供することによって、ガイド分子は保護され他と考えられ、特異的活性を維持しながら、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体の向上した特異的結合をもたらす。

【０３１１】

特定の実施形態では、使用は、切断ガイド（ｔｒｕガイド）、すなわち、基準ガイド配列長について長さが切断されるガイド配列を含むガイド分子からなる。Ｎｏｗａｋ ｅｔ ａｌ．（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ（２０１６）４４（２０）：９５５５－９５６４）により説明されるように、かかるガイドは、そのようなガイドは、触媒的に活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ酵素が標的ＤＮＡを切断することなくその標的に結合することを可能にし得る。特定の実施形態では、標的の結合を可能にするが、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ酵素のニッカーゼ活性のみを保持する切断ガイドが使用される。

【０３１２】

Ｃｒｉｓｐｒ－Ｃａｓ酵素

その非修飾形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は触媒的に活性なタンパク質である。これは、核酸標的化複合体（標的配列にハイブリダイズされたガイドＲＮＡを含むの形成時、標的配列中または近傍（からの、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、５０、またはそれ以上の塩基対）の１つまたは両方のＤＮＡ鎖が修飾される（例えば、切断される）ことを意味する。本明細書で使用される用語「目的の標的座位に関連する配列（複数可）」は、標的配列の付近近傍の配列（例えば、標的配列から１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、５０、またはそれ以上の塩基対以内であって、標的配列は目的の標的座位内に含まれる）からなる。非修飾の触媒的に活性なＣａｓ１３タンパク質は、ねじれ型の切断を生成し、それによって切断部位は典型的には標的配列内にある。より具体的には、ねじれ型の切断は、典型的には、ＰＡＭの遠位にある１３～２３ヌクレオチドである。特定の実施形態では、非標的鎖上の切断は、ＰＡＭの１７ヌクレオチド下流（すなわち、ＰＡＭの下流のヌクレオチド１７と１８との間）であるが、標的鎖（すなわち、ガイド配列とハイブリダイズする鎖）上の切断は、ＰＡＭに相補的な配列からさらに離れたさらなる４ヌクレオチドで生じる（これは、３’鎖上のＰＡＭの相補体の上流またはＰＡＭの相補体の上流ヌクレオチド２１と２２との間の２１ヌクレオチドである）である。

【０３１３】

本発明に従う方法では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、変異したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質が標的化配列を含み標的座位の１つまたは両方のＤＮＡ鎖を切断する能力を欠くように、対応する野生型酵素について好ましく変異される。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質の１つ以上の触媒ドメインは、標的配列の１つのＤＮＡ鎖のみを

切断する変異されたＣａｓタンパク質を産生するために変異される。
【０３１４】
特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、変異されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質が実質的に全てのＤＮＡ切断活性を欠くように、対応する野生型酵素に対して変異され得る。いくつかの実施形態では、変異された酵素の切断活性が、酵素の非変異形態の核酸切断活性の約２５％、１０％、５％、１％、０．１％、０．０１％以下、またはそれ以下である際、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、実質的に全てのＤＮＡ及び／またはＲＮＡ切断活性を欠いていると考えられ得、例は、変異形態の核酸切断活性が非変異形態と比較して無または無視できる際であり得る。
【０３１５】
本明細書に提供される方法のある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、１つのＤＮＡ鎖、すなわち、ニッカーゼのみを切断する変異されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質である。より具体的には、本発明の文脈では、ニッカーゼは、非標的配列、すなわち、標的配列の反対ＤＮＡ鎖上にあり、ＰＡＭ配列の３’である配列内の切断を確実にする。さらなるガイダンスの手段によって、かつ限定することなく、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．からのＣａｓ１３のＮｕｃドメインにおけるアルギニンからアラニンへの置換（Ｒ１２２６Ａ）は、両方の鎖を切断するヌクレアーゼからＣａｓ１３をニッカーゼに変換する（単鎖を切断する）。酵素がＡｓＣａｓ１３でない場合変異が対応する位置における残基でなされ得ることは、当業者によって理解されるであろう。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３はＦｎＣａｓ１３であり、変異は位置Ｒ１２１８のアルギニンにある。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３はＬｂＣａｓ１３であり、変異は位置Ｒ１１３８のアルギニンにある。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３はＭｂＣａｓ１３であり、変異は位置Ｒ１２９３のアルギニンにある。
【０３１６】
本明細書に提供される方法のある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、低減した触媒活性を有するか、または有しない。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質がＣａｓ１３タンパク質である場合、変異は、ＡｓＣａｓ１３内の位置についてＤ９０８ＡまたはＥ９９３Ａのような触媒ＲｕｖＣ様ドメインにおける１つ以上の変異を含み得るが、これらに限定されない。
【０３１７】
いくつかの実施形態では、変異された酵素のＤＮＡ切断活性が、酵素の非変異形態のＤＮＡ切断活性の約２５％、１０％、５％、１％、０．１％、０．０１％以下、またはそれ以下である際、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、実質的に全てのＤＮＡ切断活性を欠いていると考えられ、例は、変異形態のＤＮＡ切断活性が非変異形態と比較して無または無視できる際であり得る。これらの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、一般的なＤＮＡ結合タンパク質として使用される。変異は、人工的に導入された変異または機能獲得もしくは機能消失変異であり得る。
【０３１８】
上記に記載の変異に加えて、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は追加的に修飾され得る。本明細書で使用される場合、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質に関する用語「修飾された」は、一般に、それが由来する野生型Ｃａｓタンパク質と比較して、１つ以上の修飾または変異（点変異、トランケーション、挿入、欠失、キメラ、融合タンパク質などを含む）を有するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質を指す。由来するによって、由来する酵素が、野生型酵素との高い程度の配列相同性を有する意味に大きく基づいているが、当該技術分野で既知であるか、または本明細書に記載されるように、それが何らかの方法で変異（修飾）されていることが意味される。
【０３１９】
いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３ｂエフェクター及び１つ以上の機能的ドメインの融合タンパク質のサイズを低減させるために、Ｃａｓ１３ｂエフェクターの末端は、依然としてそのＲＮＡ結合機能を維持しながら切断され得る。例えば、少なくとも２０の

アミノ酸、少なくとも５０のアミノ酸、少なくとも８０のアミノ酸、または少なくとも１００のアミノ酸、または少なくとも１５０のアミノ酸、または少なくとも２００のアミノ酸、または少なくとも２５０のアミノ酸、または少なくとも３００のアミノ酸、または少なくとも３５０のアミノ酸、または最大１２０のアミノ酸、または最大１４０のアミノ酸、または最大１６０のアミノ酸、または最大１８０のアミノ酸、または最大２００のアミノ酸、または最大２５０のアミノ酸、または最大３００のアミノ酸、または最大３５０のアミノ酸、または最大４００のアミノ酸は、Ｃａｓ１３ｂエフェクターの末端で切断され得る。Ｃａｓ１３ｂトランケーションの特定の例は、Ｃ末端Δ９８４－１０９０、Ｃ末端Δ１０２６－１０９０、及びＣ末端Δ１０５３－１０９０、Ｃ末端Δ９３４－１０９０、Ｃ末端Δ８８４－１０９０、Ｃ末端Δ８３４－１０９０、Ｃ末端Δ７８４－１０９０、及びＣ末端Δ７３４－１０９０であり、アミノ酸位置は、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｓｐ．のＰ５－１２５　Ｃａｓ１３ｂタンパク質のアミノ酸位置に対応する。図６７も参照されたい。

【０３２０】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の追加的な修飾は、改変された機能性を引き起こすか、または引き起こさないかもしれない。例の手段によって、特にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質に関して、改変された機能性をもたらさない修飾は、例えば、特定の宿主への発現のためのコドン最適化、またはヌクレアーゼに特定のマーカーを提供すること（例えば、可視化のための）を含む。を用いた修飾は、改変された機能性をもたらすことができ、点変異、挿入、欠失、トランケーション（分割ヌクレアーゼを含む）などを含むこともできる。融合タンパク質は、例えば、異種ドメインまたは機能的ドメイン（例えば、局在化シグナル、触媒ドメインなど）との融合を含むが限定しない。ある特定の実施形態では、様々な異なる修飾は組み合わされ得る（例えば、切断（例えば、異なるヌクレアーゼ（ドメイン））、変異、欠失、挿入、置き換え、ライゲーション、切断または組換えを含むが限定しないような、例えば、ＤＮＡメチル化または別の核酸修飾を誘導するような、触媒的に不活性であり機能的ドメインにさらに融合される、変異されたヌクレアーゼ）。本明細書で使用される場合、「改変された機能性」は、改変された特異性（例えば、改変された標的認識、増加した（例えば、「増強した」Ｃａｓタンパク質）または減少した特異性、または改変されたＰＡＭ認識）、改変された活性（例えば、触媒的に不活性なヌクレアーゼまたはニッカーゼを含む、増加したまたは減少した触媒活性）、及び／または改変された安定性（例えば、不安定化ドメインとの融合）を含むが限定しない。好適な異種ドメインは、ヌクレアーゼ、リガーゼ、修復タンパク質、メチルトランスフェラーゼ、（ウイルス）インテグラーゼ、リコンビナーゼ、トランスポゼース、アルゴノート、シチジンデアミナーゼ、レトロン、グループＩＩイントロン、ホスファターゼ、ホスホリラーゼ、スルフリラーゼ、キナーゼ、ポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼなどを含むが限定しない。全てのこれらの修飾の例は、当該技術分野において既知である。本明細書で参照される「修飾された」ヌクレアーゼ、及び特に「修飾された」Ｃａｓまたは「修飾された」ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムまたは複合体は、好ましくは依然として、（例えば、ガイド分子と複合体で）ポリ核酸と相互作用するか、またはポリ核酸に結合する能力を有することが理解されるであろう。かかる修飾されたＣａｓタンパク質は、本明細書に記載されるように、デアミナーゼタンパク質またはその活性ドメインと組み合わせられ得る。

【０３２１】

ある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、標的化されたまたは標的化されていない鎖を安定化させる変異残基を含むような、増強された活性及び／または特異性をもたらす１つ以上の修飾を含むことができる（例えば、ｅＣａｓ９、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる“Ｒａｔｉｏｎａｌｌｙ　ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ　Ｃａｓ９　ｎｕｃｌｅａｓｅｓ　ｗｉｔｈ　ｉｍｐｒｏｖｅｄ　ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ”，Ｓｌａｙｍａｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６），Ｓｃｉｅｎｃｅ，３５１（６２６８）：８４－８８）。ある特定の実施形態では、操作されたＣＲＩＳＰＲタンパク質の改変または修飾された活性は、増加した標的化効率または減少したオフターゲット結合を含む

。ある特定の実施形態では、操作されたＣＲＩＳＰＲタンパク質の改変された活性は、修飾された切断活性を含む。ある特定の実施形態では、改変された活性は、標的ポリヌクレオチド座位に関して増加した切断活性を含む。ある特定の実施形態では、改変された活性は、標的ポリヌクレオチド座位に関して減少した切断活性を含む。ある特定の実施形態では、改変された活性は、オフターゲットポリヌクレオチド座位に関して減少した切断活性を含む。ある特定の実施形態では、修飾されたヌクレアーゼの改変または修飾された活性は、改変されたヘリカーゼ動態を含む。ある特定の実施形態では、修飾されたヌクレアーゼは、ＲＮＡ（Ｃａｓタンパク質の場合）、または標的ポリヌクレオチド座位の鎖、またはオフターゲットポリヌクレオチド座位の鎖を含む核酸分子とのタンパク質の会合を改変する修飾を含む。本発明の一態様では、操作されたＣＲＩＳＰＲタンパク質は、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を改変する修飾を含む。ある特定の実施形態では、改変された活性は、オフターゲットポリヌクレオチド座位に関して増加した切断活性を含む。したがって、ある特定の実施形態では、オフターゲットポリヌクレオチド座位と比較して、標的ポリヌクレオチド座位に対する増加した特異性がある。他の実施形態では、オフターゲットポリヌクレオチド座位と比較して、標的ポリヌクレオチド座位に対する特異性が低減している。ある特定の実施形態では、変異は、例えば、標的とガイドＲＮＡとの間のミスマッチに対するより低い体勢をもたらすＣａｓタンパク質についての場合のような減少したオフターゲット効果（例えば、切断または結合特性、活性、または動態）をもたらす。他の変異は、増加したオフターゲット効果（例えば、切断または結合特性、活性、または動態）を引き起こすことができる。他の変異は、増加したまたは減少したオフターゲット効果（例えば、切断または結合特性、活性、または動態）を引き起こすことができる。ある特定の実施形態では、変異は、改変された（例えば、増加または減少した）ヘリカーゼ活性、機能的ヌクレアーゼ複合体（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体）の会合または形成をもたらす。ある特定の実施形態では、上記に記載のように、変異は、改変されたＰＡＭ認識をもたらし、すなわち、修飾されていないタンパク質と比較して、異なるＰＡＭが（加えてまたは代替において）認識され得る。特に好ましい変異は、特異性を増強するための、正荷電残基及び／または保存された正荷電残基のような（進化的に）保存された残基を含む。ある特定の実施形態では、かかる残基は、アラニンのような非荷電残基に変異され得る。

【０３２２】

塩基除去修復阻害剤

いくつかの実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、塩基除去修復（ＢＥＲ）阻害剤をさらに含む。いかなる特定の理論にも束縛されることを望まないが、Ｉ：Ｔ対合の存在に対する細胞ＤＮＡ修復応答は、細胞における核酸塩基編集効率の減少の原因となり得る。アルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼ（ＤＮＡ－３－メチルアデニングリコシラーゼ、３－アルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼ、またはｎ－メチルプリンＤＮＡグリコシラーゼとしても知られる）は、Ｉ：Ｔ対のＡ：Ｔ対への復帰を伴う塩基除去修復を開始することができる、細胞におけるＤＮＡからのヒポキサンチンの除去を触媒する。

【０３２３】

いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、アルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼの阻害剤である。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、ヒトアルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼの阻害剤である。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、ポリペプチド阻害剤である。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、ヒポキサンチンに結合するタンパク質である。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、ＤＮＡにおいてヒポキサンチンに結合するタンパク質である。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、触媒的に不活性なアルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼタンパク質またはその結合ドメインである。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、ＤＮＡからヒポキサンチンを除去しない触媒的に不活性なアルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼタンパク質またはその結合ドメインである。アルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼ塩基除去修復酵素を阻害する（例えば、立体的に遮断する）ことができる他のタンパク質は、本開示の範囲内にある。追加

的に、本開示の範囲内でもあるように、塩基除去修復を遮断または阻害する任意のタンパク質。

【０３２４】

いかなる特定の理論にも束縛されることを望まないが、塩基除去修復は、編集された鎖に結合し、編集された塩基を遮断し、アルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼを阻害し、塩基除去修復を阻害し、編集された塩基を保護し、及び／または編集されていない鎖の固定を促進する分子によって阻害され得る。本明細書に記載のＢＥＲ阻害剤の使用が、Ａ～Ｉ変化を触媒することができるアデノシンデアミナーゼの編集効率を増加させることができると考えられる。

【０３２５】

したがって、上記で論じられたＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの第１の設計において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアデノシンデアミナーゼは、ＢＥＲ阻害剤（例えば、アルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼの阻害剤）に融合または結合され得る。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、以下の構造（ｎＣａｓ１３＝Ｃａｓ１３ニッカーゼ、ｄＣａｓ１３＝死んだＣａｓ１３）、

［ＡＤ］－［任意選択のリンカー］－［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］、

［ＡＤ］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］－［任意のリンカー］－［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］、

［ＢＥＲ阻害剤］－［任意のリンカー］－［ＡＤ］－［任意のリンカー］－［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］、

［ＢＥＲ阻害剤］－［任意のリンカー］－［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］－［任意のリンカー］－［ＡＤ］、

［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］－［任意のリンカー］－［ＡＤ］－［任意のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］、

［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］－［任意のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］－［任意のリンカー］－［ＡＤ］のうちの１つに含まれ得る。

【０３２６】

同様に、上記で論じられたＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの第２の設計において、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、アデノシンデアミナーゼ、またはアダプタータンパク質は、ＢＥＲ阻害剤（例えば、アルキルアデニンＤＮＡグリコシラーゼの阻害剤）に融合または結合され得る。いくつかの実施形態では、ＢＥＲ阻害剤は、以下の構造（ｎＣａｓ１３＝Ｃａｓ１３ニッカーゼ、ｄＣａｓ１３＝死んだＣａｓ１３）、

［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］、

［ＢＥＲ阻害剤］－［任意選択のリンカー］－［ｎＣａｓ１３／ｄＣａｓ１３］、

［ＡＤ］－［任意選択のリンカー］－［アダプター］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］、

［ＡＤ］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］－［任意選択のリンカー］－［アダプター］、

［ＢＥＲ阻害剤］－［任意選択のリンカー］－［ＡＤ］－［任意選択のリンカー］－［アダプター］、

［ＢＥＲ阻害剤］－［任意選択のリンカー］－［アダプター］－［任意選択のリンカー］－［ＡＤ］、

［アダプター］－［任意選択のリンカー］－［ＡＤ］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］、

［アダプター］－［任意選択のリンカー］－［ＢＥＲ阻害剤］－［任意選択のリンカー］－［ＡＤ］のうちの１つに含まれ得る。

【０３２７】

上述のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの第３の設計では、ＢＥＲ阻害剤は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の内部ループまたは非構造領域に挿入され得る。

【０３２８】
核への標的化
いくつかの実施形態では、本発明の方法は、目的の標的座位におけるアデニンを修飾することに関し、それによって標的座位は細胞内にある。本発明の方法で使用されるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び／またはアデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインの核への標的化を向上するために、これらの成分のうちの１つまたは両方に１つ以上の核局在配列（ＮＬＳ）を提供することが有利であり得る。
【０３２９】
好ましい実施形態では、本発明の文脈で使用されるＮＬＳは、タンパク質に対して異種である。ＮＬＳの非限定的な例は、アミノ酸配列ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号１７）またはＰＫＫＫＲＫＶＥＡＳ（配列番号１８）を有するＳＶ４０ウイルスラージＴ抗原のＮＬＳ、核細胞質からのＮＬＳ（例えば、配列ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号１９）を有する核細胞質二分ＮＬＳ）、アミノ酸配列ＰＡＡＫＲＶＫＬＤ（配列番号２０）またはＲＱＲＲＮＥＬＫＲＳＰ（配列番号２１）を有するｃ－ｍｙｃ　ＮＬＳ、配列ＮＱＳＳＮＦＧＰＭＫＧＧＮＦＧＧＲＳＳＧＰＹＧＧＧＧＱＹＦＡＫＰＲＮＱＧＧＹ（配列番号２２）を有するｈＲＮＰＡ１　Ｍ９　ＮＬＳ、インポーチン－アルファからのＩＢＢドメインの配列ＲＭＲＩＺＦＫＮＫＧＫＤＴＡＥＬＲＲＲＶＥＶＳＶＥＬＲＫＡＫＫＤＥＱＩＬＫＲＲＮＶ（配列番号２３）、筋腫Ｔタンパク質の配列ＶＳＲＫＲＰＲＰ（配列番号２４）及びＰＰＫＫＡＲＥＤ（配列番号２５）、ヒトｐ５３の配列ＰＱＰＫＫＫＰＬ（配列番号２６）、マウスｃ－ａｂｌ　ＩＶの配列ＳＡＬＩＫＫＫＫＫＭＡＰ（配列番号２７）、インフルエンザウイルスＮＳ１の配列ＤＲＬＲＲ（配列番号２８）及びＰＫＱＫＫＲＫ（配列番号２９）、肝炎ウイルスデルタ抗体の配列ＲＫＬＫＫＫＩＫＫＬ（配列番号３０）、マウスＭｘ１タンパク質の配列ＲＥＫＫＫＦＬＫＲＲ（配列番号３１）、ヒトポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼの配列ＫＲＫＧＤＥＶＤＧＶＤＥＶＡＫＫＫＳＫＫ（配列番号３２）、ならびにステロイドホルモン受容体（ヒト）グルココルチコイドの配列ＲＫＣＬＱＡＧＭＮＬＥＡＲＫＴＫＫ（配列番号３３）から由来するＮＬＳ配列を含む。一般に、１つ以上のＮＬＳは、真核細胞の核における検出可能な量でＤＮＡ標的化タンパク質の蓄積を駆動するのに十分に強い。一般に、核局在活性の強度は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質におけるＮＬＳの数、使用される特定のＮＬＳ（複数可）、またはこれらの因子の組み合わせから由来することができる。核における蓄積の検出は、任意の好適な技術によって実行され得る。例えば、検出可能なマーカーは、細胞内の位置が、例えば、核の位置を検出する手段（例えば、ＤＡＰＩのような核に特異的な染色）と組み合わせるように可視化され得る核酸標的化タンパク質に融合され得る。細胞核はまた、細胞から単離され得、その内容は次いで、免疫組織化学、ウエスタンブロット、または酵素活性アッセイのようなタンパク質を検出するための任意の好適なプロセスによって分析され得る。核における蓄積は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及びデアミナーゼタンパク質に曝露されないか、または１つ以上のＮＬＳを欠くＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ及び／またはデアミナーゼタンパク質に曝露される対照と比較して、標的配列、またはＤＮＡ標的化複合体形成及び／またはＤＮＡ標的化）によって影響される改変された遺伝子発現活性についてのアッセイでの核酸標的化複合体形成の効果についてのアッセイ（例えば、デアミナーゼ活性についてのアッセイ）によるように、間接的にも決定され得る。
【０３３０】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ及び／またはアデノシンデアミナーゼタンパク質は、１以上、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上の異種ＮＬＳと共に提供され得る。いくつかの実施形態では、タンパク質は、アミノ末端でまたはアミノ末端近傍で約または約１超、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上のＮＬＳ、カルボキシ末端またはカルボキシ末端近傍で約または約１超、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上のＮＬＳ、またはこれらの組み合わせ（例えば、アミノ末端でゼロまたは少なくとも１以上のＮＬＳ、及びカルボキシ末端でゼロまたは１つ以上のＮＬＳ）を含む。２以上のＮＬＳが存在する際、各々は、単一のＮＬＳが２以上のコピー及び／ま

たは１以上のコピーにおいて存在する１以上の他のＮＬＳと組み合わせて存在し得るように他のものから独立して選択され得る。いくつかの実施形態では、ＮＬＳの最寄りのアミノ酸がＮ末端またはＣ末端からポリペプチド鎖に沿って約１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、またはそれ以上のアミノ酸以内である際、ＮＬＳは、Ｎ末端またはＣ末端近傍と考えられる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の好ましい実施形態では、ＮＬＳは、タンパク質のＣ末端に結合した。

【０３３１】

本明細書に提供される方法のある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及びデアミナーゼタンパク質は、細胞に送達されるか、または細胞内で別個のタンパク質として発現される。これらの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ及びデアミナーゼタンパク質の各々は、本明細書に記載される１つ以上のＮＬＳを有することができる。ある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ及びデアミナーゼタンパク質は、細胞に送達されるか、または細胞と共に融合タンパク質として発現される。これらの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ及びデアミナーゼタンパク質のうちの１つまたは両方に、１つ以上のＮＬＳが提供される。アデノシンデアミナーゼが上記に記載のようにアダプタータンパク質（ＭＳ２のような）に融合される場合、このことがアプタマー結合に干渉しないことを条件として、１つ以上のＮＬＳは、アダプタータンパク質上に提供され得る。特定の実施形態では、１つ以上のＮＬＳ配列は、アデノシンデアミナーゼとＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質との間のリンカー配列としても機能することができる。

【０３３２】

ある特定の実施形態では、本発明のガイドは、アデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインに結合または融合され得るアダプタータンパク質に対する特異的結合部位（例えば、アプタマー）を含む。かかるガイドがＣＲＩＳＰＲ複合体（すなわち、ガイド及び標的に結合するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質）を形成する際、アダプタータンパク質は結合し、アダプタータンパク質と会合するアデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインは、属性機能が有効であるのに有利な空間配向に位置決めされる。

【０３３３】

当業者は、アダプター＋アデノシンデアミナーゼの結合を可能にするが、アダプター＋アデノシンデアミナーゼを適切に位置決めしない（例えば、ＣＲＩＳＰＲ複合体の三次元構造内の立体障害による）ガイドへの修飾が意図されない修飾であることを理解するであろう。１つ以上の修飾されたガイドは、本明細書に記載されるように、テトラループ、ステムループ１、ステムループ２、またはステムループ３で、好ましくはテトラループまたはステムループ２のいずれかで、最も好ましくはテトラループ及びステムループ２の両方で、修飾され得る。

【０３３４】

直交の触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の使用

特定の実施形態では、Ｃａｓ１３ニッカーゼは、該Ｃａｓ１３ニッカーゼの効率を増加させるために、直交の触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質と組み合わせて使用される（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．２０１７，Ｎａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ　８：１４９５８；ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｃｏｍｍｓ１４９５８において説明される）。より具体的には、直交の触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムにおいて使用されるＣａｓ１３ニッカーゼと異なるＰＡＭ認識部位によって特徴付けられ、対応するガイド配列は、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムのＣａｓ１３ニッカーゼのものに近接する標的配列に結合するように選択される。本発明の文脈において使用される直交の触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの一部を形成せず、単に該Ｃａｓ１３ニッカーゼの効率を増加させるために機能するだけであり、該ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質に対する当該技術分野において説明される標準ガイド分子と組み合わせて使用される。特定の実施形態では、該直交の触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、死んだＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質であり、すなわち、該ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質

のヌクレアーゼ活性を廃止する１つ以上の変異を含む。特定の実施形態では、触媒的に不活性な直交ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ１３ニッカーゼの標的配列に近接する標的配列にハイブリダイズすることが可能な２つ以上のガイド分子が提供される。特定の実施形態では、少なくとも２つのガイド分子は、該触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質を標的化するために使用され、そのうちの少なくとも１つのガイド分子はＣａｓ１３ニッカーゼの標的配列の標的配列５”にハイブリダイズすることができ、少なくとも１つのガイド分子は、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムのＣａｓ１３ニッカーゼの標的配列の標的配列３’にハイブリダイズすることができ、それによって、該１つ以上の標的配列は、Ｃａｓ１３ニッカーゼの標的配列と同じまたは反対のＤＮＡ鎖上にあり得る。特定の実施形態では、直交の触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の１つ以上のガイド分子についてのガイド配列は、標的配列がＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲの標的化について、すなわちＣａｓ１３ニッカーゼの標的化についてのガイド分子のものに近接するように選択される。特定の実施形態では、直交の触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ酵素の１つ以上の標的配列は、各々、Ｃａｓ１３ニッカーゼの標的配列から６以上だが４５０未満の塩基対によって分離される。直交に触媒的に不活性なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質での使用のためのガイドの標的配列とＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの標的配列との間の最適な距離は、当業者によって決定され得る。特定の実施形態では、直交のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、クラスＩＩ、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲタンパク質である。特定の実施形態では、直交のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、クラスＩＩ、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲタンパク質である。特定の実施形態では、触媒的に不活性な直交ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質特定の実施形態では、触媒的に不活性な直交ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、本明細書の他の箇所に記載されるように、そのＰＡＭ特異性を改変するように修飾されている。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質ニッカーゼは、それ自体がヒト細胞において限定された活性を有するが、不活性な直交ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び１つ以上の対応する近位ガイドと組み合わせて、必要なニッカーゼ活性を確実にするニッカーゼである。

【０３３５】

ＣＲＩＳＰＲ開発及び使用

本発明は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ開発及び使用の態様ならびに以下の文献に記載される使用に基づいてさらに例示及び拡張され得、特に、ＣＲＩＳＰＲタンパク質複合体の送達及び細胞及び生物におけるＲＮＡ誘導エンドヌクレアーゼの使用に関する。

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

ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｅｄｉｔｉｎｇ ｏｆ ｂａｃｔｅｒｉａｌ ｇｅｎｏｍｅｓ ｕｓｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ．Ｊｉａｎｇ Ｗ．，Ｂｉｋａｒｄ Ｄ．，Ｃｏｘ Ｄ．，Ｚｈａｎｇ Ｆ，Ｍａｒｒａｆｆｉｎｉ ＬＡ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｍａｒ；３１（３）：２３３－９（２０１３）、

Ｏｎｅ－Ｓｔｅｐ Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｉｃｅ Ｃａｒｒｙｉｎｇ Ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｇｅｎｅｓ ｂｙ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．Ｗａｎｇ Ｈ．，Ｙａｎｇ Ｈ．，Ｓｈｉｖａｌｉｌａ ＣＳ．，Ｄａｗｌａｔｙ ＭＭ．，Ｃｈｅｎｇ ＡＷ．，Ｚｈａｎｇ Ｆ．，Ｊａｅｎｉｓｃｈ Ｒ．Ｃｅｌｌ Ｍａｙ ９；１５３（４）：９１０－８（２０１３）、

Ｏｐｔｉｃａｌ ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃ ｓｔａｔｅｓ．Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ Ｓ，Ｂｒｉｇｈａｍ ＭＤ，Ｔｒｅｖｉｎｏ ＡＥ，Ｈｓｕ ＰＤ，Ｈｅｉｄｅｎｒｅｉｃｈ Ｍ，Ｃｏｎｇ Ｌ，Ｐｌａｔｔ ＲＪ，Ｓｃｏｔｔ ＤＡ，Ｃｈｕｒ

ch GM, Zhang F. Nature. Aug 22;500(7463):472-6. doi:10.1038/Nature12466. Epub 2013 Aug 23(2013)、
Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. Ran, FA., Hsu, PD., Lin, CY., Gootenberg, JS., Konermann, S., Trevino, AE., Scott, DA., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., &Zhang, F. Cell Aug 28. pii:S0092-8674(13)01015-5(2013-A)、
DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Hsu, P., Scott, D., Weinstein, J., Ran, FA., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E., Wu, X., Shalem, O., Cradick, TJ., Marraffini, LA., Bao, G., &Zhang, F. Nat Biotechnol doi:10.1038/nbt.2647(2013)、
Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Ran, FA., Hsu, PD., Wright, J., Agarwala, V., Scott, DA., Zhang, F. Nature Protocols Nov;8(11):2281-308(2013-B)、
Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. Shalem, O., Sanjana, NE., Hartenian, E., Shi, X., Scott, DA., Mikkelson, T., Heckl, D., Ebert, BL., Root, DE., Doench, JG., Zhang, F. Science Dec 12. (2013)、
Crystal structure of cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Nishimasu, H., Ran, FA., Hsu, PD., Konermann, S., Shehata, SI., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., Nureki, O. Cell Feb 27, 156(5):935-49(2014)、
Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. Wu X., Scott DA., Kriz AJ., Chiu AC., Hsu PD., Dadon DB., Cheng AW., Trevino AE., Konermann S., Chen S., Jaenisch R., Zhang F., Sharp PA. Nat Biotechnol. Apr 20. doi:10.1038/nbt.2889(2014);
CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling. Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng G, Sharp PA, Zhang F. Cell 159(2):440-455 DOI:10.1016/j.cell.2014.09.014(2014)、
Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering, Hsu PD, Lander ES, Zhang F., Cell. Jun 5;157(6):1262-78(2014).
Genetic screens in human cells using th

e CRISPR-Cas9 system, Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES., Science. January 3;343(6166):80-84. doi:10.1126/science.1246981(2014)、
Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation, Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, Sullender M, Ebert BL, Xavier RJ, Root DE., (published online 3 September 2014) Nat Biotechnol. Dec;32(12):1262-7(2014)、
In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9, Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li Y, Trombetta J, Sur M, Zhang F., (published online 19 October 2014) Nat Biotechnol. Jan;33(1):102-6(2015)、
Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex, Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F., Nature. Jan 29;517(7536):583-8(2015).
A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation, Zetsche B, Volz SE, Zhang F., (published online 02 February 2015) Nat Biotechnol. Feb;33(2):139-42(2015)、
Genome-wide CRISPR Screen in a Mouse Model of Tumor Growth and Metastasis, Chen S, Sanjana NE, Zheng K, Shalem O, Lee K, Shi X, Scott DA, Song J, Pan JQ, Weissleder R, Lee H, Zhang F, Sharp PA. Cell 160, 1246-1260, March 12, 2015(multiplex screen in mouse)、及び
In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9, Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F., (published online 01 April 2015), Nature. Apr 9;520(7546):186-91(2015).
Shalem et al., "High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9," Nature Reviews Genetics 16, 299-311(May 2015).
Xu et al., "Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design," Genome Research 25, 1147-1157(August 2015).
Parnas et al., "A Genome-wide CRISPR Screen in Primary Immune Cells to Dissect R

egulatory Networks,”Cell 162,675−686（July 30,2015）.
Ramanan et al.,CRISPR−Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus,”Scientific Reports 5:10833.doi:10.1038/srep10833（June 2,2015）
Nishimasu et al.,Crystal Structure of Staphylococcus aureus Cas9,”Cell 162,1113−1126（Aug.27,2015）
BCL11A enhancer dissection by Cas9−mediated in situ saturating mutagenesis,Canver et al.,Nature 527（7577）:192−7（Nov.12,2015）doi:10.1038/nature15521.Epub 2015 Sep 16.
Cas13 Is a Single RNA−Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR−Cas System,Zetsche et al.,Cell 163,759−71（Sep 25,2015）.
Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR−Cas Systems,Shmakov et al.,Molecular Cell,60（3）,385−397 doi:10.1016/j.molcel.2015.10.008 Epub October 22,2015.
Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity,Slaymaker et al.,Science 2016 Jan 1 351（6268）:84−88 doi:10.1126/science.aad5227.Epub 2015 Dec 1.
Gao et al,“Engineered Cas13 Enzymes with Altered PAM Specificities,”bioRxiv 091611;doi:http://dx.doi.org/10.1101/091611（Dec.4,2016）.

これらの各々が、参照により本明細書に組み込まれ、本発明の実施において考えられ得、以下に簡単に論じられる。

Cong et al.は、Streptococcus thermophilus Cas9及びStreptococcus pyogenes Cas9の両方にも基づく真核細胞における使用のためのII型CRISPR−Casシステムを操作し、ヒト及びマウス細胞においてCas9ヌクレアーゼが短いRNAによってDNAの正確な切断を誘導するように導かれ得ることを示した。彼らの研究は、ニッキング酵素に変換されたCas9が最小限の変異誘発活性を有する真核細胞における相同組換え修復（homology−directed repair）を促進するために使用され得ることをさらに示した。追加的に、彼らの研究は、複数のガイド配列が哺乳動物ゲノム内の内因性ゲノム座位部位でいくつかの同時編集を可能にするために単一のCRISPRアレイにコードされ得ることを示し、RNA誘導ヌクレアーゼ技術の容易なプログラマビリティ及び広範な適用性を示した。細胞における配列特異的DNA切断をプログラムするためにRNAを使用する能力は、ゲノム工学ツールの新しいクラスを定義した。これらの研究は、他のCRISPR座位が哺乳動物細胞に移植されそうであり、哺乳動物ゲノム切断を媒介することもできることをさらに示した。重要なことだが、CRISPR−Casシステムのいくつかの側面がその効率と汎用性を増加するためにさらに向上され得ることが想定され得る。

Jiang et al.は、Streptococcus pneumoniae及びEscherichia coliのゲノムに正確な変異を導入するために、デュアルRNAと組み合わされたクラスター化等間隔短鎖回文反復（CRISPR）関連Cas9

エンドヌクレアーゼを使用した。アプローチは変異されない細胞を死滅させるための標的化されたゲノム部位でデュアルＲＮＡ：Ｃａｓ９指向性切断に依存し、選択可能なマーカーまたはカウンターセレクションシステムに対する必要性を回避する研究は、編集テンプレート上で行われる単一ヌクレオチド及び複数ヌクレオチド変化を行うために短いＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）の配列を変更することによる、デュアルＲＮＡ：Ｃａｓ９特異性を再プログラミングすることを報告した。研究は、２つのｃｒＲＮＡの同時使用が多重変異誘発を可能にしたことを示した。さらに、アプローチが組換えと組み合わせて使用された際、Ｓ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅでは記載のアプローチを使用して回収された細胞のほぼ１００％が所望の変異を含み、Ｅ．ｃｏｌｉでは回収された６５％が変異を含んでいた。

Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）は、単一の変異を有するマウスの胚性幹細胞における連続組換え及び／または時間のかかる相互交差による複数のステップで従来生成された、複数の遺伝子における変異を担持するマウスの１ステップ生成のためのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを使用した。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、機能的に冗長な遺伝子及びエピスタティック遺伝子相互作用のインビボ研究を大幅に加速させるであろう。

Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）は、ＤＮＡ結合ドメインベースのＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ９酵素及び転写活性化因子様エフェクターの光学的及び化学的調節も可能にする多機能かつ汎用性があり頑健な当該技術の必要性に対処した。

Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３－Ａ）は、Ｃａｓ９ニッカーゼ変異体と対合したガイドＲＮＡを組み合わせて、標的化された二本鎖切断を導入するアプローチを説明した。これは、ＤＮＡ標的に対するある特定のミスマッチを許容し、それによって望ましくないオフターゲット変異誘発を促進することができる、ガイド配列によって特定のゲノム座位に標的化された微生物ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムからの Ｃａｓ９ヌクレアーゼの問題に対処する。ゲノムにおける個々のニックは高い忠実度で修復されるため、適切にオフセットガイドＲＮＡを介した同時ニッキングは、二本鎖切断のために必要であり、標的切断のために特異的に認識される塩基の数を拡張する。著者らは、対合したニッキングを使用することがオフターゲット活性を細胞株において５０～１，５００倍低減させることができることと、オンターゲット切断効率を犠牲にすることなく、マウス接合体における遺伝子ノックアウトを促進することができることとを示した。この汎用戦略は、高い特異性を必要とする多種多様なゲノム編集用途を可能にする。

Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）は、標的部位の選択を知らせ、オフターゲット効果を回避するために、ヒト細胞における特異性を標的化するＳｐＣａｓ９を特徴付けた。研究は、２９３Ｔ細胞及び２９３ＦＴ細胞における１００超の予測されたゲノムオフターゲット座位で７００超のＲＮＡバリアント及びＳｐＣａｓ９誘導性インデル変異レベルを評価した。ＳｐＣａｓ９が配列依存的様式で異なる位置でのガイドＲＮＡと標的ＤＮＡとのミスマッチを許容する著者、ミスマッチの数、位置及び分布に感受性がある。著者らはさらに、ＳｐＣａｓ９媒介性切断がＤＮＡメチル化によって影響されないことと、ＳｐＣａｓ９及びガイドＲＮＡの用量がオフターゲット修飾を最小化するために滴定され得ることを示した。追加的に、哺乳動物ゲノム工学用途を促進するために、著者らは、オフターゲット分析と同様に標的配列の選択及び検証を誘導するためのウェブベースのソフトウェアツールを提供することを報告した。

Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３－Ｂ）は下流機能研究のための修飾された細胞株の生成と同様に、哺乳動物細胞における非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同組換え修復（ＨＤＲ）を介したＣａｓ９媒介性ゲノム編集のためのツールのセットを説明した。オフターゲット切断を最小化するために、著者らは、対合したガイドＲＮＡを有するＣａｓ９ニッカーゼ変異体を使用した二重ニッキング戦略をさらに説明した。著者らによって提供されるプロトコルは、標的部位の選択、切断効率の評価、及びオフターゲット活性の分析のためのガイドラインを実験的に導き出した。研究は、標的設計で始まる遺伝子改変が最短１～２週間以内に達成され得、修飾されたクローナル細胞株が２～３週間以内に導き出すことができることを示した。

Ｓｈａｌｅｍ　ｅｔ　ａｌ．は、ゲノムワイドな規模で遺伝子機能を調べる新しい方法を説明した。彼らの研究は、６４，７５１のユニークなガイド配列を有する１８，０８０の遺伝子を標的化したゲノムスケールのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ノックアウト（ＧｅＣＫＯ）ライブラリの送達が、ヒト細胞における負及び正の選択スクリーニング両方を可能にしたことを示した。まず、著者らは、がん及び多能性幹細胞における細胞生存に必須の遺伝子を特定するためのＧｅＣＫＯライブラリの使用を示した。次に、黒色腫モデルにおいて、著者らは変異タンパク質キナーゼＢＲＡＦを阻害する治療薬であるベムラフェニブへの耐性にその損失が関与する遺伝子をスクリーニングした。彼らの研究は、最も高いランキングの候補が以前に検証された遺伝子ＮＦ１及びＭＥＤ１２、同様に新規のヒットＮＦ２、ＣＵＬ３、ＴＡＤＡ２Ｂ、及びＴＡＤＡ１を含むことを示した。著者らは、同じ遺伝子を標的化する独立したガイドＲＮＡとヒット確認の高い率との間で高いレベルの一貫性を観察し、したがって、Ｃａｓ９でのゲノム規模のスクリーニングの見込みを示した。

Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　ｅｔ　ａｌ．は、ｓｇＲＮＡ及びその標的ＤＮＡを有する複合体におけるＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９の結晶構造を、２．５Ａ°解像度で報告した。構造は、それらの界面の正荷電溝においてｓｇＲＮＡ：ＤＮＡｎ　ＲＮＡ二本鎖を収容する標的認識及びヌクレアーゼローブからなる二本鎖アーキテクチャを明らかにした。認識ローブはｓｇＲＮＡ及びＤＮＡを結合するのに必須であるが、ヌクレアーゼローブは、それぞれ標的ＤＮＡの相補鎖及び非相補鎖の切断のために適切に位置決めされるＨＮＨ及びＲｕｖＣヌクレアーゼドメインを含有する。ヌクレアーゼローブは、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）との相互作用を担うカルボキシル末端ドメインも含有する。この高解像度構造及び付随する機能分析は、Ｃａｓ９によるＲＮＡ誘導ＤＮＡ標的化の分子機構を明らかにし、したがって新しい汎用的ゲノム編集技術の合理的設計のための道を開いている。

Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．は、マウス胚性幹細胞（ｍＥＳＣ）におけるシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）で負荷したＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓからの触媒的に不活性なＣａｓ９（ｄＣａｓ９）のゲノムワイドな結合部位をマッピングした。著者らは、試験した４つのｓｇＲＮＡの各々がｄＣａｓ９をｓｇＲＮＡ中の５ヌクレオチドシード領域及び隣接するＮＧＧプロトスペーサー（ＰＡＭ）によって頻繁に特徴付けられる数十～数万のゲノム部位に標的化させることを示した。クロマチンのアクセス不可能性は、マッチングシード配列を有する他の部位へのｄＣａｓ９結合を減少させ、したがって、オフターゲット部位の７０％は遺伝子と会合する。著者らは、触媒的に活性なＣａｓ９でトランスフェクトされたｍＥＳＣにおける２９５のｄＣａｓ９結合部位の標的化されたシークエンシングが背景レベルを上回る１つの変異された部位のみを特定したことを示した。著者らは、シードマッチが結合を誘発するが、標的ＤＮＡとの広範な対合が切断のために必要とされる、Ｃａｓ９結合及び切断のための２相モデルを提案した。

Ｐｌａｔｔ　ｅｔ　ａｌ．は、Ｃｒｅ依存性Ｃａｓ９ノックインマウスを確立した。著者らは、神経細胞、免疫細胞、及び内皮細胞におけるガイドＲＮＡのアデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）、レンチウイルス、または粒子媒介性送達を使用するエクスビボと同様インビボゲノム編集を示した。

Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）は、細胞の遺伝子スクリーニングを含む、ヨーグルトからゲノム編集までのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９の歴史を一般に論じるレビュー文献である。

Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４）は、ゲノムスケールのレンチウイルスシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）ライブラリを使用する正及び負の選択の両方に適した、プールされた機能欠失遺伝子スクリーニングのアプローチに関する。

Ｄｏｅｎｃｈ　ｅｔ　ａｌ．は、ｓｇＲＮＡのプールを作成し、６つの内因性マウス及び３つの内因性ヒト遺伝子のパネルの全ての可能な標的部位にわたってタイリングし、抗体染色及びフローサイトメトリーによってそれらの標的遺伝子のヌル対立遺伝子を産生するそれらの能力を定量的に評価した。著者らは、ＰＡＭの最適化が活性を向上させ、ｓｇＲＮＡを設計するためのオンラインツールも提供したことを示した。

Ｓｗｉｅｃｈ　ｅｔ　ａｌ．は、ＡＡＶ媒介性ＳｐＣａｓ９ゲノム編集が、脳における遺伝子機能の逆遺伝子研究を可能にすることができることを実証する。

Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、複数のエフェクタードメイン、例えば、リンカーの有無に関わらずステムまたはテトラループのようなガイド上の適切な位置に転写活性化因子、機能性及びエピゲノム調節剤を結合する能力を論じる。

Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．は、Ｃａｓ９酵素が２つに分割され得、したがって活性化のためのＣａｓ９の組み立てが制御され得ることを示す。

Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．は、マウスにおけるゲノムワイドなインビボＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９スクリーンが肺転移を調節する遺伝子を明らかにすることを示すことによる多重スクリーニングに関する。

Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、ＳａＣａｓ９及びそのゲノムを編集する能力に関し、誰も生化学的アッセイから外挿できないことを示す。

Ｓｈａｌｅｍ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、アレイされプールされたスクリーン、ゲノム座位を不活性化するノックアウトアプローチ、及び転写活性を調節する戦略を含む、ゲノムスケールのスクリーンについてＣａｓ９を使用する進歩を示し、触媒的に不活性なＣａｓ９（ｄＣａｓ９）融合物が発現を合成的に抑制（ＣＲＩＳＰＲｉ）または活性化（ＣＲＩＳＰＲａ）するために使用される方法を説明した。

Ｘｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、ＣＲＩＳＰＲベースのシステムにおいて、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）効率に貢献するＤＮＡ配列特徴を評価した。著者らは、切断部位でのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ノックアウト及びヌクレオチド嗜好性の効率を探求した。著者らはまた、ＣＲＩＳＰＲｉ／ａに対する配列の嗜好性が、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ノックアウトに対するものと実質的に異なることも発見した。

Ｐａｒｎａｓ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、ゲノムワイドなプールされたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ライブラリを樹状細胞（ＤＣ）に導入し、細菌性リポ多糖（ＬＰＳ）による腫瘍壊死因子（Ｔｎｆ）の誘導を制御する遺伝子を特定した。Ｔｌｒ４シグナル伝達の既知の調節因子及び以前に知られていない候補は、特定されてＬＰＳに対する基準応答に対する異なる効果を有する３つの機能モジュールに分類された。

Ｒａｍａｎａｎ　ｅｔ　ａｌ（２０１５）は、感染した細胞におけるウイルスエピソームＤＮＡ（ｃｃｃＤＮＡ）の切断を示した。ＨＢＶゲノムは、その複製が現在の療法によって阻害されないＨＢＶライフサイクルにおける重要な成分である、完全閉環二本鎖ＤＮＡ（ｃｏｖａｌｅｎｔｌｙ　ｃｌｏｓｅｄ　ｃｉｒｃｕｌａｒ　ＤＮＡ、ｃｃｃＤＮＡ）と呼ばれる３．２ｋｂの二本鎖エピソームＤＮＡ種として感染した肝細胞の核内に存在する。著者らは、ＨＢＶの高度に保存された領域を特異的に標的化するｓｇＲＮＡが、ウイルスの複製及び枯渇したｃｃｃＤＮＡを頑健に抑制することを示した。

Ｎｉｓｈｉｍａｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、５’－ＴＴＧＡＡＴ－３’ＰＡＭ及び５’－ＴＴＧＧＧＴ－３’ＰＡＭを含有する、単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）及びその二本鎖ＤＮＡ標的と複合したＳａＣａｓ９の結晶構造を報告した。ＳａＣａｓ９とＳｐＣａｓ９との構造的比較は、構造的な保存及び発散の両方を強調し、それらの異なるＰＡＭ特異性及び直交ｓｇＲＮＡ認識を説明した。

Ｃａｎｖｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、非コードゲノム元素のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ベースの機能的調査を示した。著者ら我々は、エンハンサーの重要な特徴を明らかにしたヒト及びマウスＢＣＬ１１Ａエンハンサーのインサイツ飽和変異誘発を実行するためのプールされたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ガイドＲＮＡライブラリを開発した。

Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、Ｃａｓ９とは異なる特徴を有するＦｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ　Ｕ１１２由来のクラス２　ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼであるＣａｓ１３の特徴付けを報告した。Ｃａｓ１３は、ｔｒａｃｒＲＮＡを欠く単一のＲＮＡ誘導エンドヌクレアーゼであり、Ｔ－リッチなプロトスペーサー隣接モチーフを利用し、ねじれ型のＤＮＡ二本鎖切断を介してＤＮＡを切断する。

Ｓｈｍａｋｏｖ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）は、３つの異なるクラス２　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを報告した。２つの系統ＣＲＩＳＰＲ酵素（Ｃ２ｃ１及びＣ２ｃ３）は

、Ｃａｓ１３に遠位に関連するＲｕｖＣ様エンドヌクレアーゼドメインを含有する。Ｃａｓ１３とは異なり、Ｃ２ｃ１は、ＤＮＡ切断についてｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡの両方に依存する。第３の酵素（Ｃ２ｃ２）は、２つの予測されるＨＥＰＮ　ＲＮａｓｅドメインを含有し、ｔｒａｃｒＲＮＡ独立である。

Ｓｌａｙｍａｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ（２０１６）は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９（ＳｐＣａｓ９）の特異性を向上させるための構造誘導タンパク質工学の使用を報告した。著者らは、低減されたオフターゲット効果を有する頑健なオンターゲット切断を維持する「増強された特異性」ＳｐＣａｓ９（ｅＳｐＣａｓ９）バリアントを開発した。

【０３３６】

本明細書に提供される方法及びツールは、ｔｒａｃｒＲＮＡを利用しないＩＩ型ヌクレアーゼであるＣａｓ１３について例示される。Ｃａｓ１３のオーソログは、本明細書に記載の異なる細菌種において特定されている。同様の特性を有するさらなるＩＩ型ヌクレアーゼは、当該技術分野に記載の方法を使用して特定され得る（Ｓｈｍａｋｏｖ　ｅｔ　ａｌ．２０１５，６０：３８５－３９７、Ａｂｕｄａｙｅｈ　ｅｔ　ａｌ．２０１６，Ｓｃｉｅｎｃｅ，５；３５３（６２９９））。特定の実施形態では、新規のＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質を特定するためのかかる方法は、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ座位の存在を特定するシードをコードするデータベースから配列を選択するステップと、選択された配列におけるオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むシードの１０ｋｂ以内に位置する座位を特定するステップと、その中から単一のＯＲＦのみが７００超のアミノ酸及び既知のＣＲＩＳＰＲエフェクターに対する９０％以下の相同性を有する新規のＣＲＩＳＰＲエフェクターをコードするＯＲＦを含む座位を選択するステップと、を含む。特定の実施形態では、シードは、Ｃａｓ１のような、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムに共通のタンパク質である。さらなる実施形態では、ＣＲＩＳＰＲアレイは、新しいエフェクタータンパク質を特定するためのシードとして使用される。

【０３３７】

本発明の有効性は示されている。Ｃａｓ１３及びｃｒＲＮＡを含む事前組み立てされた組換えＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ１３複合体は、例えば、電気穿孔によってトランスフェクションされ得、高い変異率及び検出可能なオフターゲット変異の不在をもたらす。Ｈｕｒ，Ｊ．Ｋ．ｅｔ　ａｌ，Ｔａｒｇｅｔｅｄ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　ｉｎ　ｍｉｃｅ　ｂｙ　ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｃａｓ１３　ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１６　Ｊｕｎ　６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３５９６．ゲノムワイドな分析は、Ｃａｓ１３が高度に特異的であることを示す。１つの尺度によって、ヒトＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＣａｓ１３について決定されたインビトロ切断部位は、ＳｐＣａｓ９についての有意により少ないものであった。Ｋｉｍ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ－ｗｉｄｅ　ａｎａｌｙｓｉｓ　ｒｅｖｅａｌｓ　ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｉｅｓ　ｏｆ　Ｃａｓ１３　ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅｓ　ｉｎ　ｈｕｍａｎ　ｃｅｌｌｓ，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１６　Ｊｕｎ　６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３６０９．Ｃａｓ１３を用いた効率的な多重システムは、本発明のｔＲＮＡを含有するアレイから処理されたｇＲＮＡを採用するＤｒｏｓｏｐｈｉｌａにおいて示されている。Ｐｏｒｔ，Ｆ．ｅｔ　ａｌ，Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ｏｆ　ｔｈｅ　ＣＲＩＳＰＲ　ｔｏｏｌｂｏｘ　ｉｎ　ａｎ　ａｎｉｍａｌ　ｗｉｔｈ　ｔＲＮＡ－ｆｌａｎｋｅｄ　Ｃａｓ９　ａｎｄ　Ｃａｓ１３　ｇＲＮＡｓ．ｄｏｉ：ｈｔｔｐ：／／ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／０４６４１７．

【０３３８】

また、“Ｄｉｍｅｒｉｃ　ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ　ＦｏｋＩ　ｎｕｃｌｅａｓｅｓ　ｆｏｒ　ｈｉｇｈｌｙ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｇｅｎｏｍｅ　ｅｄｉｔｉｎｇ”，Ｓｈｅｎｇｄａｒ　Ｑ．Ｔｓａｉ，Ｎｉｃｏｌａｓ　Ｗｙｖｅｋｅｎｓ，Ｃｙｄ　Ｋｈａｙｔｅｒ，Ｊｅｎｎｉｆｅｒ　Ａ．Ｆｏｄｅｎ，Ｖｉｓｈａｌ　Ｔｈａｐａｒ，Ｄｅｅｐａｋ　Ｒｅｙｏｎ，ＭａｔｈｅｗＪ．Ｇｏｏｄｗｉｎ，ＭａｒｔｉｎＪ．Ａｒｙｅｅ

，Ｊ．Ｋｅｉｔｈ Ｊｏｕｎｇ Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３２（６）：５６９－７７（２０１４）は、延長された配列を認識しヒト細胞において高い効率を有する内因性遺伝子を編集することができる二量体ＲＮＡ誘導ＦｏｋＩヌクレアーゼに関する。

【０３３９】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ発現真核細胞、マウスのようなＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ発現真核生物と同様に、量及び製剤について含む、方法、材料、送達ビヒクル、ベクター、粒子、ならびにそれらの作製及び使用を含む、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム、その成分、ならびにかかる成分の送達についての一般的情報に関して、以下に対する参照がされる。米国特許第８，９９９，６４１号、同第８，９９３，２３３号、同第８，６９７，３５９号、同第８，７７１，９４５号、同第８，７９５，９６５号、同第８，８６５，４０６号、同第８，８７１，４４５号、同第８，８８９，３５６号、同第８，８８９，４１８号、同第８，８９５，３０８号、同第８，９０６，６１６号、同第８，９３２，８１４号、及び同第８，９４５，８３９号、米国特許公開第ＵＳ２０１４－０３１０８３０号（米国出願第１４／１０５，０３１号）、第ＵＳ２０１４－０２８７９３８Ａ１号（米国出願第１４／２１３，９９１号）、第ＵＳ２０１４－０２７３２３４Ａ１号（米国出願第１４／２９３，６７４号）、第ＵＳ２０１４－０２７３２３２Ａ１号（米国出願第１４／２９０，５７５号）、第ＵＳ２０１４－０２７３２３１号（米国出願第１４／２５９，４２０号）、第ＵＳ２０１４－０２５６０４６Ａ１号（米国出願第１４／２２６，２７４号）、第ＵＳ２０１４－０２４８７０２Ａ１号（米国出願第１４／２５８，４５８号）、第ＵＳ２０１４－０２４２７００Ａ１号（米国出願第１４／２２２，９３０号）、第ＵＳ２０１４－０２４２６９９Ａ１号（米国出願第１４／１８３，５１２号）、第ＵＳ２０１４－０２４２６６４Ａ１号（米国出願第１４／１０４，９９０号）、第ＵＳ２０１４－０２３４９７２Ａ１号（米国出願第１４／１８３，４７１号）、第ＵＳ２０１４－０２２７７８７Ａ１号（米国出願第１４／２５６，９１２号）、第ＵＳ２０１４－０１８９８９６Ａ１号（米国出願第１４／１０５，０３５号）、第ＵＳ２０１４－０１８６９５８号（米国出願第１４／１０５，０１７号）、第ＵＳ２０１４－０１８６９１９Ａ１号（米国出願第１４／１０４，９７７号）、第ＵＳ２０１４－０１８６８４３Ａ１号（米国出願第１４／１０４，９００号）、第ＵＳ２０１４－０１７９７７０Ａ１号（米国出願第１４／１０４，８３７号）及び第ＵＳ２０１４－０１７９００６Ａ１号（米国出願第１４／１８３，４８６号）、第ＵＳ２０１４－０１７０７５３号（米国出願第１４／１８３，４２９号）、第ＵＳ２０１５－０１８４１３９号（米国出願第１４／３２４，９６０号）、１４／０５４，４１４欧州特許出願ＥＰ２７７１４６８（ＥＰ１３８１８５７０．７）、ＥＰ２７６４１０３（ＥＰ１３８２４２３２．６）、及びＥＰ２７８４１６２（ＥＰ１４１７０３８３．５）、及びＰＣＴ特許出願ＷＯ２０１４／０９３６６１（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４７４３）、ＷＯ２０１４／０９３６９４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４７９０）、ＷＯ２０１４／０９３５９５（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６１１）、ＷＯ２０１４／０９３７１８（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４８２５）、ＷＯ２０１４／０９３７０９（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４８１２）、ＷＯ２０１４／０９３６２２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７）、ＷＯ２０１４／０９３６３５（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６９１）、ＷＯ２０１４／０９３６５５（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４７３６）、ＷＯ２０１４／０９３７１２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４８１９）、ＷＯ２０１４／０９３７０１（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４８００）、ＷＯ２０１４／０１８４２３（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０５１４１８）、ＷＯ２０１４／２０４７２３（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０４１７９０）、ＷＯ２０１４／２０４７２４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０４１８００）、ＷＯ２０１４／２０４７２５（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０４１８０３）、ＷＯ２０１４／２０４７２６（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０４１８０４）、ＷＯ２０１４／２０４７２７（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０４１８０６）、ＷＯ２０１４／２０４７２８（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０４１８０８）、ＷＯ２０１４／２０４７２９（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０４１８０９）、ＷＯ２０１５／０８９３５１（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６９８９７）、ＷＯ２０１５

／０８９３５４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６９９０２）、ＷＯ２０１５／０８９３６４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６９９２５）、ＷＯ２０１５／０８９４２７（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７００６８）、ＷＯ２０１５／０８９４６２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７０１２７）、ＷＯ２０１５／０８９４１９（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７００５７）、ＷＯ２０１５／０８９４６５（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７０１３５）、ＷＯ２０１５／０８９４８６（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７０１７５）、ＷＯ２０１５／０５８０５２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６１０７７）、ＷＯ２０１５／０７００８３（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６４６６３）、ＷＯ２０１５／０８９３５４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６９９０２）、ＷＯ２０１５／０８９３５１（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６９８９７）、ＷＯ２０１５／０８９３６４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０６９９２５）、ＷＯ２０１５／０８９４２７（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７００６８）、ＷＯ２０１５／０８９４７３（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７０１５２）、ＷＯ２０１５／０８９４８６（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７０１７５）、ＷＯ２０１６／０４９２５８（ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０５１８３０）、ＷＯ２０１６／０９４８６７（ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０６５３８５）、ＷＯ２０１６／０９４８７２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０６５３９３）、ＷＯ２０１６／０９４８７４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０６５３９６）、ＷＯ２０１６／１０６２４４（ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０６７１７７）。

【０３４０】

言及は、米国出願第６２／１８０，７０９号、２０１５年６月１７日、ＰＲＯＴＥＣＴＥＤ ＧＵＩＤＥ ＲＮＡＳ（ＰＧＲＮＡＳ）、米国出願第６２／０９１，４５５号、出願、２０１４年１２月１２日、ＰＲＯＴＥＣＴＥＤ ＧＵＩＤＥ ＲＮＡＳ（ＰＧＲＮＡＳ）、米国出願第６２／０９６，７０８号、２０１４年１２月２４日、ＰＲＯＴＥＣＴＥＤ ＧＵＩＤＥ ＲＮＡＳ（ＰＧＲＮＡＳ）、米国出願第６２／０９１，４６２号、２０１４年１２月１２日、第６２／０９６，３２４号、２０１４年１２月２３日、第６２／１８０，６８１号、２０１５年６月１７日、及び第６２／２３７，４９６号、２０１５年１０月５日、ＤＥＡＤ ＧＵＩＤＥＳ ＦＯＲ ＣＲＩＳＰＲ ＴＲＡＮＳＣＲＩＰＴＩＯＮ ＦＡＣＴＯＲＳ、米国出願第６２／０９１，４５６号、２０１４年１２月１２日、及び第６２／１８０，６９２号、２０１５年６月１７日、ＥＳＣＯＲＴＥＤ ＡＮＤ ＦＵＮＣＴＩＯＮＡＬＩＺＥＤ ＧＵＩＤＥＳ ＦＯＲ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ、米国出願第６２／０９１，４６１号、２０１４年１２月１２日、ＤＥＬＩＶＥＲＹ，ＵＳＥ ＡＮＤ ＴＨＥＲＡＰＥＵＴＩＣ ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ ＯＦ ＴＨＥ ＣＲＩＳＰＲ－ＣＡＳ ＳＹＳＴＥＭＳ ＡＮＤ ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮＳ ＦＯＲ ＧＥＮＯＭＥ ＥＤＩＴＩＮＧ ＡＳ ＴＯ ＨＥＭＡＴＯＰＯＥＴＩＣ ＳＴＥＭ ＣＥＬＬＳ（ＨＳＣｓ）、米国出願第６２／０９４，９０３号、２０１４年１２月１９日、ＵＮＢＩＡＳＥＤ ＩＤＥＮＴＩＦＩＣＡＴＩＯＮ ＯＦ ＤＯＵＢＬＥ－ＳＴＲＡＮＤ ＢＲＥＡＫＳ ＡＮＤ ＧＥＮＯＭＩＣ ＲＥＡＲＲＡＮＧＥＭＥＮＴ ＢＹ ＧＥＮＯＭＥ－ＷＩＳＥ ＩＮＳＥＲＴ ＣＡＰＴＵＲＥ ＳＥＱＵＥＮＣＩＮＧ、米国出願第６２／０９６，７６１号、２０１４年１２月２４日、ＥＮＧＩＮＥＥＲＩＮＧ ＯＦ ＳＹＳＴＥＭＳ，ＭＥＴＨＯＤＳ ＡＮＤ ＯＰＴＩＭＩＺＥＤ ＥＮＺＹＭＥ ＡＮＤ ＧＵＩＤＥ ＳＣＡＦＦＯＬＤＳ ＦＯＲ ＳＥＱＵＥＮＣＥ ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＩＯＮ、米国出願第６２／０９８，０５９号、２０１４年１２月３０日、６２／１８１，６４１号、２０１５年６月１８日、及び第６２／１８１，６６７号、２０１５年６月１８日、ＲＮＡ－ＴＡＲＧＥＴＩＮＧ ＳＹＳＴＥＭ、米国出願第６２／０９６，６５６号、２０１４年１２月２４日、及び第６２／１８１，１５１号、２０１５年６月１７日、ＣＲＩＳＰＲ ＨＡＶＩＮＧ ＯＲ ＡＳＳＯＣＩＡＴＥＤ ＷＩＴＨ ＤＥＳＴＡＢＩＬＩＺＡＴＩＯＮ ＤＯＭＡＩＮＳ、米国出願第６２／０９６，６９７号、２０１４年１２月２４日、ＣＲＩＳＰＲ ＨＡＶＩＮＧ ＯＲ ＡＳＳＯＣＩＡＴＥＤ ＷＩＴＨ ＡＡＶ、米国出願第６２／０９８，１５８号、２０１４年１２月３０日、ＥＮＧＩＮＥＥＲＥＤ ＣＲＩＳＰＲ ＣＯＭＰＬＥＸ ＩＮＳＥＲＴＩＯＮＡＬ ＴＡＲＧＥＴＩＮＧ ＳＹＳＴＥＭＳ、米国出願第６２／１５１，０５２号、２０１５年４月２２日、ＣＥＬＬＵＬＡ

R TARGETING FOR EXTRACELLULAR EXOSOMAL REPORTING、米国出願第６２／０５４，４９０号、２４－Ｓｅｐ－１４，DELIVERY，USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR－CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING DISORDERS AND DISEASES USING PARTICLE DELIVERY COMPONENTS、米国出願第６１／９３９，１５４号、２０１４年2月１２日、SYSTEMS，METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR－CAS SYSTEMS、米国出願第６２／０５５，４８４号、２０１４年9月２５日、SYSTEMS，METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR－CAS SYSTEMS、米国出願第６２／０８７，５３７号、２０１４年１２月4日、SYSTEMS，METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR－CAS SYSTEMS、米国出願第６２／０５４，６５１号、２４－Ｓｅｐ－１４，DELIVERY，USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR－CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR MODELING COMPETITION OF MULTIPLE CANCER MUTATIONS IN VIVO、米国出願第６２／０６７，８８６号、２０１４年１０月２３日、DELIVERY，USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR－CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR MODELING COMPETITION OF MULTIPLE CANCER MUTATIONS IN VIVO、米国出願第６２／０５４，６７５号、２０１４年9月２４日及び第６２／１８１，００２号、２０１５年6月１７日、DELIVERY，USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR－CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS IN NEURONAL CELLS／TISSUES、米国出願第６２／０５４，５２８号、２０１４年9月２４日、DELIVERY，USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR－CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS IN IMMUNE DISEASES OR DISORDERS、米国出願第６２／０５５，４５４号、２０１４年9月２５日、DELIVERY，USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR－CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING DISORDERS AND DISEASES USING CELL PENETRATION PEPTIDES（ＣＰＰ）、米国出願第６２／０５５，４６０号、２０１４年9月２５日、MULTIFUNCTIONAL－CRISPR COMPLEXES AND／OR OPTIMIZED ENZYME LINKED FUNCTIONAL－CRISPR COMPLEXES、米国出願第６２／０８７，４７５号、２０１４年１２月4日及び第６２／１８１，６９０号、２０１５年6月１８日、FUNCTIONAL SCREENING WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR－CAS SYSTEMS、米国出願第６２／０５５，４８７号、２０１４年9月２５日、FUNCTIONAL SCREENING WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR－CAS SYSTEMS、米国出願第６２／０８７，５４６号、２０１４年１２月4日及び第６２／１８１，６８７号、２０１５年6月１８日、MULTIFUNCTIONAL CRISPR COMPLEXES AND／OR OPTIMIZED ENZYME LINKED FUNCTIONAL－CRISPR COMPLEXES、及び米国出願第６２／０９８，２８５号、２０１４年１２月３０日、CRISPR MEDIATED

ＩＮ ＶＩＶＯ ＭＯＤＥＬＩＮＧ ＡＮＤ ＧＥＮＥＴＩＣ ＳＣＲＥＥＮＩＮＧ ＯＦ ＴＵＭＯＲ ＧＲＯＷＴＨ ＡＮＤ ＭＥＴＡＳＴＡＳＩＳについてもなされる。

【０３４１】

言及は、米国出願第６２／１８１，６５９号、２０１５年６月１８日及び第６２／２０７，３１８号、２０１５年８月１９日、ＥＮＧＩＮＥＥＲＩＮＧ ＡＮＤ ＯＰＴＩＭＩＺＡＴＩＯＮ ＯＦ ＳＹＳＴＥＭＳ，ＭＥＴＨＯＤＳ，ＥＮＺＹＭＥ ＡＮＤ ＧＵＩＤＥ ＳＣＡＦＦＯＬＤＳ ＯＦ ＣＡＳ９ ＯＲＴＨＯＬＯＧＳ ＡＮＤ ＶＡＲＩＡＮＴＳ ＦＯＲ ＳＥＱＵＥＮＣＥ ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＩＯＮについてなされる。言及は、米国出願第６２／１８１，６６３号、２０１５年６月１８日及び第６２／２４５，２６４号、２０１５年１０月２２日、ＮＯＶＥＬ ＣＲＩＳＰＲ ＥＮＺＹＭＥＳ ＡＮＤ ＳＹＳＴＥＭＳ、米国出願第６２／１８１，６７５号、２０１５年６月１８日、第６２／２８５，３４９号、２０１５年１０月２２日、第６２／２９６，５２２号、１７－Ｆｅｂ－２０１６、及び第６２／３２０，２３１号、２０１６年８月８日、ＮＯＶＥＬ ＣＲＩＳＰＲ ＥＮＺＹＭＥＳ ＡＮＤ ＳＹＳＴＥＭＳ、各々がＮＯＶＥＬ ＣＲＩＳＰＲ ＥＮＺＹＭＥＳ ＡＮＤ ＳＹＳＴＥＭＳと題される米国出願第６２／２３２，０６７号、２０１５年９月２４日、米国出願第１４／９７５，０８５号、２０１５年１２月１８日、欧州出願第１６１５０４２８．７号、米国出願第６２／２０５，７３３号、２０１５年８月１６日、米国出願第６２／２０１，５４２号、２０１５年８月５日、米国出願第６２／１９３，５０７号、２０１５年７月１６日、及び米国出願第６２／１８１，７３９号、２０１５年６月１８日、ならびに米国出願第６２／２４５，２７０号、２０１５年１０月２２日、ＮＯＶＥＬ ＣＲＩＳＰＲ ＥＮＺＹＭＥＳ ＡＮＤ ＳＹＳＴＥＭＳについてなされる。言及は、各々がＥＮＧＩＮＥＥＲＩＮＧ ＯＦ ＳＹＳＴＥＭＳ，ＭＥＴＨＯＤＳ ＡＮＤ ＯＰＴＩＭＩＺＥＤ ＧＵＩＤＥ ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮＳ ＷＩＴＨ ＮＥＷ ＡＲＣＨＩＴＥＣＴＵＲＥＳ ＦＯＲ ＳＥＱＵＥＮＣＥ ＭＡＮＩＰＵＬＡＴＩＯＮと題される米国出願第６１／９３９，２５６号、２０１４年２月１２日、及びＷＯ ２０１５／０８９４７３（ＰＣＴ／ＵＳ２０１４／０７０１５２）、２０１４年１２月１２日、についてもなされる。言及は、各々がＧＥＮＯＭＥ ＥＤＩＴＩＮＧ ＵＳＩＮＧ ＣＡＳ９ ＮＩＣＫＡＳＥＳと題されるＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０４５５０４、２０１５年８月１５日、米国出願第６２／１８０，６９９号、２０１５年６月１７日、及び米国出願第６２／０３８，３５８号、２０１４年８月１７日についてもなされる。

【０３４２】

これらの特許、特許公開、及び出願、ならびにその中で引用される、またはそれらの遂行中に引用される全ての文書（「出願引用文献（ａｐｐｌｎ ｃｉｔｅｄ ｄｏｃｕｍｅｎｔｓ）」）、ならびに出願引用文献に参照または引用される全ての文書は、その中でまたはその中の任意の文書で言及され、参照により本明細書に組み込まれる任意の製品についての指示書、説明書、製品仕様書、及び製品シートと共に、ここに参照により本明細書に組み込まれ、本発明の実施において採用され得る。全ての文書（これらの特許、特許公開、及び出願及び出願引用文献）は、個々の文書が特異的かつ個別に参照により組み込まれるのと同じ程度、参照により本明細書に組み込まれる。

【０３４３】

Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質

本出願は、Ｖ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質を使用する方法を説明する。これは、それによって多数のオーソログまたはホモログが特定されているＣａｓ１３で本明細書に例示される。さらなるオーソログまたはホモログが特定され得ることと、本明細書に記載の官能基のいずれかが、複数のオーソログからの断片を含むキメラ酵素を含む他のオーソログに操作され得ることとは、当業者に明らかであろう。

【０３４４】

新規なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位を特定する計算方法は、ＥＰ３００９５１１またはＵＳ２０１６０８２４３に記載されており、以下、Ｃａｓ１タンパク質をコードする全てのコンティグを検出するステップと、ｃａｓ１遺伝子の２０ｋＢ以内の全ての予測されるタ

ンパク質コード遺伝子を特定するステップと、特定された遺伝子をＣａｓタンパク質特異的プロファイルと比較し、ＣＲＩＳＰＲアレイを予測するステップと、５００アミノ酸より大きい（＞５００ａａ）タンパク質を含有する分類されていない候補ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位を選択するステップと、ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ及びＨＨＰｒｅｄのような方法を使用して選択された候補を分析して、既知のタンパク質ドメインをスクリーンするステップと、それによって新規のクラス２　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位を識別するステップと（Ｓｃｈｍａｋｏｖ　ｅｔ　ａｌ．２０１５，Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ．６０（３）：３８５－９７を参照されたい）を含むことができる。上記のステップに加えて、候補の追加的な分析は、追加的なホモログについてメタゲノミクスデータベースを検索することによって行われ得る。追加的にまたは代替的に、検索を非自律ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムに拡張するために、同じ手順がシードとして使用されるＣＲＩＳＰＲアレイで実行され得る。

【０３４５】

一態様では、Ｃａｓ１タンパク質をコードする全てのコンティグの検出は、“ＧｅｎｅＭａｒｋＳ：ａ　ｓｅｌｆ－ｔｒａｉｎｉｎｇ　ｍｅｔｈｏｄ　ｆｏｒ　ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｇｅｎｅ　ｓｔａｒｔｓ　ｉｎ　ｍｉｃｒｏｂｉａｌ　ｇｅｎｏｍｅｓ．Ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｆｏｒ　ｆｉｎｄｉｎｇ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｍｏｔｉｆｓ　ｉｎ　ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ　ｒｅｇｉｏｎｓ．”Ｊｏｈｎ　Ｂｅｓｅｍｅｒ，Ａｌｅｘａｎｄｒｅ　Ｌｏｍｓａｄｚｅ　ａｎｄ　Ｍａｒｋ　Ｂｏｒｏｄｏｖｓｋｙ，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ（２００１）２９，ｐｐ２６０７－２６１８においてさらに説明される遺伝子予測プログラムであるＧｅｎｅｍａｒｋＳによって実行され、参照により本明細書に組み込まれる。

【０３４６】

一態様では、全ての予測されるタンパク質コード遺伝子を特定することは、特定された遺伝子をＣａｓタンパク質特異的プロファイルと比較することと、古代ドメイン及び完全長タンパク質のための十分にアノテートされた複数の配列アラインメントモデルの集合からなるタンパク質アノテーションリソースであるＮＣＢＩ保存ドメインデータベース（ＣＤＤ）に従ってアノテートすることと、によって行われる。これらは、ＲＰＳ－ＢＬＡＳＴを介したタンパク質配列における保存ドメインについての位置特異的スコアマトリックス（ＰＳＳＭ）として利用可能である。ＣＤＤコンテンツは、多数の外部ソースデータベース（Ｐｆａｍ、ＳＭＡＲＴ、ＣＯＧ、ＰＲＫ、ＴＩＧＲＦＡＭ）からインポートされたドメインモデルと同様に、ドメイン境界を明示的に定義し、配列／構造／機能関係への洞察を提供するための３Ｄ構造情報を使用するＮＣＢＩ精選ドメインを含む。さらなる態様では、ＣＲＩＳＰＲアレイは、参照により本明細書に組み込まれる、“ＰＩＬＥＲ－ＣＲ：ｆａｓｔ　ａｎｄ　ａｃｃｕｒａｔｅ　ｉｄｅｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　ＣＲＩＳＰＲ　ｒｅｐｅａｔｓ”，Ｅｄｇａｒ，Ｒ．Ｃ．，ＢＭＣ　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ，Ｊａｎ　２０；８：１８（２００７）に記載されるＣＲＩＳＰＲ反復を発見するためのパブリックドメインソフトウェアであるＰＩＬＥＲ－ＣＲプログラムを使用して予測された。

【０３４７】

さらなる態様では、慎重な（ｃａｓｅ　ｂｙ　ｃａｓｅ）分析は、ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ（Ｐｏｓｉｔｉｏｎ－Ｓｐｅｃｉｆｉｃ　Ｉｔｅｒａｔｉｖｅ　Ｂａｓｉｃ　Ｌｏｃａｌ　Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ　Ｓｅａｒｃｈ　Ｔｏｏｌ）を使用して実行される。ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴは、タンパク質－タンパク質ＢＬＡＳＴを使用して所与のスコア閾値を超えて検出された配列の複数の配列アラインメントから位置特異的スコアマトリックス（ＰＳＳＭ）またはプロファイルを導き出す。このＰＳＳＭは、新しいマッチについてデータベースをさらに検索するために使用され、これらの新たに検出された配列と共にその後の反復のために更新される。したがって、ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴは、タンパク質間の遠隔関係を検出する手段を提供する。

【０３４８】

別の態様では、慎重な分析は、ＢＬＡＳＴまたはＰＳＩ－ＢＬＡＳＴのように使用する

のが容易であり、同時に遠隔のホモログを発見する際にはるかに感度が高い配列データベース検索及び構造予測のための方法であるＨＨｐｒｅｄを使用して実行される。実際、ＨＨｐｒｅｄの感度は、現在利用可能な構造予測について最も強力なサーバーと競合的である。ＨＨｐｒｅｄは、プロファイル隠れＭａｒｋｏｖモデル（ＨＭＭ）のペアワイズ比較に基づく最初のサーバーである。ほとんどの従来の配列検索方法はＵｎｉＰｒｏｔまたはＮＲのような配列データベースを検索するのに対し、ＨＨｐｒｅｄはＰｆａｍやＳＭＡＲＴなどのアラインメントデータベースを検索する。これは、単一の配列の散乱の代わりに多数の配列ファミリーへのヒットのリストを大幅に単純化する。全ての公的に利用可能なプロファイル及びアラインメントデータベースは、ＨＨｐｒｅｄを通じて利用可能である。ＨＨｐｒｅｄは、単一のクエリ配列または複数のアラインメントを入力として受け入れる。わずか数分以内に、ＨＨｐｒｅｄは、ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴのものと同様の読みやすい形式で検索結果を返す。検索オプションは、ローカルまたはグローバルアラインメント及び二次構造類似性のスコア付けを含む。ＨＨｐｒｅｄは、ＨＨｐｒｅｄアラインメントからＭＯＤＥＬＬＥＲソフトウェアによって計算される３Ｄ構造モデルと同様に、ペアワイズクエリ－テンプレート配列アラインメント、マージされたクエリ－テンプレート複数アラインメント（例えば、トランジティブ検索用）を作成することができる。

【０３４９】

Ｃａｓ１３のオーソログ

用語「オーソログ（ｏｒｔｈｏｌｏｇｕｅ）」（本明細書では「オーソログ（ｏｒｔｈｏｌｏｇ）」とも称される）及び「ホモログ（ｈｏｍｏｌｏｇｕｅ）」（本明細書では「ホモログ（ｈｏｍｏｌｏｇ）」とも称される）は、当該技術分野において周知である。さらなるガイダンスの手段によって、本明細書で使用されるタンパク質の「ホモログ」は、それがホモログであるタンパク質と同じまたは同様の機能を果たす同じ種のタンパク質である。相同タンパク質は、構造的に関連してもよいが構造的に関連する必要はないか、または部分的に構造的に関連しているにすぎない。本明細書で使用されるタンパク質の「オーソログ」は、それがオーソログであるタンパク質と同じまたは同様の機能を果たす異なる種のタンパク質である。オルソロガスなタンパク質は、構造的に関連することができるが関連する必要はないか、または部分的に構造的に関連するにすぎない。ホモログ及びオーソログは、相同性モデリング（例えば、Ｇｒｅｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ｖｏｌ．２２８（１９８５）１０５５、及びＢｌｕｎｄｅｌｌ ｅｔ ａｌ．Ｅｕｒ Ｊ Ｂｉｏｃｈｅｍ ｖｏｌ １７２（１９８８），５１３を参照されたい）または「構造的ＢＬＡＳＴ」（Ｄｅｙ Ｆ，Ｃｌｉｆｆ Ｚｈａｎｇ Ｑ，Ｐｅｔｒｅｙ Ｄ，Ｈｏｎｉｇ Ｂ．Ｔｏｗａｒｄ ａ”ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ＢＬＡＳＴ”：ｕｓｉｎｇ ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ ｒｅｌａｔｉｏｎｓｈｉｐｓ ｔｏ ｉｎｆｅｒ ｆｕｎｃｔｉｏｎ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ．２０１３ Ａｐｒ；２２（４）：３５９－６６．ｄｏｉ：１０．１００２／ｐｒｏ．２２２５）によって特定され得る。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ座位の分野における用途について、Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．（２０１５）も参照されたい。相同タンパク質は、構造的に関連することができるが関連する必要はないか、または部分的に構造的に関連するにすぎない。

【０３５０】

Ｃａｓ１３遺伝子は、典型的にはｃａｓ１、ｃａｓ２、及びｃａｓ４遺伝子ならびにＣＲＩＳＰＲカセットと同じ座位におけるいくつかの多様な細菌ゲノム（例えば、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｃｆ．ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｆｘ１のＦＮＦＸ１＿１４３１－ＦＮＦＸ１＿１４２８）において発見される。したがって、この推定の新規ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムのレイアウトは、ＩＩ－Ｂ型のものと同様であるようである。さらに、Ｃａｓ９と同様に、Ｃａｓ１３タンパク質は、トランスポゾンＯＲＦ－Ｂと相同である容易に特定可能なＣ末端領域を含有し、活性ＲｕｖＣ様ヌクレアーゼ、アルギニンリッチな領域、及びＺｎフィンガー（Ｃａｓ９に存在しない）を含む。しかしながら、Ｃａｓ９とは異なり、Ｃａｓ１３はＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓを伴わないいくつかのゲノムの文脈においても存在し、ＯＲＦ－Ｂとのその比較的高い類似性はそれがトランスポゾン成分であり得ることを示

唆する。これが本物のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムであり、Ｃａｓ１３がＣａｓ９の機能的類似体である場合、それが新規のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ型、すなわちＶ型であることが示唆された（Ａｎｎｏｔａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ Ｓｙｓｔｅｍｓ．Ｍａｋａｒｏｖａ ＫＳ，Ｋｏｏｎｉｎ ＥＶ．Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．２０１５；１３１１：４７－７５を参照されたい）。しかしながら、本明細書に記載されるように、Ｃａｓ１３は、同一のドメイン構造を有さないＣ２ｃ１ｐから区別するためにサブタイプＶ－Ａにあると表示され、したがって、サブタイプＶ－Ｂにあると表示される。

【０３５１】

本発明は、サブタイプＶ－Ａとして示されるＣａｓ１３座位に由来するＣａｓ１３エフェクタータンパク質の使用を包含する。本明細書ではかかるエフェクタータンパク質は、「Ｃａｓ１３ｐ」、例えばＣａｓ１３タンパク質とも称される（そしてかかるエフェクタータンパク質またはＣａｓ１３タンパク質またはＣａｓ１３座位に由来するタンパク質は、「ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質」とも呼ばれる）。

【０３５２】

特定の実施形態では、エフェクタータンパク質は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ、Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ、Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ、Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ、Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ、Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ、Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｒｉｄｉｕｍ、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ、Ａｌｉｃｙｃｌｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｍｅｔｈａｎｏｍｅｔｈｙｏｐｈｉｌｕｓ、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｔｅｓ、Ｈｅｌｃｏｃｏｃｃｕｓ、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ、Ｄｅｓｕｌｆｏｖｉｂｒｉｏ、Ｄｅｓｕｌｆｏｎａｔｒｏｎｕｍ、Ｏｐｉｔｕｔａｃｅａｅ、Ｔｕｂｅｒｉｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｂｒｅｖｉｂａｃｉｌｕｓ、Ｍｅｔｈｙｌｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｂｕｔｙｖｉｂｒｉｏ、Ｐｅｒｉｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐａｒｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ、Ｔｈｉｏｍｉｃｒｏｓｐｉｒａまたは Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓを含む属からの生物からのＣａｓ１３エフェクタータンパク質である。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３エフェクタータンパク質は、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ、Ｍｅｔｈａｎｏｍｅｔｈｙｏｐｈｉｌｕｓ、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ、Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ、Ｂｕｔｙｖｉｂｒｉｏ、Ｐｅｒｉｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐａｒｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ、ＴｈｉｏｍｉｃｒｏｓｐｉｒａまたはＡｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓから選択される属からの生物から選択される。

【０３５３】

特定の実施形態では、Ｃａｓ１３エフェクタータンパク質は、Ｓ．ｍｕｔａｎｓ、Ｓ．ａｇａｌａｃｔｉａｅ、Ｓ．ｅｑｕｉｓｉｍｉｌｉｓ、Ｓ．ｓａｎｇｕｉｎｉｓ、Ｓ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａ、Ｃ．ｊｅｊｕｎｉ、Ｃ．ｃｏｌｉ、Ｎ．ｓａｌｓｕｇｉｎｉｓ、Ｎ．ｔｅｒｇａｒｃｕｓ、Ｓ．ａｕｒｉｃｕｌａｒｉｓ、Ｓ．ｃａｒｎｏｓｕｓ、Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｅｓ、Ｎ．ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ、Ｌ．ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ、Ｌ．ｉｖａｎｏｖｉｉ、Ｃ．ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ、Ｃ．ｔｅｔａｎｉ、Ｃ．ｓｏｒｄｅｌｌｉｉ、Ｌ ｉｎａｄａｉ、Ｆ．ｔｕｌａｒｅｎｓｉｓ １、Ｐ．ａｌｂｅｎｓｉｓ、Ｌ．ｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｂ．ｐｒｏｔｅｏｃｌａｓｔｉｃｕｓ、Ｐ．ｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐ．ｃｒｅｖｉｏｒｉｃａｎｉｓ、Ｐ．ｄｉｓｉｅｎｓ及びＰ．ｍａｃａｃａｅから選択される生物からのものである。

【０３５４】

エフェクタータンパク質は、第１のエフェクタータンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）オーソログ及び第２のエフェクター（例えば、Ｃａｓ１３）タンパク質オーソログからの第２の断片を含むキメラエフェクタータンパク質を含むことができ、第１及び第２のエフェクタータンパク質オーソログは異なる。第１及び第２のエフェクタータンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）オーソログのうちの少なくとも１つは、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ、Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ、Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ、Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ、Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ、Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ、Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｒｉｄｉｕｍ、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ、Ａｌｉｃｙｃｌｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｍｅｔｈａｎｏｍｅｔｈｙｏｐｈｉｌｕｓ、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｔｅｓ、Ｈｅｌｃｏｃｏｃｃｕｓ、Ｌｅｔｏｓｐｉｒａ、Ｄｅｓｕｌｆｏｖｉｂｒｉｏ、Ｄｅｓｕｌｆｏｎａｔｒｏｎｕｍ、Ｏｐｉｔｕｔａｃｅａｅ、Ｔｕｂｅｒｉｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｂｒｅｖｉｂａｃｉｌｕｓ、Ｍｅｔｈｙｌｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｂｕｔｙｖｉｂｒｉｏ、Ｐｅｒｉｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐａｒｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ、Ｔｈｉｏｍｉｃｒｏｓｐｉｒａまたは*Acidaminococcus*を含む生物からのエフェクタータンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）と、例えば、第１及び第２の断片の各々がＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ、Ｎｉｔｒａｔｉｆｒａｃｔｏｒ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ、Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ、Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ、Ｇｌｕｃｏｎａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ、Ａｚｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ、Ｓｐｈａｅｒｏｃｈａｅｔａ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒ、Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ、Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｒｉｄｉｕｍ、Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ、Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ、Ａｌｉｃｙｃｌｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｍｅｔｈａｎｏｍｅｔｈｙｏｐｈｉｌｕｓ、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｔｅｓ、Ｈｅｌｃｏｃｏｃｃｕｓ、Ｌｅｔｏｓｐｉｒａ、Ｄｅｓｕｌｆｏｖｉｂｒｉｏ、Ｄｅｓｕｌｆｏｎａｔｒｏｎｕｍ、Ｏｐｉｔｕｔａｃｅａｅ、Ｔｕｂｅｒｉｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｂｒｅｖｉｂａｃｉｌｕｓ、Ｍｅｔｈｙｌｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｂｕｔｙｖｉｂｒｉｏ、Ｐｅｒｉｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐａｒｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ、Ｔｈｉｏｍｉｃｒｏｓｐｉｒａまたは*Acidaminococcus*を含む生物のＣａｓ１３から選択される第１の断片及び第２の断片を含むキメラエフェクタータンパク質であって、第１及び第２の断片が同じ細菌からのものでない、キメラエフェクタータンパク質と、例えば、第１及び第２の断片の各々が*S. mutans*、*S. agalactiae*、*S. equisimilis*、*S. sanguinis*、*S. pneumonia*、*C. jejuni*、*C. coli*、*N. salsuginis*、*N. tergarcus*、*S. auricularis*、*S. carnosus*、*N. meningitides*、*N. gonorrhoeae*、*L. monocytogenes*、*L. ivanovii*、*C. botulinum*、*C. difficile*、*C. tetani*、*C. sordellii*、*Francisella tularensis* 1、*Prevotella albensis*、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ細菌ＭＣ２０１７ １、*Butyrivibrio proteoclasticus*、Ｐｅｒｅｇｒｉｎｉｂａｃｔｅｒｉａ細菌ＧＷ２０１１＿ＧＷＡ２＿３３＿１０、Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ細菌ＧＷ２０１１＿ＧＷＣ２＿４４＿１７、*Smithella* sp. ＳＣＡＤＣ、*Acidaminococcus* sp. ＢＶ３Ｌ６、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ細菌ＭＡ２０２０、*Candidatus Methanopla*

sma termitum、Eubacterium eligens、Moraxella bovoculi 237、Leptospira inadai、Lachnospiraceae細菌ND2006、Porphyromonas crevioricanis 3、Prevotella disiens及びPorphyromonas macacaeのCas13から選択される第1の断片及び第2の断片を含むキメラエフェクタータンパク質であって、第1及び第2の断片が同じ細菌からのものでない、キメラエフェクタータンパク質と、を含むことができる。

【0355】

より好ましい実施形態では、Cas13pは、Francisella tularensis 1、Prevotella albensis、Lachnospiraceae細菌MC2017 1、Butyrivibrio proteoclasticus、Peregrinibacteria細菌GW2011_GWA2_33_10、Parcubacteria細菌GW2011_GWC2_44_17、Smithella sp. SCADC、Acidaminococcus sp. BV3L6、Lachnospiraceae細菌MA2020、Candidatus Methanoplasma termitum、Eubacterium eligens、Moraxella bovoculi 237、Moraxella bovoculi AAX08_00205、Moraxella bovoculi AAX11_00205、Butyrivibrio sp. NC3005、Thiomicrospira sp. XS5、Leptospira inadai、Lachnospiraceae細菌ND2006、Porphyromonas crevioricanis 3、Prevotella disiens及びPorphyromonas macacaeから選択される細菌種に由来する。ある特定の実施形態では、Cas13pは、Acidaminococcus sp. BV3L6、Lachnospiraceae細菌MA2020から選択される細菌種に由来する。ある特定の実施形態では、エフェクタータンパク質は、Francisella tularensis subsp. Novicida.を含むがこれらに限定されないFrancisella tularensis 1の亜種に由来する。ある特定の実施形態では、Cas13pは、Acidaminococcus sp. BV3L6、Lachnospiraceae細菌ND2006、Lachnospiraceae細菌MA2020、Moraxella bovoculi AAX08_00205、Moraxella bovoculi AAX11_00205、Butyrivibrio sp. NC3005、またはThiomicrospira sp. XS5から選択される細菌種に由来する。

【0356】

特定の実施形態では、本明細書で参照されるCas13のホモログまたはオーソログは、本明細書に開示される例示的なCas13タンパク質と例えば少なくとも95%のような、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%の配列相同性または同一性を有する。さらなる実施形態では、本明細書で参照されるCas13のホモログまたはオーソログは、野生型Cas13と例えば少なくとも95%のような、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有する。Cas13が1つ以上の変異（変異された）を有する場合、本明細書で参照される該Cas13のホモログまたはオーソログは、変異されたCas13と例えば少なくとも95%のような、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有する。

【0357】

実施形態では、Cas13タンパク質は、Acidaminococcus sp、Lachnospiraceae細菌、またはMoraxella bovoculiを含むがこれらに限定されない属の生物のオーソログであり得、特定の実施形態では、V型Casタンパク質は、Acidaminococcus sp. BV3L6、Lachno

ｓｐｉｒａｃｅａｅ細菌ＮＤ２００６（ＬｂＣａｓ１３）またはＭｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７を含むがこれらに限定されない種の生物のオーソログであり得る。特定の実施形態では、本明細書で参照されるＣａｓ１３のホモログまたはオーソログは、本明細書に開示されるＣａｓ１３配列のうちの１つ以上と例えば少なくとも９５％のような、少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、さらにより好ましくは少なくとも９０％の配列相同性または同一性を有する。さらなる実施形態では、本明細書で参照されるＣａｓ１３のホモログまたはオーソログは、野生型ＦｎＣａｓ１３、ＡｓＣａｓ１３、またはＬｂＣａｓ１３と例えば少なくとも９５％のような、少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、さらにより好ましくは少なくとも９０％の配列同一性を有する。

【０３５８】

特定の実施形態では、本発明のＣａｓ１３タンパク質は、ＦｎＣａｓ１３、ＡｓＣａｓ１３、またはＬｂＣａｓ１３と少なくとも８０％のような、少なくとも６０％、より具体的には少なくとも７０、例えば少なくとも９５％のような、より好ましくは少なくとも８５％、さらにより好ましくは少なくとも９０％の配列相同性または同一性を有する。さらなる実施形態では、本明細書で参照されるＣａｓ１３タンパク質は、野生型ＡｓＣａｓ１３またはＬｂＣａｓ１３と例えば少なくとも９５％のような、少なくとも６０％、少なくとも７０％、より具体的には少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、さらにより好ましくは少なくとも９０％の配列同一性を有する。特定の実施形態では、本発明のＣａｓ１３タンパク質は、ＦｎＣａｓ１３と６０％未満の配列同一性を有する。当業者は、このことがＣａｓ１３タンパク質の切断された形態を含み、それによって配列同一性が切断された形態の長さにわたって決定されることを理解するであろう。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、ＦｎＣａｓ１３ではない。

【０３５９】

修飾されたＣａｓ１３酵素

特定の実施形態では、Ｃａｓ１３のような本明細書に定義される操作されたＣａｓ１３タンパク質を利用することは興味深く、タンパク質はＲＮＡを含む核酸分子と複合体を形成してＣＲＩＳＰＲ複合体を形成し、ＣＲＩＳＰＲ複合体において、核酸分子が１つ以上の標的ポリヌクレオチド座位を標的化する際、タンパク質は修飾されていないＣａｓ１３タンパク質と比較して少なくとも１つの修飾を含み、修飾されたタンパク質を含むＣＲＩＳＰＲ複合体は、修飾されていないＣａｓ１３タンパク質を含む複合体と比較して改変された活性を有する。本明細書でＣＲＩＳＰＲ「タンパク質」を参照する際、Ｃａｓ１３タンパク質が好ましくは修飾されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質であることが理解されるであろう（例えば、Ｃａｓ１３を含むが限定しないような、増加したもしくは減少した酵素活性を有する（または有しない）。用語「ＣＲＩＳＰＲタンパク質」は、野生型ＣＲＩＳＰＲタンパク質と比較して、ＣＲＩＳＰＲタンパク質が増加したまたは減少した（またはない）ような酵素活性を有するかどうかに関わらず、「ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質」と互換的に使用され得る。

【０３６０】

Ｃａｓ１３ヌクレアーゼの一次構造の計算分析は、３つの異なる領域を明らかにする。第１に唯一の機能的特徴付けられたドメインである、Ｃ末端ＲｕｖＣ様ドメイン。第２にＮ末端アルファ螺旋領域、及びＲｕｖＣ様ドメインとアルファ螺旋領域との間に位置する渇望混合されたアルファ及びベータ領域。

【０３６１】

非構造領域のいくつかの小構造は、Ｃａｓ１３一次構造内に予測される。溶媒に曝露され、異なるＣａｓ１３オーソログ内で保存されない非構造領域は、小さなタンパク質配列の分割及び挿入のための好ましい側である。加えて、これらの側面は、Ｃａｓ１３オーソログ間でキメラタンパク質を生成するために使用され得る。

【０３６２】

上記の情報に基づいて、変異体は、酵素の不活性化を引き起こす、または二本鎖ヌクレ

アーゼをニッカーゼ活性に修飾する生成され得る。代替的な実施形態では、この情報は、低減したオフターゲット効果を有する酵素を開発するために使用され得る（本明細書の他の箇所に記載される）。

【０３６３】

上記に記載のＣａｓ１３酵素のいくつかでは、酵素は、位置Ｒ９０９、Ｒ９１２、Ｒ９３０、Ｒ９４７、Ｋ９４９、Ｒ９５１、Ｒ９５５、Ｋ９６５、Ｋ９６８、Ｋ１０００、Ｋ１００２、Ｒ１００３、Ｋ１００９、Ｋ１０１７、Ｋ１０２２、Ｋ１０２９、Ｋ１０３５、Ｋ１０５４、Ｋ１０７２、Ｋ１０８６、Ｒ１０９４、Ｋ１０９５、Ｋ１１０９、Ｋ１１１８、Ｋ１１４２、Ｋ１１５０、Ｋ１１５８、Ｋ１１５９、Ｒ１２２０、Ｒ１２２６、Ｒ１２４２、及び／またはＲ１２５２を含むがこれらに限定されない、１つ以上の残基（ＲｕｖＣドメインにおける）の変異によって修飾され、ＡｓＣａｓ１３（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６）のアミノ酸位置番号付けに関する。ある特定の実施形態では、該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は、修飾された、より好ましくは標的に対する増加した特異性を有する。

【０３６４】

上記に記載の非天然型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質のいくつかでは、酵素は、位置Ｋ３２４、Ｋ３３５、Ｋ３３７、Ｒ３３１、Ｋ３６９、Ｋ３７０、Ｒ３８６、Ｒ３９２、Ｒ３９３、Ｋ４００、Ｋ４０４、Ｋ４０６、Ｋ４０８、Ｋ４１４、Ｋ４２９、Ｋ４３６、Ｋ４３８、Ｋ４５９、Ｋ４６０、Ｋ４６４、Ｒ６７０、Ｋ６７５、Ｒ６８１、Ｋ６８６、Ｋ６８９、Ｒ６９９、Ｋ７０５、Ｒ７２５、Ｋ７２９、Ｋ７３９、Ｋ７４８、及び／またはＫ７５２を含むがこれらに限定されない、１つ以上の残基（ＲＡＤ５０における）の変異によって修飾され、ＡｓＣａｓ１３（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６）のアミノ酸位置番号付けに関する。ある特定の実施形態では、該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は、修飾された、より好ましくは標的に対する増加した特異性を有する。

【０３６５】

Ｃａｓ１３酵素のいくつかでは、酵素は、位置Ｒ９１２、Ｔ９２３、Ｒ９４７、Ｋ９４９、Ｒ９５１、Ｒ９５５、Ｋ９６５、Ｋ９６８、Ｋ１０００、Ｒ１００３、Ｋ１００９、Ｋ１０１７、Ｋ１０２２、Ｋ１０２９、Ｋ１０７２、Ｋ１０８６、Ｆ１１０３、Ｒ１２２６、及び／またはＲ１２５２を含むがこれらに限定されない、１つ以上の残基の変異によって修飾され、ＡｓＣａｓ１３（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６）のアミノ酸位置番号付けに関する。ある特定の実施形態では、該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は、修飾された、より好ましくは標的に対する増加した特異性を有する。

【０３６６】

ある特定の実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、位置Ｒ８３３、Ｒ８３６、Ｋ８４７、Ｋ８７９、Ｋ８８１、Ｒ８８３、Ｒ８８７、Ｋ８９７、Ｋ９００、Ｋ９３２、Ｒ９３５、Ｋ９４０、Ｋ９４８、Ｋ９５３、Ｋ９６０、Ｋ９８４、Ｋ１００３、Ｋ１０１７、Ｒ１０３３、Ｒ１１３８、Ｒ１１６５、及び／またはＲ１２５２を含むがこれらに限定されない、１つ以上の残基の変異によって修飾され、ＬｂＣａｓ１３（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＮＤ２００６）のアミノ酸位置番号付けに関する。ある特定の実施形態では、該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は、修飾された、より好ましくは標的に対する増加した特異性を有する。

【０３６７】

ある特定の実施形態では、Ｃａｓ１３酵素は、位置Ｋ１５、Ｒ１８、Ｋ２６、Ｑ３４、Ｒ４３、Ｋ４８、Ｋ５１、Ｒ５６、Ｒ８４、Ｋ８５、Ｋ８７、Ｎ９３、Ｒ１０３、Ｎ１０４、Ｔ１１８、Ｋ１２３、Ｋ１３４、Ｒ１７６、Ｋ１７７、Ｒ１９２、Ｋ２００、Ｋ２２６、Ｋ２７３、Ｋ２７５、Ｔ２９１、Ｒ３０１、Ｋ３０７、Ｋ３６９、Ｓ４０４、Ｖ４０９、Ｋ４１４、Ｋ４３６、Ｋ４３８、Ｋ４６８、Ｄ４８２、Ｋ５１６、Ｒ５１８、Ｋ５２４、Ｋ５３０、Ｋ５３２、Ｋ５４８、Ｋ５５９、Ｋ５７０、Ｒ５７４、Ｋ５９２、Ｄ５９６、Ｋ６０３、Ｋ６０７、Ｋ６１３、Ｃ６４７、Ｒ６８１、Ｋ６８６、Ｈ７２０、Ｋ７３

９、Ｋ７４８、Ｋ７５７、Ｔ７６６、Ｋ７８０、Ｒ７９０、Ｐ７９１、Ｋ７９６、Ｋ８０９、Ｋ８１５、Ｔ８１６、Ｋ８６０、Ｒ８６２、Ｒ８６３、Ｋ８６８、Ｋ８９７、Ｒ９０９、Ｒ９１２、Ｔ９２３、Ｒ９４７、Ｋ９４９、Ｒ９５１、Ｒ９５５、Ｋ９６５、Ｋ９６８、Ｋ１０００、Ｒ１００３、Ｋ１００９、Ｋ１０１７、Ｋ１０２２、Ｋ１０２９、Ａ１０５３、Ｋ１０７２、Ｋ１０８６、Ｆ１１０３、Ｓ１２０９、Ｒ１２２６、Ｒ１２５２、Ｋ１２７３、Ｋ１２８２、及び／またはＫ１２８８を含むがこれらに限定されない、１つ以上の残基の変異によって修飾され、ＡｓＣａｓ１３（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６）のアミノ酸位置番号付けに関する。ある特定の実施形態では、該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は、修飾された、より好ましくは標的に対する増加した特異性を有する。

【０３６８】

ある特定の実施形態では、酵素は、位置Ｋ１５、Ｒ１８、Ｋ２６、Ｒ３４、Ｒ４３、Ｋ４８、Ｋ５１、Ｋ５６、Ｋ８７、Ｋ８８、Ｄ９０、Ｋ９６、Ｋ１０６、Ｋ１０７、Ｋ１２０、Ｑ１２５、Ｋ１４３、Ｒ１８６、Ｋ１８７、Ｒ２０２、Ｋ２１０、Ｋ２３５、Ｋ２９６、Ｋ２９８、Ｋ３１４、Ｋ３２０、Ｋ３２６、Ｋ３９７、Ｋ４４４、Ｋ４４９、Ｅ４５４、Ａ４８３、Ｅ４９１、Ｋ５２７、Ｋ５４１、Ｋ５８１、Ｒ５８３、Ｋ５８９、Ｋ５９５、Ｋ５９７、Ｋ６１３、Ｋ６２４、Ｋ６３５、Ｋ６３９、Ｋ６５６、Ｋ６６０、Ｋ６６７、Ｋ６７１、Ｋ６７７、Ｋ７１９、Ｋ７２５、Ｋ７３０、Ｋ７６３、Ｋ７８２、Ｋ７９１、Ｒ８００、Ｋ８０９、Ｋ８２３、Ｒ８３３、Ｋ８３４、Ｋ８３９、Ｋ８５２、Ｋ８５８、Ｋ８５９、Ｋ８６９、Ｋ８７１、Ｒ８７２、Ｋ８７７、Ｋ９０５、Ｒ９１８、Ｒ９２１、Ｋ９３２、Ｉ９６０、Ｋ９６２、Ｒ９６４、Ｒ９６８、Ｋ９７８、Ｋ９８１、Ｋ１０１３、Ｒ１０１６、Ｋ１０２１、Ｋ１０２９、Ｋ１０３４、Ｋ１０４１、Ｋ１０６５、Ｋ１０８４、及び／またはＫ１０９８を含むがこれらに限定されない、１つ以上の残基の変異によって修飾され、ＦｎＣａｓ１３（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ　Ｕ１１２）のアミノ酸位置番号付けに関する。ある特定の実施形態では、該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は、修飾された、より好ましくは標的に対する増加した特異性を有する。

【０３６９】

ある特定の実施形態では、酵素は、位置Ｋ１５、Ｒ１８、Ｋ２６、Ｋ３４、Ｒ４３、Ｋ４８、Ｋ５１、Ｒ５６、Ｋ８３、Ｋ８４、Ｒ８６、Ｋ９２、Ｒ１０２、Ｋ１０３、Ｋ１１６、Ｋ１２１、Ｒ１５８、Ｅ１５９、Ｒ１７４、Ｒ１８２、Ｋ２０６、Ｋ２５１、Ｋ２５３、Ｋ２６９、Ｋ２７１、Ｋ２７８、Ｐ３４２、Ｋ３８０、Ｒ３８５、Ｋ３９０、Ｋ４１５、Ｋ４２１、Ｋ４５７、Ｋ４７１、Ａ５０６、Ｒ５０８、Ｋ５１４、Ｋ５２０、Ｋ５２２、Ｋ５３８、Ｙ５４８、Ｋ５６０、Ｋ５６４、Ｋ５８０、Ｋ５８４、Ｋ５９１、Ｋ５９５、Ｋ６０１、Ｋ６３４、Ｋ６４０、Ｒ６４５、Ｋ６７９、Ｋ６８９、Ｋ７０７、Ｔ７１６、Ｋ７２５、Ｒ７３７、Ｒ７４７、Ｒ７４８、Ｋ７５３、Ｋ７６８、Ｋ７７４、Ｋ７７５、Ｋ７８５、Ｋ７８７、Ｒ７８８、Ｑ７９３、Ｋ８２１、Ｒ８３３、Ｒ８３６、Ｋ８４７、Ｋ８７９、Ｋ８８１、Ｒ８８３、Ｒ８８７、Ｋ８９７、Ｋ９００、Ｋ９３２、Ｒ９３５、Ｋ９４０、Ｋ９４８、Ｋ９５３、Ｋ９６０、Ｋ９８４、Ｋ１００３、Ｋ１０１７、Ｒ１０３３、Ｋ１１２１、Ｒ１１３８、Ｒ１１６５、Ｋ１１９０、Ｋ１１９９、及び／またはＫ１２０８を含むがこれらに限定されない、１つ以上の残基の変異によって修飾され、ＬｂＣａｓ１３（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ＮＤ２００６）のアミノ酸位置番号付けに関する。ある特定の実施形態では、該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は、修飾された、より好ましくは標的に対する増加した特異性を有する。

【０３７０】

ある特定の実施形態では、酵素は、位置Ｋ１４、Ｒ１７、Ｒ２５、Ｋ３３、Ｍ４２、Ｑ４７、Ｋ５０、Ｄ５５、Ｋ８５、Ｎ８６、Ｋ８８、Ｋ９４、Ｒ１０４、Ｋ１０５、Ｋ１１８、Ｋ１２３、Ｋ１３１、Ｒ１７４、Ｋ１７５、Ｒ１９０、Ｒ１９８、Ｉ２２１、Ｋ２６７、Ｑ２６９、Ｋ２８５、Ｋ２９１、Ｋ２９７、Ｋ３５７、Ｋ４０３、Ｋ４０９、Ｋ４１４、Ｋ４４８、Ｋ４６０、Ｋ５０１、Ｋ５１５、Ｋ５５０、Ｒ５５２、Ｋ５５８、Ｋ５６

４、Ｋ５６６、Ｋ５８２、Ｋ５９３、Ｋ６０４、Ｋ６０８、Ｋ６２３、Ｋ６２７、Ｋ６３３、Ｋ６３７、Ｅ６４３、Ｋ７８０、Ｙ７８７、Ｋ７９２、Ｋ８３０、Ｑ８４６、Ｋ８５８、Ｋ８６７、Ｋ８７６、Ｋ８９０、Ｒ９００、Ｋ９０１、Ｍ９０６、Ｋ９２１、Ｋ９２７、Ｋ９２８、Ｋ９３７、Ｋ９３９、Ｒ９４０、Ｋ９４５、Ｑ９７５、Ｒ９８７、Ｒ９９０、Ｋ１００１、Ｒ１０３４、Ｉ１０３６、Ｒ１０３８、Ｒ１０４２、Ｋ１０５２、Ｋ１０５５、Ｋ１０８７、Ｒ１０９０、Ｋ１０９５、Ｎ１１０３、Ｋ１１０８、Ｋ１１１５、Ｋ１１３９、Ｋ１１５８、Ｒ１１７２、Ｋ１１８８、Ｋ１２７６、Ｒ１２９３、Ａ１３１９、Ｋ１３４０、Ｋ１３４９、及び／またはＫ１３５６を含むがこれらに限定されない、１つ以上の残基の変異によって修飾され、ＭｂＣａｓ１３（Ｍｏｒａｘｅｌｌａ　ｂｏｖｏｃｕｌｉ　２３７）のアミノ酸位置番号付けに関する。ある特定の実施形態では、該１つ以上の変異を含むＣａｓ１３酵素は、修飾された、より好ましくは標的に対する増加した特異性を有する。

【０３７１】

一実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質は、ＡｓＣａｓ１３のアミノ酸位置番号付けを参照して、Ｓ１２２８（例えば、Ｓ１２２８Ａ）での変異で修飾される。参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＹａｍａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１６５：９４９－９６２（２０１６）を参照されたい。

【０３７２】

ある特定の実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質は、配列ＹＣＮ、ＹＣＶ、ＡＹＶ、ＴＹＶ、ＲＹＮ、ＲＣＮ、ＴＧＹＶ、ＮＴＴＮ、ＴＴＮ、ＴＲＴＮ、ＴＹＴＶ、ＴＹＣＴ、ＴＹＣＮ、ＴＲＴＮ、ＮＴＴＮ、ＴＡＣＴ、ＴＹＣＣ、ＴＲＴＣ、ＴＡＴＶ、ＮＴＴＶ、ＴＴＶ、ＴＳＴＧ、ＴＶＴＳ、ＴＹＹＳ、ＴＣＹＳ、ＴＢＹＳ、ＴＣＹＳ、ＴＮＹＳ、ＴＹＹＳ、ＴＮＴＮ、ＴＳＴＧ、ＴＴＣＣ、ＴＣＣＣ、ＴＡＴＣ、ＴＧＴＧ、ＴＣＴＧ、ＴＹＣＶ、またはＴＣＴＣを有するか含むＰＡＭを認識するように、非天然ＰＡＭを認識するよう修飾されてきた。特定の実施形態では、該変異されたＣａｓ１３は、ＡｓＣａｓ１３の位置またはＣａｓオーソログにおけるそれらに対応する位置１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、３４、３６、３９、４０、４３、４６、４７、５０、５４、５７、５８、１１１、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１５７、１５８、１５９、１６０、１６１、１６２、１６３、１６４、１６５、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５、１７６、１７７、１７８、５３２、５３３、５３４、５３５、５３６、５３７、５３８、５３９、５４０、５４１、５４２、５４３、５４４、５４５、５４６、５４７、５４８、５４９、５５０、５５１、５５２、５５３、５５４、５５５、５５６、５６５、５６６、５６７、５６８、５６９、５７０、５７１、５７２、５７３、５７４、５７５、５９２、５９３、５９４、５９５、５９６、５９７、５９８、５９９、６００、６０１、６０２、６０３、６０４、６０５、６０６、６０７、６０８、６０９、６１０、６１１、６１２、６１３、６１４、６１５、６１６、６１７、６１８、６１９、６２０、６２６、６２７、６２８、６２９、６３０、６３１、６３２、６３３、６３４、６３５、６３６、６３７、６３８、６４２、６４３、６４４、６４５、６４６、６４７、６４８、６４９、６５１、６５２、６５３、６５４、６５５、６５６、６７６、６７９、６８０、６８２、６８３、６８４、６８５、６８６、６８７、６８８、６８９、６９０、６９１、６９２、６９３、７０７、７１１、７１４、７１５、７１６、７１７、７１８、７１９、７２０、７２１、７２２、７３９、７６５、７６８、７６９、７７３、７７７、７７８、７７９、７８０、７８１、７８２、７８３、７８４、７８５、７８６、８７１、８７２、８７３、８７４、８７５、８７６、８７７、８７８、８７９、８８０、８８１、８８２、８８３、８８４、または１０４８、好ましくは、位置１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１６２、１６３、１６４、１６５、１６６、１６７、１６８、１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、１７４、１７５、１７６、１７７、５３６、５３７、５３８、５３９、５４０、５４１、５４２、５４３、５４４、５４５、５４６、５４７、５４８、５４９、５５０、５５１、５５２、５７０、５７１、５７２、５７３、５

９５、５９６、５９７、５９８、５９９、６００、６０１、６０２、６０３、６０４、６０５、６０６、６０７、６０８、６０９、６１０、６１１、６１２、６１３、６１４、６１５、６３０、６３１、６３２、６４６、６４７、６４８、６４９、６５０、６５１、６５２、６５３、６８３、６８４、６８５、６８６、６８７、６８８、６８９、または６９０で１つ以上の変異されたアミノ酸残基を含む。

【０３７３】

ある特定の実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質は、増加した活性、すなわち、幅広いＰＡＭ特異性を有するように修飾される。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３タンパク質は、ＡｓＣａｓ１３の位置５３９、５４２、５４７、５４８、５５０、５５１、５５２、１６７、６０４、及び／もしくは６０７、またはＡｓＣａｓ１３オーソログ、ホモログ、もしくはバリアント、好ましくは位置５４２もしくは５４２及び６０７での変異されたアミノ酸残基の対応する位置を含むが、これらに限定されない１つ以上の残基の変異によって修飾され、該変異は、好ましくはＳ５４２Ｒ及びＫ６０７Ｒのような５４２Ｒ及び６０７Ｒ、または位置５４２及び５４８（及び任意選択で５５２）での変異されたアミノ酸残基であり、該変異は好ましくはＳ５４２Ｒ及びＫ５４８Ｖ（及び任意選択でＮ５５２Ｒ）のような５４２Ｒ及び５４８Ｖ（及び任意選択で５５２Ｒ）、またはＬｂＣａｓ１３の位置５３２、５３８、５４２、及び／または５９５、またはＡｓＣａｓ１３オーソログ、ホモログ、もしくはバリアント、好ましくは位置５３２もしくは５３２、及び５９５での変異されたアミノ酸残基であり、該変異は好ましくはＧ５３２Ｒ及びＫ５９５Ｒのような５３２Ｒ及び５９５Ｒであるか、または好ましくは位置５３２及び５３８（及び任意選択で５４２）での変異されたアミノ酸残基であり、該変異は好ましくはＧ５３２Ｒ及びＫ５３８Ｖ（及び任意選択でＹ５４２Ｒ）のような５３２Ｒ及び５３８Ｖ（及び任意選択で５４２Ｒ）であり、最も好ましくは該変異はＡｓＣａｓ１３のＳ５４２Ｒ及びＫ６０７Ｒ、Ｓ５４２Ｒ及びＫ５４８Ｖ、またはＳ５４２Ｒ、Ｋ５４８Ｖ、Ｎ５５２Ｒである。

【０３７４】

非活性化／不活性化Ｃａｓ１３タンパク質

Ｃａｓ１３タンパク質がヌクレアーゼ活性を有する場合、Ｃａｓ１３タンパク質は、減少したヌクレアーゼ活性、例えば、野生型酵素と比較して少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、または１００％のヌクレアーゼ不活性を有するように修飾され得るか、または別の方法で言えば、Ｃａｓ１３酵素は非変異型もしくは野生型Ｃａｓ１３酵素またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質のヌクレアーゼ活性の約０％、または非変異型もしくは野生型Ｃａｓ１３酵素のヌクレアーゼ活性の約３％、もしくは約５％、もしくは約１０％以下を有利に有し、例えば、非変異型または野生型Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ Ｕ１１２（ＦｎＣａｓ１３）、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６（ＡｓＣａｓ１３）、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ細菌ＮＤ２００６（ＬｂＣａｓ１３）またはＭｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ２３７（ＭｂＣａｓ１３ Ｃａｓ１３酵素またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質である。このことは、変異をＣａｓ１３のヌクレアーゼドメイン及びそれらのオーソログに導入することによって可能である。

【０３７５】

本発明の好ましい実施形態では、Ｃａｓ１３ニッカーゼである少なくとも１つのＣａｓ１３タンパク質が使用される。より具体的には、標的鎖を切断しないが、標的鎖に相補的な鎖、すなわち、本明細書ではガイド配列に相補的でない鎖とも呼ばれる非標的ＤＮＡ鎖のみを切断することができるＣａｓ１３ニッカーゼが使用される。より具体的には、Ｃａｓ１３ニッカーゼは、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．からのＣａｓ１３のＮｕｃドメインにおける位置１２２６Ａ、またはＣａｓ１３オーソログにおける対応する位置でのアルギニンにおける変異を含むＣａｓ１３タンパク質である。さらなる特定の実施形態では、酵素は、アルギニンからアラニンへの置換またはＲ１２２６Ａ変異を含む。酵素がＡｓＣａｓ１３でない場合変異が対応する位置における残基でなされ得ることは、当業者によって理解されるであろう。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３はＦｎＣａｓ１３であ

り、変異は位置Ｒ１２１８のアルギニンにある。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３はＬｂＣａｓ１３であり、変異は位置Ｒ１１３８のアルギニンにある。特定の実施形態では、Ｃａｓ１３はＭｂＣａｓ１３であり、変異は位置Ｒ１２９３のアルギニンにある。

【０３７６】

ある特定の実施形態では、使用は、操作されるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質から追加的または代替的になり、ヌクレアーゼ活性を低減または排除する１つ以上の変異を含むことができる。ＦｎＣａｓ１３ｐ　ＲｕｖＣドメインにおけるアミノ酸位置は、Ｄ９１７Ａ、Ｅ１００６Ａ、Ｅ１０２８Ａ、Ｄ１２２７Ａ、Ｄ１２５５Ａ、Ｎ１２５７Ａ、Ｄ９１７Ａ、Ｅ１００６Ａ、Ｅ１０２８Ａ、Ｄ１２２７Ａ、Ｄ１２５５Ａ及びＮ１２５７Ａを含むがこれらに限定されない。出願人は、ＰＤ－（Ｄ／Ｅ）ＸＫヌクレアーゼスーパーファミリー及びＨｉｎｃＩＩエンドヌクレアーゼ様に最も類似する推定第２ヌクレアーゼドメインも特定した。ヌクレアーゼ活性を実質的に低減するためのこの推定ヌクレアーゼドメインにおいて生成される点変異は、Ｎ５８０Ａ、Ｎ５８４Ａ、Ｔ５８７Ａ、Ｗ６０９Ａ、Ｄ６１０Ａ、Ｋ６１３Ａ、Ｅ６１４Ａ、Ｄ６１６Ａ、Ｋ６２４Ａ、Ｄ６２５Ａ、Ｋ６２７Ａ及びＹ６２９Ａを含むがこれらに限定されない。好ましい実施形態では、ＦｎＣａｓ１３ｐ　ＲｕｖＣドメインにおける変異は、Ｄ９１７ＡまたはＥ１００６Ａであり、Ｄ９１７ＡまたはＥ１００６Ａ変異は、ＦｎＣａｓ１３エフェクタータンパク質のＤＮＡ切断活性を完全に不活性化する。別の実施形態では、ＦｎＣａｓ１３ｐ　ＲｕｖＣドメインにおける変異は、Ｄ１２５５Ａであり、変異されたＦｎＣａｓ１３エフェクタータンパク質は、有意に低減した核酸分解活性を有する。

【０３７７】

より具体的には、不活性化Ｃａｓ１３酵素は、ＡｓＣａｓ１３のアミノ酸位置Ａｓ９０８、Ａｓ９９３、Ａｓ１２６３またはＣａｓ１３オーソログにおける対応する位置において変異された酵素を含む。追加的に、不活性化Ｃａｓ１３酵素は、ＬｂＣａｓ１３のアミノ酸位置Ｌｂ８３２、９２５、９４７もしくは１１８０またはＣａｓ１３オーソログにおける対応する位置において変異された酵素を含む。より具体的には、不活性化Ｃａｓ１３酵素は、ＡｓＣａｓ１３の変異ＡｓＤ９０８Ａ、ＡｓＥ９９３Ａ、ＡｓＤ１２６３ＡまたはＣａｓ１３オーソログにおける対応する変異のうちの１つ以上を含む酵素を含む。追加的に、不活性化Ｃａｓ１３酵素は、ＬｂＣａｓ１３の変異ＬｂＤ８３２Ａ、Ｅ９２５Ａ、Ｄ９４７ＡもしくはＤ１１８０Ａ、またはＣａｓ１３オーソログにおける対応する変異のうちの１つ以上を含む酵素を含む。

【０３７８】

変異はまた、近傍の残基、例えば、ヌクレアーゼ活性に参加する上記で示されたものに近いアミノ酸で行われ得る。いくつかの実施形態では、ＲｕｖＣドメインのみが不活性化され、他の実施形態では、別の推定ヌクレアーゼドメインが不活性化され、エフェクタータンパク質複合体はニッカーゼとして機能し、１つのＤＮＡ鎖のみを切断する。好ましい実施形態では、他の推定ヌクレアーゼドメインは、ＨｉｎｃＩＩ様エンドヌクレアーゼドメインである。

【０３７９】

不活性化Ｃａｓ１３またはＣａｓ１３ニッカーゼは、例えば、アデノシンデアミナーゼまたはその触媒ドメインを含む、関連する（例えば、融合タンパク質を介した）１つ以上の機能的ドメインを有することができる。いくつかの場合では、追加的に少なくとも１つの異種ＮＬＳが提供されることは有利である。いくつかの例では、ＮＬＳをＮ末端に配置することは有利である。一般に、不活性化Ｃａｓ１３またはＣａｓ１３ニッカーゼ上の１つ以上の機能的ドメインの位置決めは、属性機能効果を有する標的に影響するための機能的ドメインについての正しい空間配向を可能にするものである。例えば、機能的ドメインがそのアデノシンデアミナーゼ触媒ドメインである際、アデノシンデアミナーゼ触媒ドメインは、標的アデニンと接触し、脱アミノすることを可能にする空間配向に配置される。これは、Ｃａｓ１３のＮ末端／Ｃ末端以外の位置を含むことができる。いくつかの実施形態では、アデノシンデアミナーゼタンパク質またはその触媒ドメインは、Ｃａｓ１３の内

部ループに挿入される。
【０３８０】
ＰＡＭの決定
ＰＡＭの決定は、以下のように確実にされ得る。この実験は、この実験は、ＳｔＣａｓ９の異種発現のためのＥ．ｃｏｌｉにおける同様の研究と密接に匹敵する（Ｓａｐｒａｎａｕｓｋａｓ，Ｒ．ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ ３９，９２７５－９２８２（２０１１））。出願人は、ＰＡＭ及び抵抗性遺伝子の両方を含有するプラスミドを異種Ｅ．ｃｏｌｉに導入し、次いで、対応する抗生物質上に蒔く。プラスミドのＤＮＡ切断がある場合、出願人は、生存可能なコロニーを観察しない。
【０３８１】
さらに詳細には、アッセイは、ＤＮＡ標的について以下の通りである。２つのＥ．ｃｏｌｉ株が、本アッセイにおいて使用される。１つは、細菌株からの内因性エフェクタータンパク質座位をコードするプラスミドを担持する。他方の株は、空のプラスミドである（例えば、ｐＡＣＹＣ１８４、対照株）。全ての可能な７または８ｂｐのＰＡＭ配列は、抗生物質耐性プラスミド（アンピシリン耐性遺伝子を有するｐＵＣ１９）上に提示される。ＰＡＭは、プロトスペーサー１の配列（内因性エフェクタータンパク質座位における第１のスペーサーに対するＤＮＡ標的）の隣に位置する。２つのＰＡＭライブラリをクローン化した。１つは、プロトスペーサーの８ランダムｂｐ５’を有する（例えば、６５５３６の異なるＰＡＭ配列の全体＝複雑性）。他方のライブラリは、プロトスペーサーの７のランダムｂｐ３’を有する（例えば、総複雑度は１６３８４の異なるＰＡＭである）。可能なＰＡＭ当たり平均５００のプラスミドを有するように両方のライブラリをクローン化した。試験株及び対照株を別個の形質転換において５’ＰＡＭ及び３’ＰＡＭライブラリで形質転換し、形質転換された細胞をアンピシリンプレート上に別個に蒔いた。認識及びその後のプラスミドの切断／干渉は、細胞をアンピシリンに対して脆弱にし、成長を防止する。形質転換の約１２時間後、試験及び対照株によって形成された全てのコロニーを収穫し、プラスミドＤＮＡを単離した。プラスミドＤＮＡを、ＰＣＲ増幅及びその後のディープシークエンシングのためのテンプレートとして使用した。転写されていないライブラリにおける全てのＰＡＭの表現は、形質転換された細胞におけるＰＡＭの期待される表現を示した。対照株において発見された全てのＰＡＭの表現は、実際の表現を示した。試験株における全てのＰＡＭの表現は、どのＰＡＭが酵素によって認識されないことを示し、対照株との比較は、枯渇したＰＡＭの配列を抽出することを可能にする。
【０３８２】
以下のＰＡＭがある特定の野生型Ｃａｓ１３オーソログについて特定されている。Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６ Ｃａｓ１３（ＡｓＣａｓ１３）、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ細菌ＮＤ２００６ Ｃａｓ１３（ＬｂＣａｓ１３）及びＰｒｅｖｏｔｅｌｌａ ａｌｂｅｎｓｉｓ（ＰａＣａｓ１３）は、標的部位をＴＴＴＶ ＰＡＭによって切断することができ、ＶはＡ／ＣまたはＧであり、ＦｎＣａｓ１３ｐはＴＴＮによって先行される部位を切断することができ、ＮはＡ／Ｃ／ＧまたはＴである。Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ＡＡＸ０８＿００２０５、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｂｏｖｏｃｕｌｉ ＡＡＸ１１＿００２０５、Ｂｕｔｙｒｉｖｉｂｒｉｏ ｓｐ．ＮＣ３００５、Ｔｈｉｏｍｉｃｒｏｓｐｉｒａ ｓｐ．ＸＳ５、またはＬａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ細菌ＭＡ２０２０ ＰＡＭは５’ ＴＴＮであり、ＮはＡ／Ｃ／ＧまたはＴである。天然ＰＡＭ配列はＴＴＴＶまたはＢＴＴＶであり、ＢはＴ／ＣまたはＧかつＶはＡ／ＣまたはＧであり、エフェクタータンパク質はＭｏｒａｘｅｌｌａ ｌａｃｕｎａｔａ Ｃａｓ１３である。
【０３８３】
コドン最適化核酸配列
エフェクタータンパク質が核酸として投与される場合、本出願は、コドン最適化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ Ｖ型タンパク質、より具体的にはＣａｓ１３コードする核酸配列（及び任意選択でタンパク質配列）の使用を想定する。コドン最適化配列の例は、この例では、

真核生物、例えば、ヒト（すなわち、ヒトにおける発現のために最適化される）、または本明細書で論じられる別の真核生物、動物、または哺乳動物における発現のために最適化された配列であり、例えば、ＷＯ２０１４／０９３６２２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７）におけるＳａＣａｓ９ヒトコドン最適化配列を、コドン最適化配列の例として参照されたい（当業者の知識及び本開示から、特に、エフェクタータンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）に関するコドン最適化コード核酸分子（複数可）は、当業者の範囲内である）。このことが好まれる一方で、他の例が可能であり、ヒト以外の宿主種に対するコドン最適化、または特定の器官に対するコドン最適化が既知であることを理解されたい。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ／ＲＮＡ標的化Ｃａｓタンパク質をコードする酵素コード配列は、真核細胞のような特定の細胞における発現に最適化される。真核細胞は、本明細書で論じられるヒト、または非ヒト真核生物、または動物または哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、家畜、または非ヒト哺乳動物もしくは霊長類を含むが、これらに限定されない植物または哺乳動物のような特定の生物に由来するものであり得る。いくつかの実施形態では、ヒトの生殖系遺伝的同一性を修飾するためのプロセス及び／または人間または動物に実質的な医学的利益を与えることなく、それらに苦痛を引き起こすようである動物の遺伝的同一性を修飾するためのプロセス、ならびにかかるプロセスから生じる動物は除外され得る。一般に、コドン最適化は、天然アミノ酸配列を維持しながら、天然配列の少なくとも１つのコドン（例えば、約または約１超、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０、またはそれ以上のコドン）を、その宿主細胞の遺伝子においてより頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンに置き換えることによって、目的の宿主細胞における発現を増強させるための核酸配列を修飾するプロセスを指す。様々な種は、特定のアミノ酸のある特定のコドンについて特定のバイアスを示す。コドンバイアス（生物間のコドン使用の違い）は、しばしばメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の翻訳の効率と相関し、このことは、逆に、とりわけ、翻訳されるコドンの特性及び特定の転移ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）分子の利用可能性に依存すると考えられる。細胞における選択されたｔＲＮＡの優位性は、概して、ペプチド合成において最も頻繁に使用されるコドンの反映である。したがって、遺伝子は、コドン最適化に基づいて所与の生物における最適な遺伝子発現のために調整され得る。コドン使用表は、例えば、ｗｗｗ．ｋａｚｕｓａ．ｏｒｊｐ／ｃｏｄｏｎ／で利用可能な「コドン使用表」で簡単に利用可能であり、これらの表はいくつもの方法で適合され得る。Ｎａｋａｍｕｒａ，Ｙ．，ｅｔ ａｌ．“Ｃｏｄｏｎ ｕｓａｇｅ ｔａｂｕｌａｔｅｄ ｆｒｏｍ ｔｈｅ ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＤＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｄａｔａｂａｓｅｓ：ｓｔａｔｕｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｙｅａｒ ２０００”Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２８：２９２（２０００）を参照されたい。特定の宿主細胞における発現のための特定の配列を最適化するコドンについてのコンピュータアルゴリズムも利用可能であり、Ｇｅｎｅ Ｆｏｒｇｅ（Ａｐｔａｇｅｎ；Ｊａｃｏｂｕｓ，ＰＡ）のような、利用可能である。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ／ＲＮＡ標的化Ｃａｓタンパク質をコードする配列における１つ以上のコドン（１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、５０、またはそれ以上、または全てのコドン）は、特定のアミノ酸について最も頻繁に使用されるコドンに対応する。酵母におけるコドン使用に関して、参照は、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｙｅａｓｔｇｅｎｏｍｅ．ｏｒｇ／ｃｏｍｍｕｎｉｔｙ／ｃｏｄｏｎ＿ｕｓａｇｅ．ｓｈｔｍｌで利用可能なオンラインＹｅａｓｔ Ｇｅｎｏｍｅデータベース、またはＣｏｄｏｎ ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ ｉｎ ｙｅａｓｔ，Ｂｅｎｎｅｔｚｅｎ ａｎｄ Ｈａｌｌ，Ｊ ＢｉｏｌＣｈｅｍ．１９８２ Ｍａｒ ２５；２５７（６）：３０２６－３１に対してなされる。藻類を含む植物におけるコドン使用に関して、参照は、Ｃｏｄｏｎ ｕｓａｇｅ ｉｎ ｈｉｇｈｅｒ ｐｌａｎｔｓ，ｇｒｅｅｎ ａｌｇａｅ，ａｎｄ ｃｙａｎｏｂａｃｔｅｒｉａ，Ｃａｍｐｂｅｌｌ ａｎｄ Ｇｏｗｒｉ，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．１９９０ Ｊａｎ；９２（１）：１－１１、同様にＣｏｄｏｎ ｕｓａｇｅ ｉｎ ｐｌａｎｔ ｇｅｎｅｓ，Ｍｕｒｒａｙ ｅｔ ａｌ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９８９ Ｊａｎ ２５；１７（２）：４７７－９８、またはＳｅｌｅｃｔｉｏｎ ｏｎ ｔｈｅ ｃｏｄｏｎ ｂｉａｓ ｏｆ ｃｈ

loroplast and cyanelle genes in different plant and algal lineages, Morton BR, J Mol Evol. 1998 Apr;46(4):449-59に対してなされる。

【0384】

ある特定の例示的実施形態では、CRISPR Casタンパク質は、表1から選択される。

【表1】

表1

C2c2オーソログ	コード	複数文字
Leptotrichia shahii	C2-2	Lsh
L wadei F0279 (Lw2)	C2-3	Lw2
Listeria seeligeri	C2-4	Lse
Lachnospiraceae細菌MA2020	C2-5	LbM
Lachnospiraceae細菌NK4A179	C2-6	LbNK179
[Clostridium] aminophilum DSM 10710	C2-7	Ca
Carnobacterium gallinarum DSM 4847	C2-8	Cg
Carnobacterium gallinarum DSM 4847	C2-9	Cg2
Paludibacter propionicigenes WB4	C2-10	Pp
Listeria weihenstephanensis FSL R9-0317	C2-11	Lwei
Listeriaceae細菌FSL M6-0635	C2-12	LbFSL
Leptotrichia wadei F0279	C2-13	Lw
Rhodobacter capsulatus SB 1003	C2-14	Rc
Rhodobacter capsulatus R121	C2-15	Rc
Rhodobacter capsulatus DE442	C2-16	Rc

【0385】

ある特定の例示的実施形態では、CRISPRエフェクタータンパク質は、表2から選

択されるＣａｓ１３ａタンパク質である。

【表２】

表２

ｃ２ｃ２－５	１	Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ細菌ＭＡ２０２０（配列番号３４）	MQISKVNHKHVAVGQKDRERITG FIYNDPVGDEKSLEDVVAKRANDT KVLFNVFNTKDLYDSQESDKSEK DKEIISKGAKFVAKSFNSAITIL KKQNKIYSTLTSQQVIKELKDKF GGARIYDDDIEEALTETLKKSFR KENVRNSIKVLIENAAGIRSSLS KDEEELIQEYFVKQLVEEYTKTK LQKNVVKSIKNQNMVIQPDSDSQ VLSLSESRREKQSSAVSSDTLVN CKEKDVLKAFLTDYAVLDEDERN SLLWKLRNLVNLYFYGSESIRDY SYTKEKSVWKEHDEQKANKTLFI DEICHITKIGKNGKEQKVLDYEE NRSRCRKQNINYYRSALNYAKNN TSGIFENEDSNHFWIHLIENEVE RLYNGIENGEEFKFETGYISEKV WKAVINHLSIKYIALGKAVYNYA MKELSSPGDIEPGKIDDSYINGI TSFDYEIIKAEESLQRDISMNVV FATNYLACATVDTDKDFLLFSKE DIRSCTKKDGNLCKNIMQFWGGY STWKNFCEEYLKDDKDALELLYS LKSMLYSMRNSSFHFSTENVDNG SWDTELIGKLFEEDCNRAARIEK EKFYNNNLHMFYSSSLLEKVLER LYSSHHERASQVPSFNRVFVRKN FPSSLSEQRITPKFTDSKDEQIW QSAVYYLCKEIYYNDFLQSKEAY KLFREGVKNLDKNDINNQKAADS FKQAVVYYGKAIGNATLSQVCQA IMTEYNRQNNDGLKKKSAYAEKQ NSNKYKHYPLFLKQVLQSAFWEY LDENKEIYGFISAQIHKSNVEIK AEDFIANYSSQQYKKLVDKVKKT PELQKWYTLGRLINPRQANQFLG SIRNYVQFVKDIQRRAKENGNPI RNYYEVLESDSIIKILEMCTKLN GTTSNDIHDYFRDEDEYAEYISQ FVNFGDVHSGAALNAFCNSESEG KKNGIYYDGINPIVNRNWVLCK

50

			LYGSPDLISKIISRVNENMIHDF HKQEDLIREYQIKGICSNKKEQQ DLRTFQVLKNRVELRDIVEYSEI INELYGQLIKWCYLRERDLMYFQ LGFHYLCLNNASSKEADYIKINV DDRNISGAILYQIAAMYINGLPV YYKKDDMYVALKSGKKASDELNS NEQTSKKINYFLKYGNNILGDKK DQLYLAGLELFENVAEHENIIIF RNEIDHFHYFYDRDRSMLDLYSE VFDRFFTYDMKLRKNVVNMLYNI LLDHNIVSSFVFETGEKKVGRGD SEVIKPSAKIRLRANNGVSSDVF TYKVGSKDELKIATLPAKNEEFL LNVARLIYYPDMEAVSENMVREG VVKVEKSNDKKGKISRGSNTRSS NQSKYNNKSKNRMNYSMGSIFEK MDLKFD
c2c2－6	2	Lachnospiraceae細菌NK4A179（配列番号35）	MKISKVREENRGAKLTVNAKTAV VSENRSQEGILYNDPSRYGKSRK NDEDRDRYIESRLKSSGKLYRIF NEDKNKRETDELQWFLSEIVKKI NRRNGLVLSDMLSVDDRΛFEKΛF EKYAELSYTNRRNKVSGSPAFET CGVDAATAERLKGIISETNFINR IKNNIDNKVSEDIIDRIIAKYLK KSLCRERVKRGLKKLLMNAFDLP YSDPDIDVQRDFIDYVLEDFYHV RAKSQVSRSIKNMNMPVQPEGDG KFAITVSKGGTESGNKRSAEKEA FKKFLSDYASLDERVRDDMLRRM RRLVVLYFYGSDDSKLSDVNEKF DVWEDHAARRVDNREFIKLPLEN KLANGKTDKDAERIRKNTVKELY RNQNIGCYRQAVKAVEEDNNGRY FDDKMLNMFFIHRIEYGVEKIYA NLKQVTEFKARTGYLSEKIWKDL INYISIKYIAMGKAVYNYAMDEL NASDKKEIELGKISEEYLSGISS FDYELIKAEEMLQRETAVYVAFA ARHLSSQTVELDSENSDFLLLKP

			K G T M D K N D K N K L A S N N I L N F L K D K E T L R D T I L Q Y F G G H S L W T D F P F D K Y L A G G K D D V D F L T D L K D V I Y S M R N D S F H Y A T E N H N N G K W N K E L I S A M F E H E T E R M T V V M K D K F Y S N N L P M F Y K N D D L K K L L I D L Y K D N V E R A S Q V P S F N K V F V R K N F P A L V R D K D N L G I E L D L K A D A D K G E N E L K F Y N A L Y Y M F K E I Y Y N A F L N D K N V R E R F I T K A T K V A D N Y D R N K E R N L K D R I K S A G S D E K K K L R E Q L Q N Y I A E N D F G Q R I K N I V Q V N P D Y T L A Q I C Q L I M T E Y N Q Q N N G C M Q K K S A A R K D I N K D S Y Q H Y K M L L L V N L R K A F L E F I K E N Y A F V L K P Y K H D L C D K A D F V P D F A K Y V K P Y A G L I S R V A G S S E L Q K W Y I V S R F L S P A Q A N H M L G F L H S Y K Q Y V W D I Y R R A S E T G T E I N H S I A E D K I A G V D I T D V D A V I D L S V K L C G T I S S E I S D Y F K D D E V Y A E Y I S S Y L D F E Y D G G N Y K D S L N R F C N S D A V N D Q K V A L Y Y D G E H P K L N R N I I L S K L Y G E R R F L E K I T D R V S R S D I V E Y Y K L K K E T S Q Y Q T K G I F D S E D E Q K N I K K F Q E M K N I V E F R D L M D Y S E I A D E L Q G Q L I N W I Y L R E R D L M N F Q L G Y H Y A C L N N D S N K Q A T Y V T L D Y Q G K K N R K I N G A I L Y Q I C A M Y I N G L P L Y Y V D K D S S E W T V S D G K E S T G A K I G E F Y R Y A K S F E N T S D C Y A S G L E I F E N I S E H D N I T E L R N Y I E H F R Y Y S S F D R S F L G I Y S E V F D R F F T Y D L K Y R K N V P T I L Y N I L L Q H F V N V R F E F V S G K K M I G I D K K D R K I A K E K E C A R I T I R E K N G V Y S E Q F T Y K L K N G T V Y V D A R D K R Y L Q S I I R L L F Y P E K V N M D E M I E V K E K K K P S D N N T G K G Y S K R D R Q Q D R K E Y D K Y K E K K K K E G N F L S G M G G N I N W D E I N A Q L K N
c 2	3	[C 1 o	M K F S K V D H T R S A V G I Q K A T D S V H

10 20 30 40

c2-7		strid ium] am inop hilu m DS M 10 710 配列番号 36）	GMLYTDPKKQEVNDLDKRFDQLN VKAKRLYNVFNQSKAEEDDDEKR FGKVVKKLNRELKDLLFHREVSR YNSIGNAKYNYYGIKSNPEEIVS NLGMVESLKGERDPQKVISKLLL YYLRKGLKPGTDGLRMILEASCG LRKLSGDEKELKVFLQTLDEDFE KKTFKKNLIRSIENQNMAVQPSN EGDPIIGITQGRFNSQKNEEKSA IERMMSMYADLNEDHREDVLRKL RRLNVLYFNVDTEKTEEPTLPGE VDTNPVFEVWHDHEKGKENDRQF ATFAKILTEDRETRKKEKLAVKE ALNDLKSAIRDHNIMAYRCSIKV TEQDKDGLFFEDQRINRFWIHHI ESAVERILASINPEKLYKLRIGY LGEKVWKDLLNYLSIKYIAVGKA VFHFAMEDLGKTGQDIELGKLSN SVSGGLTSFDYEQIRADETLQRQ LSVEVAFAANNLFRAVVGQTGKK IEQSKSEENEEDFLLWKAEKIAE SIKKEGEGNTLKSILQFFGGASS WDLNHFCAAYGNESSALGYETKF ADDLRKAIYSLRNETFHFTTLNK GSFDWNAKLIGDMFSHEAATGIA VERTRFYSNNLPMFYRESDLKRI MDHLYNTYHPRASQVPSFNSVFV RKNFRLFLSNTLNTNTSFDTEVY QKWESGVYYLFKEIYYNSFLPSG DAHHLFFEGLRRIRKEADNLPIV GKEAKKRNAVQDFGRRCDELKNL SLSAICQMIMTEYNEQNNGNRKV KSTREDKRKPDIFQHYKMLLLRT LQEAFAIYIRREEFKFIFDLPKT LYVMKPVEEFLPNWKSGMFDSLV ERVKQSPDLQRWYVLCKFLNGRL LNQLSGVIRSYIQFAGDIQRRAK ANHNRLYMDNTQRVEYYSNVLEV VDFCIKGTSRFSNVFSDYFRDED AYADYLDNYLQFKDEKIAEVSSF AALKTFCNEEEVKAGIYMDGENP

10

20

30

40

			VMQRNIVMAKLFGPDEVLKNVVP KVTREEIEEYYQLEKQIAPYRQN GYCKSEEDQKKLLRFQRIKNRVE FQTITEFSEIINELLGQLISWSF LRERDLLYFQLGFHYLCLHNDTE KPAEYKEISREDGTVIRNAILHQ VAAMYVGGLPVYTLADKKLAAFE KGEADCKLSISKDTAGAGKKIKD FFRYSKYVLIKDRMLTDQNQKYT IYLAGLELFENTDEHDNITDVRK YVDHFKYYATSDENAMSILDLYS EIHDRFFTYDMKYQKNVANMLEN ILLRHFVLIRPEFFTGSKKVGEG KKITCKARAQIEIAENGMRSEDF TYKLSDGKKNISTCMIAARDQKY LNTVARLLYYPHEAKKSIVDTRE KKNNKKTNRGDGTFNKQKGTARK EKDNGPREFNDTGFSNTPFAGFD PFRNS
c2c2－8	5	Carnobacterium gallinarum DSM 4847（配列番号37）	MRITKVKIKLDNKLYQVTMQKEE KYGTLKLNEESRKSTAEILRLKK ASFNKSFHSKTINSQKENKNATI KKNGDYISQIFEKLVGVDTNKNI RKPKMSLTDLKDLPKKDLALFIK RKFKNDDIVEIKNLDLISLFYNA LQKVPGEHFTDESWADFCQEMMP YREYKNKFIERKIILLANSIEQN KGFSINPETFSKRKRVLHQWAIE VQERGDFSILDEKLSKLAEIYNF KKMCKRVQDELNDLEKSMKKGKN PEKEKEAYKKQKNFKIKTIWKDY PYKTHIGLIEKIKENEELNQFNI EIGKYFEHYFPIKKERCTEDEPY YLNSETIATTVNYQLKNALISYL MQIGKYKQFGLENQVLDSKKLQE IGIYEGFQTKFMDACVFATSSLK NIIEPMRSGDILGKREFKEAIAT SSFVNYHHFFPYFPFELKGMKDR ESELIPFGEQTEAKQMQNIWALR GSVQQIRNEIFHSFDKNQKFNLP QLDKSNFEFDASENSTGKSQSYI

			E T D Y K F L F E A E K N Q L E Q F F I E R I K S S G A L E Y Y P L K S L E K L F A K K E M K F S L G S Q V V A F A P S Y K K L V K K G H S Y Q T A T E G T A N Y L G L S Y Y N R Y E L K E E S F Q A Q Y Y L L K L I Y Q Y V F L P N F S Q G N S P A F R E T V K A I L R I N K D E A R K K M K K N K K F L R K Y A F E Q V R E M E F K E T P D Q Y M S Y L Q S E M R E E K V R K A E K N D K G F E K N I T M N F E K L L M Q I F V K G F D V F L T T F A G K E L L L S S E E K V I K E T E I S L S K K I N E R E K T L K A S I Q V E H Q L V A T N S A I S Y W L F C K L L D S R H L N E L R N E M I K F K Q S R I K F N H T Q H A E L I Q N L L P I V E L T I L S N D Y D E K N D S Q N V D V S A Y F E D K S L Y E T A P Y V Q T D D R T R V S F R P I L K L E K Y H T K S L I E A L L K D N P Q F R V A A T D I Q E W M H K R E E I G E L V E K R K N L H T E W A E G Q Q T L G A E K R E E Y R D Y C K K I D R F N W K A N K V T L T Y L S Q L H Y L I T D L L G R M V G F S A L F E R D L V Y F S R S F S E L G G E T Y H I S D Y K N L S G V L R L N A E V K P I K I K N I K V I D N E E N P Y K G N E P E V K P F L D R L H A Y L E N V I G I K A V H G K I R N Q T A H L S V L Q L E L S M I E S M N N L R D L M A Y D R K L K N A V T K S M I K I L D K H G M I L K L K I D E N H K N F E I E S L I P K E I I H L K D K A I K T N Q V S E E Y C Q L V L A L L T T N P G N Q L N
c 2 c 2 － 9	6	C a r n o b a c t e r i u m g a l l i n a r u m D S M 4 8 4 7 （配列番号３８）	M R M T K V K I N G S P V S M N R S K L N G H L V W N G T T N T V N I L T K K E Q S F A A S F L N K T L V K A D Q V K G Y K V L A E N I F I I F E Q L E K S N S E K P S V Y L N N I R R L K E A G L K R F F K S K Y H E E I K Y T S E K N Q S V P T K L N L I P L F F N A V D R I Q E D K F D E K N W S Y F C K E M S P Y L D Y K K S Y L N R K K E I L A N S I Q Q N R G F S M P T A E E P N L L S K R K Q L F Q Q W A M K F Q E S P L I Q Q N N F A V E Q F N K E F A N K I N E L A A V Y N V D E L C T A I T E K L M N

			F D K D K S N K T R N F E I K K L W K Q H P H N K D K A L I K L F N Q E G N E A L N Q F N I E L G K Y F E H Y F P K T G K K E S A E S Y Y L N P Q T I I K T V G Y Q L R N A F V Q Y L L Q V G K L H Q Y N K G V L D S Q T L Q E I G M Y E G F Q T K F M D A C V F A S S S L R N I I Q A T T N E D I L T R E K F K K E L E K N V E L K H D L F F K T E I V E E R D E N P A K K I A M T P N E L D L W A I R G A V Q R V R N Q I F H Q Q I N K R H E P N Q L K V G S F E N G D L G N V S Y Q K T I Y Q K L F D A E I K D I E I Y F A E K I K S S G A L E Q Y S M K D L E K L F S N K E L T L S L G G Q V V A F A P S Y K K L Y K Q G Y F Y Q N E K T I E L E Q F T D Y D F S N D V F K A N Y Y L I K L I Y H Y V F L P Q F S Q A N N K L F K D T V H Y V I Q Q N K E L N T T E K D K K N N K K I R K Y A F E Q V K L M K N E S P E K Y M Q Y L Q R E M Q E E R T I K E A K K T N E E K P N Y N F E K L L I Q I F I K G F D T F L R N F D L N L N P A E E L V G T V K E K A E G L R K R K E R I A K I L N V D E Q I K T G D E E I A F W I F A K L L D A R H L S E L R N E M I K F K Q S S V K K G L I K N G D L I E Q M Q P I L E L C I L S N D S E S M E K E S F D K I E V F L E K V E L A K N E P Y M Q E D K L T P V K F R F M K Q L E K Y Q T R N F I E N L V I E N P E F K V S E K I V L N W H E E K E K I A D L V D K R T K L H E E W A S K A R E I E E Y N E K I K K N K S K K L D K P A E F A K F A E Y K I I C E A I E N F N R L D H K V R L T Y L K N L H Y L M I D L M G R M V G F S V L F E R D F V Y M G R S Y S A L K K Q S I Y L N D Y D T F A N I R D W E V N E N K H L F G T S S S D L T F Q E T A E F K N L K K P M E N Q L K A L L G V T N H S F E I R N N I A H L H V L R N D G K G E G V S L L S C M N D L R K L M S Y D R K L K N A V T K A I I K I L D K H G M I L K L T N N D H T K P F E I E S L K P K K I I H L E K S N H S F P M D Q V S Q E Y C D L V K K M L V F T N
c 2	7	P a l u	M R V S K V K V K D G G K D K M V L V H R K T

c 2 − 1 0		d i b a c t e r p r o p i o n i c i g e n e s W B 4 （配列番号３９）	T G A Q L V Y S G Q P V S N E T S N I L P E K K R Q S F D L S T L N K T I I K F D T A K K Q K L N V D Q Y K I V E K I F K Y P K Q E L P K Q I K A E E I L P F L N H K F Q E P V K Y W K N G K E E S F N L T L L I V E A V Q A Q D K R K L Q P Y Y D W K T W Y I Q T K S D L L K K S I E N N R I D L T E N L S K R K K A L L A W E T E F T A S G S I D L T H Y H K V Y M T D V L C K M L Q D V K P L T D D K G K I N T N A Y H R G L K K A L Q N H Q P A I F G T R E V P N E A N R A D N Q L S I Y H L E V V K Y L E H Y F P I K T S K R R N T A D D I A H Y L K A Q T L K T T I E K Q L V N A I R A N I I Q Q G K T N H H E L K A D T T S N D L I R I K T N E A F V L N L T G T C A F A A N N I R N M V D N E Q T N D I L G K G D F I K S L L K D N T N S Q L Y S F F F G E G L S T N K A E K E T Q L W G I R G A V Q Q I R N N V N H Y K K D A L K T V F N I S N F E N P T I T D P K Q Q T N Y A D T I Y K A R F I N E L E K I P E A F A Q Q L K T G G A V S Y Y T I E N L K S L L T T F Q F S L C R S T I P F A P G F K K V F N G G I N Y Q N A K Q D E S F Y E L M L E Q Y L R K E N F A E E S Y N A R Y F M L K L I Y N N L F L P G F T T D R K A F A D S V G F V Q M Q N K K Q A E K V N P R K K E A Y A F E A V R P M T A A D S I A D Y M A Y V Q S E L M Q E Q N K K E E K V A E E T R I N F E K F V L Q V F I K G F D S F L R A K E F D F V Q M P Q P Q L T A T A S N Q Q K A D K L N Q L E A S I T A D C K L T P Q Y A K A D D A T H I A F Y V F C K L L D A A H L S N L R N E L I K F R E S V N E F K F H H L L E I I E I C L L S A D V V P T D Y R D L Y S S E A D C L A R L R P F I E Q G A D I T N W S D L F V Q S D K H S P V I H A N I E L S V K Y G T T K L L E Q I I N K D T Q F K T T E A N F T A W N T A Q K S I E Q L I K Q R E D H H E Q W V K A K N A D D K E K Q E R K R E K S N F A Q K F I E K H G D D Y L D I C D Y I N T Y N W L D N K M H F V H L N R L H G L T I E L L G R M A G F V A L F D R D F Q F F D E Q Q I A D E F K L H

10 20 30 40

			GFVNLHSIDKKLNEVPTKKIKEI YDIRNKIIQINGNKINESVRANL IQFISSKRNYYNNAFLHVSNDEI KEKQMYDIRNHIAHFNYLTKDAA DFSLIDLINELRELLHYDRKLKN AVSKAFIDLFDKHGMILKLKLNA DHKLKVESLEPKKIYHLGSSAKD KPEYQYCTNQVMMAYCNMCRSLL EMKK
c2c2−11	9	Listeria weihenstephanensis FSL R9−0317（配列番号40）	MLALLHQEVPSQKLHNLKSLNTE SLTKLFKPKFQNMISYPPSKGAE HVQFCLTDIAVPAIRDLDEIKPD WGIFFEKLKPYTDWAESYIHYKQ TTIQKSIEQNKIQSPDSPRKLVL QKYVTAFLNGEPLGLDLVAKKYK LADLAESFKVVDLNEDKSANYKI KACLQQHQRNILDELKEDPELNQ YGIEVKKYIQRYFPIKRAPNRSK HARADFLKKELIESTVEQQFKNA VYHYVLEQGKMEAYELTDPKTKD LQDIRSGEAFSFKFINACAFASN NLKMILNPECEKDILGKGDFKKN LPNSTTQSDVVKKMIPFFSDEIQ NVNFDEAIWAIRGSIQQIRNEVY HCKKHSWKSILKIKGFEFEPNNM KYTDSDMQKLMDKDIAKIPDFIE EKLKSSGIIRFYSHDKLQSIWEM KQGFSLLTTNAPFVPSFKRVYAK GHDYQTSKNRYYDLGLTTFDILE YGEEDFRARYFLTKLVYYQQFMP WFTADNNAFRDAANFVLRLNKNR QQDAKAFINIREVEEGEMPRDYM GYVQGQIAIHEDSTEDTPNHFEK FISQVFIKGFDSHMRSADLKFIK NPRNQGLEQSEIEEMSFDIKVEP SFLKNKDDYIAFWTFCKMLDARH LSELRNEMIKYDGHLTGEQEIIG LALLGVDSRENDWKQFFSSEREY EKIMKGYVGEELYQREPYRQSDG KTPILFRGVEQARKYGTETVIQR LFDASPEFKVSKCNITEWERQKE

			TIEETIERRKELHNEWEKNPKKP QNNAFFKEYKECCDAIDAYNWHK NKTTLVYVNELHHLLIEILGRYV GYVAIADRDFQCMANQYFKHSGI TERVEYWGDNRLKSIKKLDTFLK KEGLFVSEKNARNHIAHLNYLSL KSECTLLYLSERLREIFKYDRKL KNAVSKSLIDILDRHGMSVVFAN LKENKHRLVIKSLEPKKLRHLGE KKIDNGYIETNQVSEEYCGIVKR LLEI
c2c2−12	10	Listeriaceae細菌FSL M6−0635＝Listeria newyorkensis FSL M6−0635（配列番号41）	MKITKMRVDGRTIVMERTSKEGQ LGYEGIDGNKTTEIIFDKKKESF YKSILNKTVRKPDEKEKNRRKQA INKAINKEITELMLAVLHQEVPS QKLHNLKSLNTESLTKLFKPKFQ NMISYPPSKGAEHVQFCLTDIAV PAIRDLDEIKPDWGIFFEKLKPY TDWAESYIHYKQTTIQKSIEQNK IQSPDSPRKLVLQKYVTAFLNGE PLGLDLVAKKYKLADLAESFKLV DLNEDKSANYKIKACLQQHQRNI LDELKEDPELNQYGIEVKKYIQR YFPIKRAPNRSKHARADFLKKEL IESTVEQQFKNAVYHYVLEQGKM EAYELTDPKTKDLQDIRSGEAFS FKFINACAFASNNLKMILNPECE KDILGKGNFKKNLPNSTTRSDVV KKMIPFFSDELQNVNFDEAIWAI RGSIQQIRNEVYHCKKHSWKSIL KIKGFEFEPNNNMKYADSDMQKLM DKDIAKIPEFIEEKLKSSGVVRF YRHDELQSIWEMKQGFSLLTTNA PFVPSFKRVYAKGHDYQTSKNRY YNLDLTTFDILEYGEEDFRARYF LTKLVYYQQFMPWFTADNNAFRD AANFVLRLNKNRQQDAKAFINIR EVEEGEMPRDYMGYVQGQIAIHE DSIEDTPNHFEKFISQVFIKGFD RHMRSANLKFIKNPRNQGLEQSE IEEMSFDIKVEPSFLKNKDDYIA

10 20 30 40

			F W I F C K M L D A R H L S E L R N E M I K Y D G H L T G E Q E I I G L A L L G V D S R E N D W K Q F F S S E R E Y E K I M K G Y V V E E L Y Q R E P Y R Q S D G K T P I L F R G V E Q A R K Y G T E T V I Q R L F D A N P E F K V S K C N L A E W E R Q K E T I E E T I K R R K E L H N E W A K N P K K P Q N N A F F K E Y K E C C D A I D A Y N W H K N K T T L A Y V N E L H H L L I E I L G R Y V G Y V A I A D R D F Q C M A N Q Y F K H S G I T E R V E Y W G D N R L K S I K K L D T F L K K E G L F V S E K N A R N H I A H L N Y L S L K S E C T L L Y L S E R L R E I F K Y D R K L K N A V S K S L I D I L D R H G M S V V F A N L K E N K H R L V I K S L E P K K L R H L G G K K I D G G Y I E T N Q V S E E Y C G I V K R L L E M
c 2 c 2 － 1 3	1 2	L e p t o t r i c h i a w a d e i F 0 2 7 9 （配列番号４２）	M K V T K V D G I S H K K Y I E E G K L V K S T S E E N R T S E R L S E L L S I R L D I Y I K N P D N A S E E E N R I R R E N L K K F F S N K V L H L K D S V L Y L K N R K E K N A V Q D K N Y S E E D I S E Y D L K N K N S F S V L K K I L L N E D V N S E E L E I F R K D V E A K L N K I N S L K Y S F E E N K A N Y Q K I N E N N V E K V G G K S K R N I I Y D Y Y R E S A K R N D Y I N N V Q E A F D K L Y K K E D I E K L F F L I E N S K K H E K Y K I R E Y Y H K I I G R K N D K E N F A K I I Y E E I Q N V N N I K E L I E K I P D M S E L K K S Q V F Y K Y Y L D K E E L N D K N I K Y A F C H F V E I E M S Q L L K N Y V Y K R L S N I S N D K I K R I F E Y Q N L K K L I E N K L L N K L D T Y V R N C G K Y N Y Y L Q V G E I A T S D F I A R N R Q N E A F L R N I I G V S S V A Y F S L R N I L E T E N E N D I T G R M R G K T V K N N K G E E K Y V S G E V D K I Y N E N K Q N E V K E N L K M F Y S Y D F N M D N K N E I E D F F A N I D E A I S S I R H G I V H F N L E L E G K D I F A F K N I A P S E I S K K M F Q N E I N E K K L K L K I F K Q L N S A N V F N Y Y E K D V I I K Y L K N T K F N F V N K N I P F V P S F T K L Y N K I E D L R N T L K F F

			W S V P K D K E E K D A Q I Y L L K N I Y Y G E F L N K F V K N S K V F F K I T N E V I K I N K Q R N Q K T G H Y K Y Q K F E N I E K T V P V E Y L A I I Q S R E M I N N Q D K E E K N T Y I D F I Q Q I F L K G F I D Y L N K N N L K Y I E S N N N N D N N D I F S K I K I K K D N K E K Y D K I L K N Y E K H N R N K E I P H E I N E F V R E I K L G K I L K Y T E N L N M F Y L I L K L L N H K E L T N L K G S L E K Y Q S A N K E E T F S D E L E L I N L L N L D N N R V T E D F E L E A N E I G K F L D F N E N K I K D R K E L K K F D T N K I Y F D G E N I I K H R A F Y N I K K Y G M L N L L E K I A D K A K Y K I S L K E L K E Y S N K K N E I E K N Y T M Q Q N L H R K Y A R P K K D E K F N D E D Y K E Y E K A I G N I Q K Y T H L K N K V E F N E L N L L Q G L L L K I L H R L V G Y T S I W E R D L R F R L K G E F P E N H Y I E E I F N F D N S K N V K Y K S G Q I V E K Y I N F Y K E L Y K D N V E K R S I Y S D K K V K K L K Q E K K D L Y I R N Y I A H F N Y I P H A E I S L L E V L E N L R K L L S Y D R K L K N A I M K S I V D I L K E Y G F V A T F K I G A D K K I E I Q T L E S E K I V H L K N L K K K K L M T D R N S E E L C E L V K V M F E Y K A L E
c 2 c 2 － 1 4	1 5	R h o d o b a c t e r c a p s u l a t u s S B 1 0 0 3 （配列番号４３）	M Q I G K V Q G R T I S E F G D P A G G L K R K I S T D G K N R K E L P A H L S S D P K A L I G Q W I S G I D K I Y R K P D S R K S D G K A I H S P T P S K M Q F D A R D D L G E A F W K L V S E A G L A Q D S D Y D Q F K R R L H P Y G D K F Q P A D S G A K L K F E A D P P E P Q A F H G R W Y G A M S K R G N D A K E L A A A L Y E H L H V D E K R I D G Q P K R N P K T D K F A P G L V V A R A L G I E S S V L P R G M A R L A R N W G E E E I Q T Y F V V D V A A S V K E V A K A A V S A A Q A F D P P R Q V S G R S L S P K V G F A L A E H L E R V T G S K R C S F D P A A G P S V L A L H D E V K K T Y K R L C A R G K N A A R A F P A D K T E L L A L M R H T H E N R V R N Q M V R M G R V S E Y

			R G Q Q A G D L A Q S H Y W T S A G Q T E I K E S E I F V R L W V G A F A L A G R S M K A W I D P M G K I V N T E K N D R D L T A A V N I R Q V I S N K E M V A E A M A R R G I Y F G E T P E L D R L G A E G N E G F V F A L L R Y L R G C R N Q T F H L G A R A G F L K E I R K E L E K T R W G K A K E A E H V V L T D K T V A A I R A I I D N D A K A L G A R L L A D L S G A F V A H Y A S K E H F S T L Y S E I V K A V K D A P E V S S G L P R L K L L L K R A D G V R G Y V H G L R D T R K H A F A T K L P P P P A P R E L D D P A T K A R Y I A L L R L Y D G P F R A Y A S G I T G T A L A G P A A R A K E A A T A L A Q S V N V T K A Y S D V M E G R T S R L R P P N D G E T L R E Y L S A L T G E T A T E F R V Q I G Y E S D S E N A R K Q A E F I E N Y R R D M L A F M F E D Y I R A K G F D W I L K I E P G A T A M T R A P V L P E P I D T R G Q Y E H W Q A A L Y L V M H F V P A S D V S N L L H Q L R K W E A L Q G K Y E L V Q D G D A T D Q A D A R R E A L D L V K R F R D V L V L F L K T G E A R F E G R A A P F D L K P F R A L F A N P A T F D R L F M A T P T T A R P A E D D P E G D G A S E P E L R V A R T L R G L R Q I A R Y N H M A V L S D L F A K H K V R D E E V A R L A E I E D E T Q E K S Q I V A A Q E L R T D L H D K V M K C H P K T I S P E E R Q S Y A A A I K T I E E H R F L V G R V Y L G D H L R L H R L M M D V I G R L I D Y A G A Y E R D T G T F L I N A S K Q L G A G A D W A V T I A G A A N T D A R T Q T R K D L A H F N V L D R A D G T P D L T A L V N R A R E M M A Y D R K R K N A V P R S I L D M L A R L G L T L K W Q M K D H L L Q D A T I T Q A A I K H L D K V R L T V G G P A A V T E A R F S Q D Y L Q M V A A V F N G S V Q N P K P R R R D D G D A W H K P P K P A T A Q S Q P D Q K P P N K A P S A G S R L P P P Q V G E V Y E G V V V K V I D T G S L G F L A V E G V A G N I G L H I S R L R R I R E D A I I V G R R Y R F R V E I Y V P P K S N T S K L N A A D L V R I D

10 20 30 40

c2c2−15	16	Rhodobacter capsulatus R121（配列番号４４）	MQIGKVQGRTISEFGDPAGGLKR KISTDGKNRKELPAHLSSDPKAL IGQWISGIDKIYRKPDSRKSDGK AIHSPTPSKMQFDARDDLGEAFW KLVSEAGLAQDSDYDQFKRRLHP YGDKFQPADSGAKLKFEADPPEP QAFHGRWYGAMSKRGNDAKELAA ALYEHLHVDEKRIDGQPKRNPKT DKFAPGLVVARALGIESSVLPRG MARLARNWGEEEIQTYFVVDVAA SVKEVAKAAVSAAQAFDPPRQVS GRSLSPKVGFALAEHLERVTGSK RCSFDPAAGPSVLALHDEVKKTY KRLCARGKNAARAFPADKTELLA LMRHTHENRVRNQMVRMGRVSEY RGQQAGDLAQSHYWTSAGQTEIK ESEIFVRLWVGAFALAGRSMKAW IDPMGKIVNTEKNDRDLTAAVNI RQVISNKEMVAEAMARRGIYFGE TPELDRLGAEGNEGFVFALLRYL RGCRNQTFHLGARAGFLKEIRKE LEKTRWGKAKEAEHVVLTDKTVA AIRAIIDNDAKALGARLLADLSG AFVAHYASKEHFSTLYSEIVKAV KDAPEVSSGLPRLKLLLKRADGV RGYVHGLRDTRKHΛFΛTKLPPPP APRELDDPATKARYIALLRLYDG PFRΛYΛSGITGTΛLΛGPΛΛRΛKE AATALAQSVNVTKAYSDVMEGRS SRLRPPNDGETLREYLSALTGET ATEFRVQIGYESDSENARKQAEF IENYRRDMLAFMFEDYIRAKGFD WILKIEPGATAMTRAPVLPEPID TRGQYEHWQAALYLVMHFVPASD VSNLLHQLRKWEALQGKYELVQD GDATDQADARREALDLVKRFRDV LVLFLKTGEARFEGRAAPFDLKP FRALFANPATFDRLFMATPTTAR PAEDDPEGDGASEPELRVARTLR GLRQIARYNHMAVLSDLFAKHKV RDEEVARLAEIEDETQEKSQIVA

10 20 30 40

			AQELRTDLHDKVMKCHPKTISPE ERQSYAAAIKTIEEHRFLVGRVY LGDHLRLHRLMMDVIGRLIDYAG AYERDTGTFLINASKQLGAGADW AVTIAGAANTDARTQTRKDLAHF NVLDRADGTPDLTALVNRARERMM AYDRKRKNAVPRSILDMLARLGL TLKWQMKDHLLQDATITQAAIKH LDKVRLTVGGPAAVTEARFSQDY LQMVAAVFNGSVQNPKPRRRDDG DAWHKPPKPATAQSQPDQKPPNK APSAGSRLPPPQVGEVYEGVVVK VIDTGSLGFLAVEGVAGNIGLHI SRLRRIREDAIIVGRRYRFRVEI YVPPKSNTSKLNAADLVRID
c2c2-16	17	Rhodobacter capsulatus DE442（配列番号45）	MQIGKVQGRTISEFGDPAGGLKR KISTDGKNRKELPAHLSSDPKAL IGQWISGIDKIYRKPDSRKSDGK AIHSPTPSKMQFDARDDLGEAFW KLVSEAGLAQDSDYDQFKRRLHP YGDKFQPADSGAKLKFEADPPEP QΛFHGRWYGΛMSKRGNDΛKELΛΛ ALYEHLHVDEKRIDGQPKRNPKT DKFAPGLVVARALGIESSVLPRG MARLARNWGEEEIQTYFVVDVAA SVKEVAKAAVSAAQAFDPPRQVS GRSLSPKVGFALAEHLERVTGSK RCSFDPAAGPSVLALHDEVKKTY KRLCARGKNAARAFPADKTELLA LMRHTHENRVRNQMVRMGRVSEY RGQQAGDLAQSHYWTSAGQTEIK ESEIFVRLWVGAFALAGRSMKAW IDPMGKIVNTEKNDRDLTAAVNI RQVISNKEMVAEAMARRGIYFGE TPELDRLGAEGNEGFVFALLRYL RGCRNQTFHLGARAGFLKEIRKE LEKTRWGKAKEAEHVVLTDKTVA AIRAIIDNDAKALGARLLADLSG AFVAHYASKEHFSTLYSEIVKAV KDAPEVSSGLPRLKLLLKRADGV RGYVHGLRDTRKHAFATKLPPPP

10 20 30 40

			A P R E L D D P A T K A R Y I A L L R L Y D G P F R A Y A S G I T G T A L A G P A A R A K E A A T A L A Q S V N V T K A Y S D V M E G R S S R L R P P N D G E T L R E Y L S A L T G E T A T E F R V Q I G Y E S D S E N A R K Q A E F I E N Y R R D M L A F M F E D Y I R A K G F D W I L K I E P G A T A M T R A P V L P E P I D T R G Q Y E H W Q A A L Y L V M H F V P A S D V S N L L H Q L R K W E A L Q G K Y E L V Q D G D A T D Q A D A R R E A L D L V K R F R D V L V L F L K T G E A R F E G R A A P F D L K P F R A L F A N P A T F D R L F M A T P T T A R P A E D D P E G D G A S E P E L R V A R T L R G L R Q I A R Y N H M A V L S D L F A K H K V R D E E V A R L A E I E D E T Q E K S Q I V A A Q E L R T D L H D K V M K C H P K T I S P E E R Q S Y A A A I K T I E E H R F L V G R V Y L G D H L R L H R L M M D V I G R L I D Y A G A Y E R D T G T F L I N A S K Q L G A G A D W A V T I A G A A N T D A R T Q T R K D L A H F N V L D R A D G T P D L T A L V N R A R E M M A Y D R K R K N A V P R S I L D M L A R L G L T L K W Q M K D H L L Q D A T I T Q A A I K H L D K V R L T V G G P A A V T E A R F S Q D Y L Q M V A A V F N G S V Q N P K P R R R D D G D A W H K P P K P A T A Q S Q P D Q K P P N K A P S A G S R L P P P Q V G E V Y E G V V V K V I D T G S L G F L A V E G V A G N I G L H I S R L R R I R E D A I I V G R R Y R F R V E I Y V P P K S N T S K L N A A D L V R I D
c 2 c 2 － 2		（配列番号４６）	M G N L F G H K R W Y E V R D K K D F K I K R K V K V K R N Y D G N K Y I L N I N E N N N K E K I D N N K F I R K Y I N Y K K N D N I L K E F T R K F H A G N I L F K L K G K E G I I R I E N N D D F L E T E E V V L Y I E A Y G K S E K L K A L G I T K K K I I D E A I R Q G I T K D D K K I E I K R Q E N E E E I E I D I R D E Y T N K T L N D C S I I L R I I E N D E L E T K K S I Y E I F K N I N M S L Y K I I E K I I E N E T E K V F E N R Y Y E E H L R E K L L K D D K I D V I L T N F M E I R E K I K S N L

			E I L G F V K F Y L N V G G D K K K S K N K K M L V E K I L N I N V D L T V E D I A D F V I K E L E F W N I T K R I E K V K K V N N E F L E K R R N R T Y I K S Y V L L D K H E K F K I E R E N K K D K I V K F F V E N I K N N S I K E K I E K I L A E F K I D E L I K K L E K E L K K G N C D T E I F G I F K K H Y K V N F D S K K F S K K S D E E K E L Y K I I Y R Y L K G R I E K I L V N E Q K V R L K K M E K I E I E K I L N E S I L S E K I L K R V K Q Y T L E H I M Y L G K L R H N D I D M T T V N T D D F S R L H A K E E L D L E L I T F F A S T N M E L N K I F S R E N I N N D E N I D F F G G D R E K N Y V L D K K I L N S K I K I I R D L D F I D N K N N I T N N F I R K F T K I G T N E R N R I L H A I S K E R D L Q G T Q D D Y N K V I N I I Q N L K I S D E E V S K A L N L D V V F K D K K N I I T K I N D I K I S E E N N N D I K Y L P S F S K V L P E I L N L Y R N N P K N E P F D T I E T E K I V L N A L I Y V N K E L Y K K L I L E D D L E E N E S K N I F L Q E L K K T L G N I D E I D E N I I E N Y Y K N A Q I S A S K G N N K A I K K Y Q K K V I E C Y I G Y L R K N Y E E L F D F S D F K M N I Q E I K K Q I K D I N D N K T Y E R I T V K T S D K T I V I N D D F E Y I I S I F Λ L L N S N Λ V I N K I R N R F F A T S V W L N T S E Y Q N I I D I L D E I M Q L N T L R N E C I T E N W N L N L E E F I Q K M K E I E K D F D D F K I Q T K K E I F N N Y Y E D I K N N I L T E F K D D I N G C D V L E K K L E K I V I F D D E T K F E I D K K S N I L Q D E Q R K L S N I N K K D L K K K V D Q Y I K D K D Q E I K S K I L C R I I F N S D F L K K Y K K E I D N L I E D M E S E N E N K F Q E I Y Y P K E R K N E L Y I Y K K N L F L N I G N P N F D K I Y G L I S N D I K M A D A K F L F N I D G K N I R K N K I S E I D A I L K N L N D K L N G Y S K E Y K E K Y I K K L K E N D D F F A K N I Q N K N Y K S F E K D Y N R V S E Y K K I R D L V E F N Y L N K I E S Y L I D I N W K L A I Q M A R F E

10 20 30 40

			RDMHYIVNGLRELGIIKLSGYNT GISRAYPKRNGSDGFYTTTAYYK FFDEESYKKFEKICYGFGIDLSE NSEINKPENESIRNYISHFYIVR NPFADYSIAEQIDRVSNLLSYST RYNNSTYASVFEVFKKDVNLDYD ELKKKFKLIGNNDILERLMKPKK VSVLELESYNSDYIKNLIIELLT KIENTNDTL
c2c2-3		Lwade i (Lw2)(配列番号47)	MKVTKVDGISHKKYIEEGKLVKS TSEENRTSERLSELLSIRLDIYI KNPDNASEEENRIRRENLKKFFS NKVLHLKDSVLYLKNRKEKNAVQ DKNYSEEDISEYDLKNKNSFSVL KKILLNEDVNSEELEIFRKDVEA KLNKINSLKYSFEENKANYQKIN ENNVEKVGGKSKRNIIYDYYRES AKRNDYINNVQEAFDKLYKKEDI EKLFFLIENSKKHEKYKIREYYH KIIGRKNDKENFAKIIYEEIQNV NNIKELIEKIPDMSELKKSQVFY KYYLDKEELNDKNIKYAFCHFVE IEMSQLLKNYVYKRLSNISNDKI KRIFEYQNLKKLIENKLLNKLDT YVRNCGKYNYYLQVGEIATSDFI ARNRQNEAFLRNIIGVSSVAYFS LRNILETENENDITGRMRGKTVK NNKGEEKYVSGEVDKIYNENKQN EVKENLKMFYSYDFNMDNKNEIE DFFANIDEAISSIRHGIVHFNLE LEGKDIFAFKNIAPSEISKKMFQ NEINEKKLKLKIFKQLNSANVFN YYEKDVIIKYLKNTKFNFVNKNI PFVPSFTKLYNKIEDLRNTLKFF WSVPKDKEEKDAQIYLLKNIYYG EFLNKFVKNSKVFFKITNEVIKI NKQRNQKTGHYKYQKFENIEKTV PVEYLAIIQSREMINNQDKEEKN TYIDFIQQIFLKGFIDYLNKNNL KYIESNNNNDNNDIFSKIKIKKD NKEKYDKILKNYEKHNRNKEIPH

			EINEFVREIKLGKILKYTENLNM FYLILKLLNHKELTNLKGSLEKY QSANKEETFSDELELINLLNLDN NRVTEDFELEANEIGKFLDFNEN KIKDRKELKKFDTNKIYFDGENI IKHRAFYNIKKYGMLNLLEKIAD KAKYKISLKELKEYSNKKNEIEK NYTMQQNLHRKYARPKKDEKFND EDYKEYEKAIGNIQKYTHLKNKV EFNELNLLQGLLLKILHRLVGYT SIWERDLRFRLKGEFPENHYIEE IFNFDNSKNVKYKSGQIVEKYIN FYKELYKDNVEKRSIYSDKKVKK LKQEKKDLYIRNYIAHFNYIPHA EISLLEVLENLRKLLSYDRKLKN AIMKSIVDILKEYGFVATFKIGA DKKIEIQTLESEKIVHLKNLKKK KLMTDRNSEELCELVKVMFEYKA LEKRPAATKKAGQAKKKKGSYPY DVPDYAYPYDVPDYAYPYDVPDY A*
c2c2－4		Listeria seeligeri（配列番号48）	MWISIKTLIHHLGVLFFCDYMYN RREKKIIEVKTMRITKVEVDRKK VLISRDKNGGKLVYENEMQDNTE QIMHHKKSSFYKSVVNKTICRPE QKQMKKLVHGLLQENSQEKIKVS DVTKLNISNFLNHRFKKSLYYFP ENSPDKSEEYRIEINLSQLLEDS LKKQQGTFICWESFSKDMELYIN WAENYISSKTKLIKKSIRNNRIQ STESRSGQLMDRYMKDILNKNKP FDIQSVSEKYQLEKLTSALKATF KEAKKNDKEINYKLKSTLQNHER QIIEELKENSELNQFNIEIRKHL ETYFPIKKTNRKVGDIRNLEIGE IQKIVNHRLKNKIVQRILQEGKL ASYEIESTVNSNSLQKIKIEEAF ALKFINACLFASNNLRNMVYPVC KKDILMIGEFKNSFKEIKHKKFI RQWSQFFSQEITVDDIELASWGL RGAIAPIRNEIIHLKKHSWKKFF

10 20 30 40

			NNPTFKVKKSKIINGKTKDVTSE FLYKETLFKDYFYSELDSVPELI INKMESSKILDYYSSDQLNQVFT IPNFELSLLTSAVPFAPSFKRVY LKGFDYQNQDEAQPDYNLKLNIY NEKAFNSEAFQAQYSLFKMVYYQ VFLPQFTTNNDLFKSSVDFILTL NKERKGYAKAFQDIRKMNKDEKP SEYMSYIQSQLMLYQKKQEEKEK INHFEKFINQVFIKGFNSFIEKN RLTYICHPTKNTVPENDNIEIPF HTDMDDSNIAFWLMCKLLDAKQL SELRNEMIKFSCSLQSTEEISTF TKAREVIGLALLNGEKGCNDWKE LFDDKEAWKKNMSLYVSEELLQS LPYTQEDGQTPVINRSIDLVKKY GTETILEKLFSSSDDYKVSAKDI AKLHEYDVTEKIAQQESLHKQWI EKPGLARDSAWTKKYQNVINDIS NYQWAKTKVELTQVRHLHQLTID LLSRLAGYMSIADRDFQFSSNYI LERENSEYRVTSWILLSENKNKN KYNDYELYNLKNASIKVSSKNDP QLKVDLKQLRLTLEYLELFDNRL KEKRNNISHFNYLNGQLGNSILE LFDDARDVLSYDRKLKNAVSKSL KEILSSHGMEVTFKPLYQTNHHL KIDKLQPKKIHHLGEKSTVSSNQ VSNEYCQLVRTLLTMK
C2-17		Leptotrichia buccalis C-1013-b（配列番号49）	MKVTKVGGISHKKYTSEGRLVKS ESEENRTDERLSALLNMRLDMYI KNPSSTETKENQKRIGKLKKFFS NKMVYLKDNTLSLKNGKKENIDR EYSETDILESDVRDKKNFAVLKK IYLNENVNSEELEVFRNDIKKKL NKINSLKYSFEKNKANYQKINEN NIEKVEGKSKRNIIYDYYRESAK RDAYVSNVKEAFDKLYKEEDIAK LVLEIENLTKLEKYKIREFYHEI IGRKNDKENFAKIIYEEIQNVNN

			MKELIEKVPDMSELKKSQVFYKY YLDKEELNDKNIKYAFCHFVEIE MSQLLKNYVYKRLSNISNDKIKR IFEYQNLKKLIENKLLNKLDTYV RNCGKYNYYLQDGEIATSDFIAR NRQNEAFLRNIIGVSSVAYFSLR NILETENENDITGRMRGKTVKNN KGEEKYVSGEVDKIYNENKKNEV KENLKMFYSYDFNMDNKNEIEDF FANIDEAISSIRHGIVHFNLELE GKDIFAFKNIAPSEISKKMFQNE INEKKLKLKIFRQLNSANVFRYL EKYKILNYLKRTRFEFVNKNIPF VPSFTKLYSRIDDLKNSLGIYWK TPKTNDDNKTKEIIDAQIYLLKN IYYGEFLNYFMSNNGNFFEISKE IIELNKNDKRNLKTGFYKLQKFE DIQEKIPKEYLANIQSLYMINAG NQDEEEKDTYIDFIQKIFLKGFM TYLANNGRLSLIYIGSDEETNTS LAEKKQEFDKFLKKYEQNNNIKI PYEINEFLREIKLGNILKYTERL NMFYLILKLLNHKELTNLKGSLE KYQSANKEEAFSDQLELINLLNL DNNRVTEDFELEADEIGKFLDFN GNKVKDNKELKKFDTNKIYFDGE NIIKHRAFYNIKKYGMLNLLEKI ΛDKΛGYKISIEELKKYSNKKNEI EKNHKMQENLHRKYARPRKDEKF TDEDYESYKQAIENIEEYTHLKN KVEFNELNLLQGLLLRILHRLVG YTSIWERDLRFRLKGEFPENQYI EEIFNFENKKNVKYKGGQIVEKY IKFYKELHQNDEVKINKYSSANI KVLKQEKKDLYIRNYIAHFNYIP HAEISLLEVLENLRKLLSYDRKL KNAVMKSVVDILKEYGFVATFKI GADKKIGIQTLESEKIVHLKNLK KKKLMTDRNSEELCKLVKIMFEY KMEEKKSEN
C 2		Herb	MKLTRRRISGNSVDQKITAAFYR

－１８		inix hemicellulosilytica（配列番号５０）	DMSQGLLYYDSEDNDCTDKVIES MDFERSWRGRILKNGEDDKNPFY MFVKGLVGSNDKIVCEPIDVDSD PDNLDILINKNLTGFGRNLKAPD SNDTLENLIRKIQAGIPEEEVLP ELKKIKEMIQKDIVNRKEQLLKS IKNNRIPFSLEGSKLVPSTKKMK WLFKLIDVPNKTFNEKMLEKYWE IYDYDKLKANITNRLDKTDKKAR SISRAVSEELREYHKNLRTNYNR FVSGDRPAAGLDNGGSAKYNPDK EEFLLFLKEVEQYFKKYFPVKSK HSNKSKDKSLVDKYKNYCSYKVV KKEVNRSIINQLVAGLIQQGKLL YYFYYNDTWQEDFLNSYGLSYIQ VEEAFKKSVMTSLSWGINRLTSF FIDDSNTVKFDDITTKKAKEAIE SNYFNKLRTCSRMQDHFKEKLAF FYPVYVKDKKDRPDDDIENLIVL VKNAIESVSYLRNRTFHFKESSL LELLKELDDKNSGQNKIDYSVAA EFIKRDIENLYDVFREQIRSLGI AEYYKADMISDCFKTCGLEFALY SPKNSLMPAFKNVYKRGANLNKA YIRDKGPKETGDQGQNSYKALEE YRELTWYIEVKNNDQSYNAYKNL LQLIYYHAFLPEVRENEALITDF INRTKEWNRKETEERLNTKNNKK HKNFDENDDITVNTYRYESIPDY QGESLDDYLKVLQRKQMARAKEV NEKEEGNNNYIQFIRDVVVWAFG AYLENKLKNYKNELQPPLSKENI GLNDTLKELFPEEKVKSPFNIKC RFSISTFIDNKGKSTDNTSAEAV KTDGKEDEKDKKNIKRKDLLCFY LFLRLLDENEICKLQHQFIKYRC SLKERRFPGNRTKLEKETELLAE LEELMELVRFTMPSIPEISAKAE SGYDTMIKKYFKDFIEKKVFKNP KTSNLYYHSDSKTPVTRKYMALL MRSAPLHLYKDIFKGYYLITKKE

10 20 30 40

			CLEYIKLSNIIKDYQNSLNELHE QLERIKLKSEKQNGKDSLYLDKK DFYKVKEYVENLEQVARYKHLQH KINFESLYRIFRIHVDIAARMVG YTQDWERDMHFLFKALVYNGVLE ERRFEAIFNNNNDDNNDGRIVKKI QNNLNNKNRELVSMLCWNKKLNK NEFGAIIWKRNPIAHLNHFTQTE QNSKSSLESLINSLRILLAYDRK RQNAVTKTINDLLLNDYHIRIKW EGRVDEGQIYFNIKEKEDIENEP IIHLKHLHKKDCYIYKNSYMFDK QKEWICNGIKEEVYDKSILKCIG NLFKFDYEDKNKSSANPKHT
C2-19		［Eubacterium］rectale（配列番号51）	MLRRDKEVKKLYNVFNQIQVGTK PKKWNNDEKLSPEENERRAQQKN IKMKNYKWREACSKYVESSQRII NDVIFYSYRKAKNKLRYMRKNED ILKKMQEAEKLSKFSGGKLEDFV AYTLRKSLVVSKYDTQEFDSLAA MVVFLECIGKNNISDHERREIVCK LLELIRKDFSKLDPNVKGSQGAN IVRSVRNQNMIVQPQGDRFLFPQ VYAKENETVTNKNVEKEGLNEFL LNYANLDDEKRAESLRKLRRILD VYFSAPNHYEKDMDITLSDNIEK EKFNVWEKHECGKKETGLFVDIP DVLMEAEAENIKLDAVVEKRERK VLNDRVRKQNIICYRYTRAVVEK YNSNEPLFFENNAINQYWIHHIE NAVERILKNCKAGKLFKLRKGYL AEKVWKDAINLISIKYIALGKAV YNFALDDIWKDKKNKELGIVDER IRNGITSFDYEMIKAHENLQRDL AVDIAFSVNNLARAVCDMSNLGN KESDFLLWKRNDIADKLKNKDDM ASVSAVLQFFGGKSSWDINIFKD AYKGKKKYNYEVRFIDDLRKAIY CARNENFHFKTALVNDEKWNTEL FGKIFERETEFCLNVEKDRFYSN NLYMFYQVSELRNMLDHLYSRSV

10 20 30 40

			S R A A Q V P S Y N S V I V R T A F P E Y I T N V L G Y Q K P S Y D A D T L G K W Y S A C Y Y L L K E I Y Y N S F L Q S D R A L Q L F E K S V K T L S W D D K K Q Q R A V D N F K D H F S D I K S A C T S L A Q V C Q I Y M T E Y N Q Q N N Q I K K V R S S N D S I F D Q P V Y Q H Y K V L L K K A I A N A F A D Y L K N N K D L F G F I G K P F K A N E I R E I D K E Q F L P D W T S R K Y E A L C I E V S G S Q E L Q K W Y I V G K F L N A R S L N L M V G S M R S Y I Q Y V T D I K R R A A S I G N E L H V S V H D V E K V E K W V Q V I E V C S L L A S R T S N Q F E D Y F N D K D D Y A R Y L K S Y V D F S N V D M P S E Y S A L V D F S N E E Q S D L Y V D P K N P K V N R N I V H S K L F A A D H I L R D I V E P V S K D N I E E F Y S Q K A E I A Y C K I K G K E I T A E E Q K A V L K Y Q K L K N R V E L R D I V E Y G E I I N E L L G Q L I N W S F M R E R D L L Y F Q L G F H Y D C L R N D S K K P E G Y K N I K V D E N S I K D A I L Y Q I I G M Y V N G V T V Y A P E K D G D K L K E Q C V K G G V G V K V S A F H R Y S K Y L G L N E K T L Y N A G L E I F E V V A E H E D I I N L R N G I D H F K Y Y L G D Y R S M L S I Y S E V F D R F F T Y D I K Y Q K N V L N L L Q N I L L R H N V I V E P I L E S G F K T I G E Q T K P G A K L S I R S I K S D T F Q Y K V K G G T L I T D A K D E R Y L E T I R K I L Y Y A E N E E D N L K K S V V V T N A D K Y E K N K E S D D Q N K Q K E K K N K D N K G K K N E E T K S D A E K N N N E R L S Y N P F A N L N F K L S N
C 2 － 2 0		E u b a c t e r i a c e a e 細菌 C H K C I 0 0 4 （配列番号５２）	M K I S K E S H K R T A V A V M E D R V G G V V Y V P G G S G I D L S N N L K K R S M D T K S L Y N V F N Q I Q A G T A P S E Y E W K D Y L S E A E N K K R E A Q K M I Q K A N Y E L R R E C E D Y A K K A N L A V S R I I F S K K P K K I F S D D D I I S H M K K Q R L S K F K G R M E D F V L I A L R K S L V V S T Y N Q E V F D S R K A A T V F L K N I G K K N I S A D D E R Q I K Q L M A L I R E D Y D K W N P D K D

			S S D K K E S S G T K V I R S I E H Q N M V I Q P E K N K L S L S K I S N V G K K T K T K Q K E K A G L D A F L K E Y A Q I D E N S R M E Y L K K L R R L L D T Y F A A P S S Y I K G A A V S L P E N I N F S S E L N V W E R H E A A K K V N I N F V E I P E S L L N A E Q N N N K I N K V E Q E H S L E Q L R T D I R R R N I T C Y H F A N A L A A D E R Y H T L F F E N M A M N Q F W I H H M E N A V E R I L K K C N V G T L F K L R I G Y L S E K V W K D M L N L L S I K Y I A L G K A V Y H F A L D D I W K A D I W K D A S D K N S G K I N D L T L K G I S S F D Y E M V K A Q E D L Q R E M A V G V A F S T N N L A R V T C K M D D L S D A E S D F L L W N K E A I R R H V K Y T E K G E I L S A I L Q F F G G R S L W D E S L F E K A Y S D S N Y E L K F L D D L K R A I Y A A R N E T F H F K T A A I D G G S W N T R L F G S L F E K E A G L C L N V E K N K F Y S N N L V L F Y K Q E D L R V F L D K L Y G K E C S R A A Q I P S Y N T I L P R K S F S D F M K Q L L G L K E P V Y G S A I L D Q W Y S A C Y Y L F K E V Y Y N L F L Q D S S A K A L F E K A V K A L K G A D K K Q E K A V E S F R K R Y W E I S K N A S L A E I C Q S Y I T E Y N Q Q N N K E R K V R S A N D G M F N E P I Y Q H Y K M L L K E A L K M A F A S Y I K N D K E L K F V Y K P T E K L F E V S Q D N F L P N W N S E K Y N T L I S E V K N S P D L Q K W Y I V G K F M N A R M L N L L L G S M R S Y L Q Y V S D I Q K R A A G L G E N Q L H L S A E N V G Q V K K W I Q V L E V C L L L S V R I S D K F T D Y F K D E E E Y A S Y L K E Y V D F E D S A M P S D Y S A L L A F S N E G K I D L Y V D A S N P K V N R N I I Q A K L Y A P D M V L K K V V K K I S Q D E C K E F N E K K E Q I M Q F K N K G D E V S W E E Q Q K I L E Y Q K L K N R V E L R D L S E Y G E L I N E L L G Q L I N W S Y L R E R D L L Y F Q L G F H Y S C L M N E S K K P D A Y K T I R R G T V S I E N A V L Y Q I I A M Y I N G F P V Y A P E K G E L K P Q C K T G S A G Q K I

			RAFCQWASMVEKKKYELYNAGLE LFEVVKEHDNIIDLRNKIDHFKY YQGNDSILALYGEIFDRFFTYDM KYRNNVLNHLQNILLRHNVIIKP IISKDKKEVGRGKMKDRAAFLLE EVSSDRFTYKVKEGERKIDAKNR LYLETVRDILYFPNRAVNDKGED VIICSKKAQDLNEKKADRDKNHD KSKDTNQKKEGKNQEEKSENKEP YSDRMTWKPFAGIKLE
C2－21		Blautia sp. Marseille－P2398（配列番号53）	MKISKVDHVKSGIDQKLSSQRGM LYKQPQKKYEGKQLEEHVRNLSR KAKALYQVFPVSGNSKMEKELQI INSFIKNILLRLDSGKTSEEIVG YINTYSVASQISGDHIQELVDQH LKESLRKYTCVGDKRIYVPDIIV ALLKSKFNSETLQYDNSELKILI DFIREDYLKEKQIKQIVHSIENN STPLRIAEINGQKRLIPANVDNP KKSYIFEFLKEYAQSDPKGQESL LQHMRYLILLYLYGPDKITDDYC EEIEAWNFGSIVMDNEQLFSEEA SMLIQDRIYVNQQIEEGRQSKDT AKVKKNKSKYRMLGDKIEHSINE SVVKHYQEACKAVEEKDIPWIKY ISDHVMSVYSSKNRVDLDKLSLP YLAKNTWNTWISFIAMKYVDMGK GVYHFAMSDVDKVGKQDNLIIGQ IDPKFSDGISSFDYERIKAEDDL HRSMSGYIAFAVNNFARAICSDE FRKKNRKEDVLTVGLDEIPLYDN VKRKLLQYFGGASNWDDSIIDII DDKDLVACIKENLYVARNVNFHF AGSEKVQKKQDDILEEIVRKETR DIGKHYRKVFYSNNVAVFYCDED IIKLMNHLYQREKPYQAQIPSYN KVISKTYLPDLIFMLLKGKNRTK ISDPSIMNMFRGTFYFLLKEIYY NDFLQASNLKEMFCEGLKNNVKN KKSEKPYQNFMRRFEELENMGMD FGEICQQIMTDYEQQNKQKKKTA

10 20 30 40

			TAVMSEKDKKIRTLDNDTQKYKH FRTLLYIGLREAFIIYLKDEKNK EWYEFLREPVKREQPEEKEFVNK WKLNQYSDCSELILKDSLAAAWY VVAHFINQAQLNHLIGDIKNYIQ FISDIDRRAKSTGNPVSESTEIQ IERYRKILRVLEFAKFFCGQITN VLTDYYQDENDFSTHVGHYVKFE KKNMEPAHALQAFSNSLYACGKE KKKAGFYYDGMNPIVNRNITLAS MYGNKKLLENAMNPVTEQDIRKY YSLMAELDSVLKNGAVCKSEDEQ KNLRHFQNLKNRIELVDVLTLSE LVNDLVAQLIGWVYIRERDMMYL QLGLHYIKLYFTDSVAEDSYLRT LDLEEGSIADGAVLYQIASLYSF NLPMYVKPNKSSVYCKKHVNSVA TKFDIFEKEYCNGDETVIENGLR LFENINLHKDMVKFRDYLAHFKY FAKLDESILELYSKAYDFFFSYN IKLKKSVSYVLTNVLLSYFINAK LSFSTYKSSGNKTVQHRTTKISV VAQTDYFTYKLRSIVKNKNGVES IENDDRRCEVVNIAARDKEFVDE VCNVINYNSDK
C2-22		Leptotrichia sp.オーラルタクソン879 str.F0557（配列番号54）	MGNLFGHKRWYEVRDKKDFKIKR KVKVKRNYDGNKYILNINENNNK EKIDNNKFIGEFVNYKKNNNVLK EFKRKFHAGNILFKLKGKEEIIR IENNDDFLETEEVVLYIEVYGKS EKLKALEITKKKIIDEAIRQGIT KDDKKIEIKRQENEEEIEIDIRD EYTNKTLNDCSIILRIIENDELE TKKSIYEIFKNINMSLYKIIEKI IENETEKVFENRYYEEHLREKLL KDNKIDVILTNFMEIREKIKSNL EIMGFVKFYLNVSGDKKKSENKK MFVEKILNTNVDLTVEDIVDFIV KELKFWNITKRIEKVKKFNNEFL ENRRNRTYIKSYVLLDKHEKFKI ERENKKDKIVKFFVENIKNNSIK

			EKIEKILAEFKINELIKKLEKEL KKGNCDTEIFGIFKKHYKVNFDS KKFSNKSDEEKELYKIIYRYLKG RIEKILVNEQKVRLKKMEKIEIE KILNESILSEKILKRVKQYTLEH IMYLGKLRHNDIVKMTVNTDDFS RLHAKEELDLELITFFASTNMEL NKIFNGKEKVTDFFGFNLNGQKI TLKEKVPSFKLNILKKLNFINNE NNIDEKLSHFYSFQKEGYLLRNK ILHNSYGNIQETKNLKGEYENVE KLIKELKVSDEEISKSLSLDVIF EGKVDIINKINSLKIGEYKDKKY LPSFSKIVLEITRKFREINKDKL FDIESEKIILNAVKYVNKILYEK ITSNEENEFLKTLPDKLVKKSNN KKENKNLLSIEEYYKNAQVSSSK GDKKAIKKYQNKVTNAYLEYLEN TFTEIIDFSKFNLNYDEIKTKIE ERKDNKSKIIIDSISTNINITND IEYIISIFALLNSNTYINKIRNR FFATSVWLEKQNGTKEYDYENII SILDEVLLINLLRENNITDILDL KNAIIDAKIVENDETYIKNYIFE SNEEKLKKRLFCEELVDKEDIRK IFEDENFKFKSFIKKNEIGNFKI NFGILSNLECNSEVEAKKIIGKN SKKLESFIQNIIDEYKSNIRTLF SSEFLEKYKEEIDNLVEDTESEN KNKFEKIYYPKEHKNELYIYKKN LFLNIGNPNFDKIYGLISKDIKN VDTKILFDDDIKKNKISEIDAIL KNLNDKLNGYSNDYKAKYVNKLK ENDDFFAKNIQNENYSSFGEFEK DYNKVSEYKKIRDLVEFNYLNKI ESYLIDINWKLAIQMARFERDMH YIVNGLRELGIIKLSGYNTGISR AYPKRNGSDGFYTTTAYYKFFDE ESYKKFEKICYGFGIDLSENSEI NKPENESIRNYISHFYIVRNPFA DYSIAEQIDRVSNLLSYSTRYNN

10 20 30 40

			S T Y A S V F E V F K K D V N L D Y D E L K K K F R L I G N N D I L E R L M K P K K V S V L E L E S Y N S D Y I K N L I I E L L T K I E N T N D T L
C 2 － 2 3		L a c h n o s p i r a c e a e b a c t e r i u m N K 4 A 1 4 4 （配列番号 5 5）	M K I S K V D H T R M A V A K G N Q H R R D E I S G I L Y K D P T K T G S I D F D E R F K K L N C S A K I L Y H V F N G I A E G S N K Y K N I V D K V N N N L D R V L F T G K S Y D R K S I I D I D T V L R N V E K I N A F D R I S T E E R E Q I I D D L L E I Q L R K G L R K G K A G L R E V L L I G A G V I V R T D K K Q E I A D F L E I L D E D F N K T N Q A K N I K L S I E N Q G L V V S P V S R G E E R I F D V S G A Q K G K S S K K A Q E K E A L S A F L L D Y A D L D K N V R F E Y L R K I R R L I N L Y F Y V K N D D V M S L T E I P A E V N L E K D F D I W R D H E Q R K E E N G D F V G C P D I L L A D R D V K K S N S K Q V K I A E R Q L R E S I R E K N I K R Y R F S I K T I E K D D G T Y F F A N K Q I S V F W I H R I E N A V E R I L G S I N D K K L Y R L R L G Y L G E K V W K D I L N F L S I K Y I A V G K A V F N F A M D D L Q E K D R D I E P G K I S E N A V N G L T S F D Y E Q I K A D E M L Q R E V A V N V A F A A N N L A R V T V D I P Q N G E K E D I L L W N K S D I K K Y K K N S K K G I L K S I L Q F F G G A S T W N M K M F E I A Y H D Q P G D Y E E N Y L Y D I I Q I I Y S L R N K S F H F K T Y D H G D K N W N R E L I G K M I E H D A E R V I S V E R E K F H S N N L P M F Y K D A D L K K I L D L L Y S D Y A G R A S Q V P A F N T V L V R K N F P E F L R K D M G Y K V H F N N P E V E N Q W H S A V Y Y L Y K E I Y Y N L F L R D K E V K N L F Y T S L K N I R S E V S D K K Q K L A S D D F A S R C E E I E D R S L P E I C Q I I M T E Y N A Q N F G N R K V K S Q R V I E K N K D I F R H Y K M L L I K T L A G A F S L Y L K Q E R F A F I G K A T P I P Y E T T D V K N F L P E W K S G M Y A S F V E E I K N N L D L Q E W Y I V G R F L N G R M L N Q L A G S L R S Y I Q Y A E D I E R R A A E

			NRNKLFSKPDEKIEACKKAVRVL DLCIKISTRISAEFTDYFDSEDD YADYLEKYLKYQDDAIKELSGSS YAALDHFCNKDDLKFDIYVNAGQ KPILQRNIVMAKLFGPDNILSEV MEKVTESAIREYYDYLKKVSGYR VRGKCSTEKEQEDLLKFQRLKNA VEFRDVTEYAEVINELLGQLISW SYLRERDLLYFQLGFHYMCLKNK SFKPAEYVDIRRNNGTIIHNAIL YQIVSMYINGLDFYSCDKEGKTL KPIETGKGVGSKIGQFIKYSQYL YNDPSYKLEIYNAGLEVFENIDE HDNITDLRKYVDHFKYYAYGNKM SLLDLYSEFFDRFFTYDMKYQKN VVNVLENILLRHFVIFYPKFGSG KKDVGIRDCKKERAQIEISEQSL TSEDFMFKLDDKAGEEAKKFPAR DERYLQTIAKLLYYPNEIEDMNR FMKKGETINKKVQFNRKKKITRK QKNNSSNEVLSSTMGYLFKNIKL
C2－24		Chloroflexus aggregans（配列番号56）	MTDQVRREEVAAGELADTPLAAA QTPAADAAVAATPAPAEAVAPTP EQAVDQPATTGESEAPVTTAQAA AHEAEPAEATGASFTPVSEQQPQ KPRRLKDLQPGMELEGKVTSIAL YGIFVDVGVGRDGLVHISEMSDR RIDTPSELVQIGDTVKVWVKSVD LDARRISLTMLNPSRGEKPRRSR QSQPAQPQPRRQEVDREKLASLK VGEIVEGVITGFAPFGAFADIGV GKDGLIHISELSEGRVEKPEDAV KVGERYQFKVLEIDGEGTRISLS LRRAQRTQRMQQLEPGQIIEGTV SGIATFGAFVDIGVGRDGLVHIS ALAPHRVAKVEDVVKVGDKVKVK VLGVDPQSKRISLTMRLEEEQPA TTAGDEAAEPAEEVTPTRRGNLE RFAAAAAQTARERSERGERSERGE RRERRERRPAQSSPDTYIVGEDD DESFEGNATIEDLLTKFGGSSSR

			RDRDRRRRHEDDDDEEMERPSNR RQREAIRRTLQQIGYDE
C2-25		Demequina aurantiaca（配列番号５７）	MDLTWHALLILFIVALLAGFLDT LAGGGGLLTVPALLLTGIPPLQA LGTNKLQSSFGTGMATYQVIRKK RVHWRDVRWPMVWAFLGSAAGAV AVQFIDTDALLIIIPVVLALVAA YFLFVPKSHLPPPEPRMSDPAYE ATLVPIIGAYDGAFGPGTGSLYA LSGVALRAKTLVQSTAIAKTLNF ATNFAALLVFAFAGHMLWTVGAV MIAGQLIGAYAGSHMLFRVNPLV LRVLIVVMSLGMLIRVLLD
C2-26		Thalassospira sp. TSL５－１（配列番号５８）	MRIIKPYGRSHVEGVATQEPRRK LRLNSSPDISRDIPGFAQSHDAL IIAQWISAIDKIATKPKPDKKPT QAQINLRTTLGDAAWQHVMAENL LPAATDPAIREKLHLIWQSKIAP WGTARPQAEKDGKPTPKGGWYER FCGVLSPEAITQNVARQIAKDIY DHLHVAAKRKGREPAKQGESSNK PGKFKPDRKRGLIEERAESIAKN ALRPGSHAPCPWGPDDQATYEQA GDVAGQIYAAARDCLEEKKRRSG NRNTSSVQYLPRDLAAKILYAQY GRVFGPDTTIKAALDEQPSLFAL HKAIKDCYHRLINDARKRDILRI LPRNMAALFRLVRAQYDNRDINA LIRLGKVIHYHASEQGKSEHHGI RDYWPSQQDIQNSRFWGSDGQAD IKRHEAFSRIWRHIIALASRTLH DWADPHSQKFSGENDDILLLAKD AIEDDVFKAGHYERKCDVLFGAQ ASLFCGAEDFEKAILKQAITGTG NLRNATFHFKGKVRFEKELQELT KDVPVEVQSAIAALWQKDAEGRT RQIAETLQAVLAGHFLTEEQNRH IFAALTAAMAQPGDVPLPRLRRV LARHDSICQRGRILPLSPCPDRA KLEESPALTCQYTVLKMLYDGPF

			RAWLAQQNSTILNHYIDSTIART DKAARDMNGRKLAQAEKDLITSR AADLPRLSVDEKMGDFLARLTAA TATEMRVQRGYQSDGENAQKQAA FIGQFECDVIGRAFADFLNQSGF DFVLKLKADTPQPDAAQCDVTAL IAPDDISVSPPQAWQQVLYFILH LVPVDDASHLLHQIRKWQVLEGK EKPAQIAHDVQSVLMLYLDMHDA KFTGGAALHGIEKFAEFFAHAAD FRAVFPPQSLQDQDRSIPRRGLR EIVRFGHLPLLQHMSGTVQITHD NVVAWQAARTAGATGMSPIARRQ KQREELHALAVERTARFRNADLQ NYMHALVDVIKHRQLSAQVTLSD QVRLHRLMMGVLGRLVDYAGLWE RDLYFVVLALLYHHGATPDDVFK GQGKKNLADGQVVAALKPKNRKA AAPVGVFDDLDHYGIYQDDRQSI RNGLSHFNMLRGGKAPDLSHWVN QTRSLVAHDRKLKNAVAKSVIEM LAREGFDLDWGIQTDRGQHILSH GKIRTRQAQHFQKSRLHIVKKSA KPDKNDTVKIRENLHGDAMVERV VQLFAAQVQKRYDITVEKRLDHL FLKPQDQKGKNGIHTHNGWSKTE KKRRPSRENRKGNHEN
C2-27		SAMN04487830_139 20[Pseudobutyrivibrio sp. OR37](配列番号59)	MKFSKESHRKTAVGVTESNGIIG LLYKDPLNEKEKIEDVVNQRANS TKRLFNLFGTEATSKDISRASKD LAKVVNKAIGNLKGNKKFNKKEQ ITKGLNTKIIVEELKNVLKDEKK LIVNKDIIDEACSRLLKTSFRTA KTKQAVKMILTAVLIENTNLSKE DEAFVHEYFVKKLVNEYNKTSVK KQIPVALSNQNMVIQPNSVNGTL EISETKKSKETKTTEKDAFRAFL RDYATLDENRRHKMRLCLRNLVN LYFYGETSVSKDDFDEWRDHEDK KQNDELFVKKIVSIKTDRKGNVK EVLDVDATIDAIRTNNIACYRRA

			L A Y A N E N P D V F F S D T M L N K F W I H H V E N E V E R I Y G H I N N N T G D Y K Y Q L G Y L S E K V W K G I I N Y L S I K Y I A E G K A V Y N Y A M N A L A K D N N S N A F G K L D E K F V N G I T S F E Y E R I K A E E T L Q R E C A V N I A F A A N H L A N A T V D L N E K D S D F L L L K H E D N K D T L G A V A R P N I L R N I L Q F F G G K S R W N D F D F S G I D E I Q L L D D L R K M I Y S L R N S S F H F K T E N I D N D S W N T K L I G D M F A Y D F N M A G N V Q K D K M Y S N N V P M F Y S T S D I E K M L D R L Y A E V H E R A S Q V P S F N S V F V R K N F P D Y L K N D L K I T S A F G V D D A L K W Q S A V Y Y V C K E I Y Y N D F L Q N P E T F T M L K D Y V Q C L P I D I D K S M D Q K L K S E R N A H K N F K E A F A T Y C K E C D S L S A I C Q M I M T E Y N N Q N K G N R K V I S A R T K D G D K L I Y K H Y K M I L F E A L K N V F T I Y L E K N I N T Y G F L K K P K L I N N V P A I E E F L P N Y N G R Q Y E T L V N R I T E E T E L Q K W Y I V G R L L N P K Q V N Q L I G N F R S Y V Q Y V N D V A R R A K Q T G N N L S N D N I A W D V K N I I Q I F D V C T K L N G V T S N I L E D Y F D D G D D Y A R Y L K N F V D Y T N K N N D H S A T L L G D F C A K E I D G I K I G I Y H D G T N P I V N R N I I Q C K L Y G A T G I I S D L T K D G S I L S V D Y E I I K K Y M Q M Q K E I K V Y Q Q K G I C K T K E E Q Q N L K K Y Q E L K N I V E L R N I I D Y S E I L D E L Q G Q L I N W G Y L R E R D L M Y F Q L G F H Y L C L H N E S K K P V G Y N N A G D I S G A V L Y Q I V A M Y T N G L S L I D A N G K S K K N A K A S A G A K V G S F C S Y S K E I R G V D K D T K E D D D P I Y L A G V E L F E N I N E H Q Q C I N L R N Y I E H F H Y Y A K H D R S M L D L Y S E V F D R F F T Y D M K Y T K N V P N M M Y N I L L Q H L V V P A F E F G S S E K R L D D N D E Q T K P R A M F T L R E K N G L S S E Q F T Y R L G D G N S T V K L S A R G D D Y L R A V A S L L Y Y P D R A P

			E G L I R D A E A E D K F A K I N H S N P K S D N R N N R G N F K N P K V Q W Y N N K T K R K
C 2 － 2 8		S A M N 0 2 9 1 0 3 9 8 _ 0 0 0 0 8 [B u t y r i v i b r i o s p . Y A B 3 0 0 1]（配列番号６０）	M K I S K V D H R K T A V K I T D N K G A E G F I Y Q D P T R D S S T M E Q I I S N R A R S S K V L F N I F G D T K K S K D L N K Y T E S L I I Y V N K A I K S L K G D K R N N K Y E E I T E S L K T E R V L N A L I Q A G N E F T C S E N N I E D A L N K Y L K K S F R V G N T K S A L K K L L M A A Y C G Y K L S I E E K E E I Q N Y F V D K L V K E Y N K D T V L K Y T A K S L K H Q N M V V Q P D T D N H V F L P S R I A G A T Q N K M S E K E A L T E F L K A Y A V L D E E K R H N L R I I L R K L V N L Y F Y E S P D F I Y P E N N E W K E H D D R K N K T E T F V S P V K V N E E K N G K T F V K I D V P A T K D L I R L K N I E C Y R R S V A E T A G N P I T Y F T D H N I S K F W I H H I E N E V E K I F A L L K S N W K D Y Q F S V G Y I S E K V W K E I I N Y L S I K Y I A I G K A V Y N Y A L E D I K K N D G T L N F G V I D P S F Y D G I N S F E Y E K I K A E E T F Q R E V A V Y V S F A V N H L S S A T V K L S E A Q S D M L V L N K N D I E K I A Y G N T K R N I L Q F F G G Q S K W K E F D F D R Y I N P V N Y T D I D F L F D I K K M V Y S L R N E S F H F T T T D T E S D W N K N L I S A M F E Y E C R R I S T V Q K N K F F S N N L P L F Y G E N S L E R V L H K L Y D D Y V D R M S Q V P S F G N V F V R K K F P D Y M K E I G I K H N L S S E D N L K L Q G A L Y F L Y K E I Y Y N A F I S S E K A M K I F V D L V N K L D T N A R D D K G R I T H E A M A H K N F K D A I S H Y M T H D C S L A D I C Q K I M T E Y N Q Q N T G H R K K Q T T Y S S E K N P E I F R H Y K M I L F M L L Q K A M T E Y I S S E E I F D F I M K P N S P K T D I K E E E F L P Q Y K S C A Y D N L I K L I A D N V E L Q K W Y I T A R L L S P R E V N Q L I G S F R S Y K Q F V S D I E R R A K E T N N S L S K S G M T V D V E N I T K V L D L C T K L N G R F S N E L T D Y F D S K D

			DYAVYVSKFLDFGFKIDEKFPAA LLGEFCNKEENGKKIGIYHNGTE PILNSNIIKSKLYGITDVVSRAV KPVSEKLIREYLQQEVKIKPYLE NGVCKNKEEQAALRKYQELKNRI EFRDIVEYSEIINELMGQLINFS YLRERDLMYFQLGFHYLCLNNYG AKPEGYYSIVNDKRTIKGAILYQ IVAMYTYGLPIYHYVDGTISDRR KNKKTVLDTLNSSETVGAKIKYF IYYSDELFNDSLILYNAGLELFE NINEHENIVNLRKYIDHFKYYVS QDRSLLDIYSEVFDRYFTYDRKY KKNVMNLFSNIMLKHFIITDFEF STGEKTIGEKNTAKKECAKVRIK RGGLSSDKFTYKFKDAKPIELSA KNTEFLDGVARILYYPENVVLTD LVRNSEVEDEKRIEKYDRNHNSS PTRKDKTYKQDVKKNYNKKTSKA FDSSKLDTKSVGNNLSDNPVLKQ FLSESKKKR
C2－29		Blautia sp. Marseille－P2398（配列番号61）	MKISKVDHVKSGIDQKLSSQRGM LYKQPQKKYEGKQLEEHVRNLSR KAKALYQVFPVSGNSKMEKELQI INSFIKNILLRLDSGKTSEEIVG YINTYSVASQISGDHIQELVDQH LKESLRKYTCVGDKRIYVPDIIV ALLKSKFNSETLQYDNSELKILI DFIREDYLKEKQIKQIVHSIENN STPLRIAEINGQKRLIPANVDNP KKSYIFEFLKEYAQSDPKGQESL LQHMRYLILLYLYGPDKITDDYC EEIEAWNFGSIVMDNEQLFSEEA SMLIQDRIYVNQQIEEGRQSKDT AKVKKNKSKYRMLGDKIEHSINE SVVKHYQEACKAVEEKDIPWIKY ISDHVMSVYSSKNRVDLDKLSLP YLAKNTWNTWISFIAMKYVDMGK GVYHFAMSDVDKVGKQDNLIIGQ IDPKFSDGISSFDYERIKAEDDL HRSMSGYIAFAVNNFARAICSDE

			F R K K N R K E D V L T V G L D E I P L Y D N V K R K L L Q Y F G G A S N W D D S I I D I I D D K D L V A C I K E N L Y V A R N V N F H F A G S E K V Q K K Q D D I L E E I V R K E T R D I G K H Y R K V F Y S N N V A V F Y C D E D I I K L M N H L Y Q R E K P Y Q A Q I P S Y N K V I S K T Y L P D L I F M L L K G K N R T K I S D P S I M N M F R G T F Y F L L K E I Y Y N D F L Q A S N L K E M F C E G L K N N V K N K K S E K P Y Q N F M R R F E E L E N M G M D F G E I C Q Q I M T D Y E Q Q N K Q K K K T A T A V M S E K D K K I R T L D N D T Q K Y K H F R T L L Y I G L R E A F I I Y L K D E K N K E W Y E F L R E P V K R E Q P E E K E F V N K W K L N Q Y S D C S E L I L K D S L A A A W Y V V A H F I N Q A Q L N H L I G D I K N Y I Q F I S D I D R R A K S T G N P V S E S T E I Q I E R Y R K I L R V L E F A K F F C G Q I T N V L T D Y Y Q D E N D F S T H V G H Y V K F E K K N M E P A H A L Q A F S N S L Y A C G K E K K K A G F Y Y D G M N P I V N R N I T L A S M Y G N K K L L E N A M N P V T E Q D I R K Y Y S L M A E L D S V L K N G A V C K S E D E Q K N L R H F Q N L K N R I E L V D V L T L S E L V N D L V A Q L I G W V Y I R E R D M M Y L Q L G L H Y I K L Y F T D S V A E D S Y L R T L D L E E G S I A D G A V L Y Q I A S L Y S F N L P M Y V K P N K S S V Y C K K H V N S V A T K F D I F E K E Y C N G D E T V I E N G L R L F E N I N L H K D M V K F R D Y L A H F K Y F A K L D E S I L E L Y S K A Y D F F F S Y N I K L K K S V S Y V L T N V L L S Y F I N A K L S F S T Y K S S G N K T V Q H R T T K I S V V A Q T D Y F T Y K L R S I V K N K N G V E S I E N D D R R C E V V N I A A R D K E F V D E V C N V I N Y N S D K
C 2 − 3 0		L e p t o t r i c h i a s p . M a r s e	M K I T K I D G I S H K K Y I K E G K L V K S T S E E N K T D E R L S E L L T I R L D T Y I K N P D N A S E E E N R I R R E N L K E F F S N K V L Y L K D G I L Y L K D R R E K N Q L Q N K N Y S E E D I S E Y D L K N K N N F L V L

		ｉｌｌｅ－Ｐ３０７（配列番号６２）	KKILLNEDINSEELEIFRNDFEK KLDKINSLKYSLEENKANYQKIN ENNIKKVEGKSKRNIFYNYYKDS AKRNDYINNIQEAFDKLYKKEDI ENLFFLIENSKKHEKYKIRECYH KIIGRKNDKENFATIIYEEIQNV NNMKELIEKVPNVSELKKSQVFY KYYLNKEKLNDENIKYVFCHFVE IEMSKLLKNYVYKKPSNISNDKV KRIFEYQSLKKLIENKLLNKLDT YVRNCGKYSFYLQDGEIATSDFI VGNRQNEAFLRNIIGVSSTAYFS LRNILETENENDITGRMRGKTVK NNKGEEKYISGEIDKLYDNNKQN EVKKNLKMFYSYDFNMNSKKEIE DFFSNIDEAISSIRHGIVHFNLE LEGKDIFTFKNIVPSQISKKMFH DEINEKKLKLKIFKQLNSANVFR YLEKYKILNYLNRTRFEFVNKNI PFVPSFTKLYSRIDDLKNSLGIY WKTPKTNDDNKTKEITDAQIYLL KNIYYGEFLNYFMSNNGNFFEIT KEIIELNKNDKRNLKTGFYKLQK FENLQEKTPKEYLANIQSLYMIN AGNQDEEEKDTYIDFIQKIFLKG FMTYLANNGRLSLIYIGSDEETN TSLAEKKQEFDKFLKKYEQNNNI EIPYEINEFVREIKLGKILKYTE RLNMFYLILKLLNHKELTNLKGS LEKYQSANKEEAFSDQLELINLL NLDNNRVTEDFELEADEIGKFLD FNGNKVKDNKELKKFDTNKIYFD GENIIKHRAFYNIKKYGMLNLLE KISDEAKYKISIEELKNYSKKKN EIEENHTTQENLHRKYARPRKDE KFTDEDYKKYEKAIRNIQQYTHL KNKVEFNELNLLQSLLLRILHRL VGYTSIWERDLRFRLKGEFPENQ YIEEIFNFDNSKNVKYKNGQIVE KYINFYKELYKDDTEKISIYSDK KVKELKKEKKDLYIRNYIAHFNY

10 20 30 40

			I P N A E I S L L E M L E N L R K L L S Y D R K L K N A I M K S I V D I L K E Y G F V V T F K I E K D K K I R I E S L K S E E V V H L K K L K L K D N D K K K E P I K T Y R N S K E L C K L V K V M F E Y K M K E K K S E N
C 2 − 3 1		B a c t e r o i d e s i h u a e（配列番号 6 3）	M R I T K V K V K E S S D Q K D K M V L I H R K V G E G T L V L D E N L A D L T A P I I D K Y K D K S F E L S L L K Q T L V S E K E M N I P K C D K C T A K E R C L S C K Q R E K R L K E V R G A I E K T I G A V I A G R D I I P R L N I F N E D E I C W L I K P K L R N E F T F K D V N K Q V V K L N L P K V L V E Y S K K N D P T L F L A Y Q Q W I A A Y L K N K K G H I K K S I L N N R V V I D Y S D E S K L S K R K Q A L E L W G E E Y E T N Q R I A L E S Y H T S Y N I G E L V T L L P N P E E Y V S D K G E I R P A F H Y K L K N V L Q M H Q S T V F G T N E I L C I N P I F N E N R A N I Q L S A Y N L E V V K Y F E H Y F P I K K K K K N L S L N Q A I Y Y L K V E T L K E R L S L Q L E N A L R M N L L Q K G K I K K H E F D K N T C S N T L S Q I K R D E F F V L N L V E M C A F A A N N I R N I V D K E Q V N E I L S K K D L C N S L S K N T I D K E L C T K F Y G A D F S Q I P V A I W A M R G S V Q Q I R N E I V H Y K A E A I D K I F A L K T F E Y D D M E K D Y S D T P F K Q Y L E L S I E K I D S F F I E Q L S S N D V L N Y Y C T E D V N K L L N K C K L S L R R T S I P F A P G F K T I Y E L G C H L Q D S S N T Y R I G H Y L M L I G G R V A N S T V T K A S K A Y P A Y R F M L K L I Y N H L F L N K F L D N H N K R F F M K A V A F V L K D N R E N A R N K F Q Y A F K E I R M M N N D E S I A S Y M S Y I H S L S V Q E Q E K K G D K N D K V R Y N T E K F I E K V F V K G F D D F L S W L G V E F I L S P N Q E E R D K T V T R E E Y E N L M I K D R V E H S I N S N Q E S H I A F F T F C K L L D A N H L S D L R N E W I K F R S S G D K E G F S Y N F A I D I I E L C L L T V D R V E Q R R D G Y K E Q T E L K E Y L S F F I K G N E S E N T V W K G F Y F Q Q D N Y

			TPVLYSPIELIRKYGTLELLKLI IVDEDKITQGEFEEWQTLKKVVE DKVTRRNELHQEWEDMKNKSSFS QEKCSIYQKLCRDIDRYNWLDNK LHLVHLRKLHNLVIQILSRMARF IALWDRDFVLLDASRANDDYKLL SFFNFRDFINAKKTKTDDELLAE FGSKIEKKNAPFIKAEDVPLMVE CIEAKRSFYQKVFFRNNLQVLAD RNFIAHYNYISKTAKCSLFEMII KLRTLMYYDRKLRNAVVKSIANV FDQNGMVLQLSLDDSHELKVDKV ISKRIVHLKNNNIMTDQVPEEYY KICRRLLEMKK
C2-32		SAMN05216357_1045[Porphyromonadaceae bacterium KH3CP3RA]（配列番号64）	MEFRDSIFKSLLQKEIEKAPLCF AEKLISGGVFSYYPSERLKEFVG NHPFSLFRKTMPFSPGFKRVMKS GGNYQNANRDGRFYDLDIGVYLP KDGFGDEEWNARYFLMKLIYNQL FLPYFADAENHLFRECVDFVKRV NRDYNCKNNNSEEQAFIDIRSMR EDESIADYLAFIQSNIIIEENKK KETNKEGQINFNKFLLQVFVKGF DSFLKDRTELNFLQLPELQGDGT RGDDLESLDKLGAVVAVDLKLDA TGIDADLNENISFYTFCKLLDSN HLSRLRNEIIKYQSANSDFSHNE DFDYDRIISIIELCMLSADHVST NDNESIFPNNDKDFSGIRPYLST DAKVETFEDLYVHSDAKTPITNA TMVLNWKYGTDKLFERLMISDQD FLVTEKDYFVWKELKKDIEEKIK LREELHSLWVNTPKGKKGAKKKN GRETTGEFSEENKKEYLEVCREI DRYVNLDNKLHFVHLKRMHSLLI ELLGRFVGFTYLFERDYQYYHLE IRSRRNKDAGVVDKLEYNKIKDQ NKYDKDDFFACTFLYEKANKVRN FIAHFNYLTMWNSPQEEEHNSNL SGAKNSSGRQNLKCSLTELINEL REVMSYDRKLKNAVTKAVIDLFD

10 20 30 40

			K H G M V I K F R I V N N N N N D N K N K H H L E L D D I V P K K I M H L R G I K L K R Q D G K P I P I Q T D S V D P L Y C R M W K K L L D L K P T P F
C 2 － 3 3		L i s t e r i a r i p a r i a （配列番号６５）	M H D A W A E N P K K P Q S D A F L K E Y K A C C E A I D T Y N W H K N K A T L V Y V N E L H H L L I D I L G R L V G Y V A I A D R D F Q C M A N Q Y L K S S G H T E R V D S W I N T I R K N R P D Y I E K L D I F M N K A G L F V S E K N G R N Y I A H L N Y L S P K H K Y S L L Y L F E K L R E M L K Y D R K L K N A V T K S L I D L L D K H G M C V V F A N L K N N K H R L V I A S L K P K K I E T F K W K K I K
C 2 － 3 4		I n s o l i t i s p i r i l l u m p e r e g r i n u m （配列番号６６）	M R I I R P Y G S S T V A S P S P Q D A Q P L R S L Q R Q N G T F D V A E F S R R H P E L V L A Q W V A M L D K I I R K P A P G K N S T A L P R P T A E Q R R L R Q Q V G A A L W A E M Q R H T P V P P E L K A V W D S K V H P Y S K D N A P A T A K T P S H R G R W Y D R F G D P E T S A A T V A E G V R R H L L D S A Q P F R A N G G Q P K G K G V I E H R A L T I Q N G T L L H H H Q S E K A G P L P E D W S T Y R A D E L V S T I G K D A R W I K V A A S L Y Q H Y G R I F G P T T P I S E A Q T R P E F V L H T A V K A Y Y R R L F K E R K L P A E R L E R L L P R T G E A L R H A V T V Q H G N R S L A D A V R I G K I L H Y G W L Q N G E P D P W P D D A A L Y S S R Y W G S D G Q T D I K H S E A V S R V W R R A L T A A Q R T L T S W L Y P A G T D A G D I L L I G Q K P D S I D R N R L P L L Y G D S T R H W T R S P G D V W L F L K Q T L E N L R N S S F H F K T L S A F T S H L D G T C E S E P A E Q Q A A Q A L W Q D D R Q Q D H Q Q V F L S L R A L D A T T Y L P T G P L H R I V N A V Q S T D A T L P L P R F R R V V T R A A N T R L K G F P V E P V N R R T M E D D P L L R C R Y G V L K L L Y E R G F R A W L E T R P S I A S C L D Q S L K R S T K A A Q T I N G K N S P Q G V E I L S R A T K L L Q A E G G G G H G I H D L F D R L Y A A T A R E M R

			VQVGYHHDAEAARQQAEFIEDLK CEVVARAFCAYLKTLGIQGDTFR RQPEPLPTWPDLPDLPSSTIGTA QAALYSVLHLMPVEDVGSLLHQL RRWLVALQARGGEDGTAITATIP LLELYLNRHDAKFSGGGAGTGLR WDDWQVFFDCQATFDRVFPPGPA LDSHRLPLRGLREVLRFGRVNDL AALIGQDKITAAEVDRWHTAEQT IAAQQQRREALHEQLSRKKGTDA EVDEYRALVTAIADHRHLTAHVT LSNVVRLHRLMTTVLGRLVDYGG LWERDLTFVTLYEAHRLGGLRNL LSESRVNKFLDGQTPAALSKKNN AEENGMISKVLGDKARRQIRNDF AHFNMLQQGKKTINLTDEINNAR KLMAHDRKLKNAITRSVTTLLQQ DGLDIVWTMDASHRLTDAKIDSR NAIHLHKTHNRANIREPLHGKSY CRWVAALFGATSTPSATKKSDKI R

【０３８６】

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

【表３】

表３

Ｂｅｒｇｅｙｅｌｌａｚｏｏｈｅｌｃｕｍ（配列番号６７）	1	MENKTSLGNNIYYNPFKPQDKSYF ΛGYFNΛΛMENTDSVFRELGKRLKG KEYTSENFFDAIFKENISLVEYER YVKLLSDYFPMARLLDKKEVPIKE RKENFKKNFKGIIKAVRDLRNFYT HKEHGEVEITDEIFGVLDEMLKST VLTVKKKKKVKTDKTKEILKKSIEK QLDILCQKKLEYLRDTARKIEEKR RNQRERGEKELVAPFKYSDKRDDL IAAIYNDAFDVYIDKKKDSLKESS KAKYNTKSDPQQEEGDLKIPISKN GVVFLLSLFLTKQEIHAFKSKIAG FKATVIDEATVSEATVSHGKNSIC FMATHEIFSHLAYKKLKRKVRTAE INYGEAENAEQLSVYAKETLMMQM LDELSKVPDVVYQNLSEDVQKTFI

		E D W N E Y L K E N N G D V G T M E E E Q V I H P V I R K R Y E D K F N Y F A I R F L D E F A Q F P T L R F Q V H L G N Y L H D S R P K E N L I S D R R I K E K I T V F G R L S E L E H K K A L F I K N T E T N E D R E H Y W E I F P N P N Y D F P K E N I S V N D K D F P I A G S I L D R E K Q P V A G K I G I K V K L L N Q Q Y V S E V D K A V K A H Q L K Q R K A S K P S I Q N I I E E I V P I N E S N P K E A I V F G G Q P T A Y L S M N D I H S I L Y E F F D K W E K K K E K L E K K G E K E L R K E I G K E L E K K I V G K I Q A Q I Q Q I I D K D T N A K I L K P Y Q D G N S T A I D K E K L I K D L K Q E Q N I L Q K L K D E Q T V R E K E Y N D F I A Y Q D K N R E I N K V R D R N H K Q Y L K D N L K R K Y P E A P A R K E V L Y Y R E K G K V A V W L A N D I K R F M P T D F K N E W K G E Q H S L L Q K S L A Y Y E Q C K E E L K N L L P E K V F Q H L P F K L G G Y F Q Q K Y L Y Q F Y T C Y L D K R L E Y I S G L V Q Q A E N F K S E N K V F K K V E N E C F K F L K K Q N Y T H K E L D A R V Q S I L G Y P I F L E R G F M D E K P T I I K G K T F K G N E A L F A D W F R Y Y K E Y Q N F Q T F Y D T E N Y P L V E L E K K Q A D R K R K T K I Y Q Q K K N D V F T L L M A K H I F K S V F K Q D S I D Q F S L E D L Y Q S R E E R L G N Q E R A R Q T G E R N T N Y I W N K T V D L K L C D G K I T V E N V K L K N V G D F I K Y E Y D Q R V Q A F L K Y E E N I E W Q A F L I K E S K E E E N Y P Y V V E R E I E Q Y E K V R R E E L L K E V H L I E E Y I L E K V K D K E I L K K G D N Q N F K Y Y I L N G L L K Q L K N E D V E S Y K V F N L N T E P E D V N I N Q L K Q E A T D L E Q K A F V L T Y I R N K F A H N Q L P K K E F W D Y C Q E K Y G K I E K E K T Y A E Y F A E V F K K E K E A L I K
Prevotella intermedia（配列番号6	2	M E D D K K T T D S I R Y E L K D K H F W A A F L N L A R H N V Y I T V N H I N K I L E E G E I N R D G Y E T T L K N T W N E I K D I N K K D R L S K L I I K H F P F L E A A T Y R L N P T D T T K Q K E E K Q A E A Q S L E S L R K S F F V F I Y K L R D L R N H Y S H Y K H S K S L E R P K F E E G L L E K M Y N I F N A S I R L V K E D Y

8）		Q Y N K D I N P D E D F K H L D R T E E E F N Y Y F T K D N E G N I T E S G L L F F V S L F L E K K D A I W M Q Q K L R G F K D N R E N K K K M T N E V F C R S R M L L P K L R L Q S T Q T Q D W I L L D M L N E L I R C P K S L Y E R L R E E D R E K F R V P I E I A D E D Y D A E Q E P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D Y N E I F T N L R F Q I D L G T Y H F S I Y K K Q I G D Y K E S H H L T H K L Y G F E R I Q E F T K Q N R P D E W R K F V K T F N S F E T S K E P Y I P E T T P H Y H L E N Q K I G I R F R N D N D K I W P S L K T N S E K N E K S K Y K L D K S F Q A E A F L S V H E L L P M M F Y Y L L L K T E N T D N D N E I E T K K K E N K N D K Q E K H K I E E I I E N K I T E I Y A L Y D T F A N G E I K S I D E L E E Y C K G K D I E I G H L P K Q M I A I L K D E H K V M A T E A E R K Q E E M L V D V Q K S L E S L D N Q I N E E I E N V E R K N S S L K S G K I A S W L V N D M M R F Q P V Q K D N E G K P L N N S K A N S T E Y Q L L Q R T L A F F G S E H E R L A P Y F K Q T K L I E S S N P H P F L K D T E W E K C N N I L S F Y R S Y L E A K K N F L E S L K P E D W E K N Q Y F L K L K E P K T K P K T L V Q G W K N G F N L P R G I F T E P I R K W F M K H R E N I T V A E L K R V G L V A K V I P L F F S E E Y K D S V Q P F Y N Y H F N V G N I N K P D E K N F L N C E E R R E L L R K K K D E F K K M T D K E K E E N P S Y L E F K S W N K F E R E L R L V R N Q D I V T W L L C M E L F N K K K I K E L N V E K I Y L K N I N T N T T K K E K N T E E K N G E E K N I K E K N N I L N R I M P M R L P I K V Y G R E N F S K N K K K K I R R N T F F T V Y I E E K G T K L L K Q G N F K A L E R D R R L G G L F S F V K T P S K A E S K S N T I S K L R V E Y E L G E Y Q K A R I E I I K D M L A L E K T L I D K Y N S L D T D N F N K M L T D W L E L K G E P D K A S F Q N D V D L L I A V R N A F S H N Q Y P M R N R I A F A N I N P F S L S S A N T S E E K G L G I A N Q L K D K T H K T I E K I I E I E K P I E T K E
Prevotel	3	M Q K Q D K L F V D R K K N A I F A F P K Y I T I M E N K E K P E P I Y Y E L T D K H F W A A F

l a b u c c a e（配列番号６９）		L N L A R H N V Y T T I N H I N R R L E I A E L K D D G Y M M G I K G S W N E Q A K K L D K K V R L R D L I M K H F P F L E A A A Y E M T N S K S P N N K E Q R E K E Q S E A L S L N N L K N V L F I F L E K L Q V L R N Y Y S H Y K Y S E E S P K P I F E T S L L K N M Y K V F D A N V R L V K R D Y M H H E N I D M Q R D F T H L N R K K Q V G R T K N I I D S P N F H Y H F A D K E G N M T I A G L L F F V S L F L D K K D A I W M Q K K L K G F K D G R N L R E Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E N V Q T K D W M Q L D M L N E L V R C P K S L Y E R L R E K D R E S F K V P F D I F S D D Y N A E E E P F K N T L V R H Q D R F P Y F V L R Y F D L N E I F E Q L R F Q I D L G T Y H F S I Y N K R I G D E D E V R H L T H H L Y G F A R I Q D F A P Q N Q P E E W R K L V K D L D H F E T S Q E P Y I S K T A P H Y H L E N E K I G I K F C S A H N N L F P S L Q T D K T C N G R S K F N L G T Q F T A E A F L S V H E L L P M M F Y Y L L L T K D Y S R K E S A D K V E G I I R K E I S N I Y A I Y D A F A N N E I N S I A D L T R R L Q N T N I L Q G H L P K Q M I S I L K G R Q K D M G K E A E R K I G E M I D D T Q R R L D L L C K Q T N Q K I R I G K R N A G L L K S G K I A D W L V N D M M R F Q P V Q K D Q N N I P I N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G S E N F R L K A Y F N Q M N L V G N D N P H P F L A E T Q W E H Q T N I L S F Y R N Y L E A R K K Y L K G L K P Q N W K Q Y Q H F L I L K V Q K T N R N T L V T G W K N S F N L P R G I F T Q P I R E W F E K H N N S K R I Y D Q I L S F D R V G F V A K A I P L Y F A E E Y K D N V Q P F Y D Y P F N I G N R L K P K K R Q F L D K K E R V E L W Q K N K E L F K N Y P S E K K K T D L A Y L D F L S W K K F E R E L R L I K N Q D I V T W L M F K E L F N M A T V E G L K I G E I H L R D I D T N T A N E E S N N I L N R I M P M K L P V K T Y E T D N K G N I L K E R P L A T F Y I E E T E T K V L K Q G N F K A L V K D R R L N G L F S F A E T T D L N L E E H P I S K L S V D L E L I K Y Q T T R I S I F E M T L G L E K K L I D K Y S T L P T D S F R N M L E R W L Q C K A N R P E

10 20 30 40

		LKNYVNSLIAVRNAFSHNQYPMYD ATLFAEVKKFTLFPSVDTKKIELN IAPQLLEIVGKAIKEIEKSENKN
Porphyromonas gingivalis（配列番号７０）	4	MNTVPASENKGQSRTVEDDPQYFG LYLNLARENLIEVESHVRIKFGKK KLNEESLKQSLLCDHLLSVDRWTK VYGHSRRYLPFLHYFDPDSQIEKD HDSKTGVDPDSAQRLIRELYSLLD FLRNDFSHNRLDGTTFEHLEVSPD ISSFITGTYSLACGRAQSRFAVFF KPDDFVLAKNRKEQLISVADGKEC LTVSGFAFFICLFLDREQASGMLS RIRGFKRTDENWARAVHETFCDLC IRHPHDRLESSNTKEALLLDMLNE LNRCPRILYDMLPEEERAQFLPAL DENSMNNLSENSLDEESRLLWDGS SDWAEALTKRIRHQDRFPYLMLRF IEEMDLLKGIRFRVDLGEIELDSY SKKVGRNGEYDRTITDHALAFGKL SDFQNEEEVSRMISGEASYPVRFS LFAPRYAIYDNKIGYCHTSDPVYP KSKTGEKRALSNPQSMGFISVHDL RKLLLMELLCEGSFSRMQSDFLRK ANRILDETAEGKLQFSALFPEMRH RFIPPQNPKSKDRREKAETTLEKY KQEIKGRKDKLNSQLLSAFDMDQR QLPSRLLDEWMNIRPASHSVKLRT YVKQLNEDCRLRLRKFRKDGDGKA RAIPLVGEMATFLSQDIVRMIISE ETKKLITSAYYNEMQRSLAQYAGE ENRRQFRAIVAELRLLDPSSGHPF LSATMETAHRYTEGFYKCYLEKKR EWLAKIFYRPEQDENTKRRISVFF VPDGEARKLLPLLIRRRMKEQNDL QDWIRNKQAHPIDLPSHLFDSKVM ELLKVKDGKKKWNEAFKDWWSTKY PDGMQPFYGLRRELNIHGKSVSYI PSDGKKFADCYTHLMEKTVRDKKR ELRTAGKPVPPDLAADIKRSFHRA VNERFFMLRLVQEDDRLMLMAINK MMTDREEDILPGLKNIDSILDEEN QFSLAVHAKVLEKEGEGGDNSLSL

		V P A T I E I K S K R K D W S K Y I R Y R Y D R R V P G L M S H F P E H K A T L D E V K T L L G E Y D R C R I K I F D W A F A L E G A I M S D R D L K P Y L H E S S S R E G K S G E H S T L V K M L V E K K G C L T P D E S Q Y L I L I R N K A A H N Q F P C A A E M P L I Y R D V S A K V G S I E G S S A K D L P E G S S L V D S L W K K Y E M I I R K I L P I L D P E N R F F G K L L N N M S Q P I N D L
Bacteroides pyogenes（配列番号７１）	5	M E S I K N S Q K S T G K T L Q K D P P Y F G L Y L N M A L L N V R K V E N H I R K W L G D V A L L P E K S G F H S L L T T D N L S S A K W T R F Y Y K S R K F L P F L E M F D S D K K S Y E N R R E T A E C L D T I D R Q K I S S L L K E V Y G K L Q D I R N A F S H Y H I D D Q S V K H T A L I I S S E M H R F I E N A Y S F A L Q K T R A R F T G V F V E T D F L Q A E E K G D N K K F F A I G G N E G I K L K D N A L I F L I C L F L D R E E A F K F L S R A T G F K S T K E K G F L A V R E T F C A L C C R Q P H E R L L S V N P R E A L L M D M L N E L N R C P D I L F E M L D E K D Q K S F L P L L G E E E Q A H I L E N S L N D E L C E A I D D P F E M I A S L S K R V R Y K N R F P Y L M L R Y I E E K N L L P F I R F R I D L G C L E L A S Y P K K M G E E N N Y E R S V T D H A M A F G R L T D F H N E D A V L Q Q I T K G I T D E V R F S L Y A P R Y A I Y N N K I G F V R T S G S D K I S F P T L K K K G G E G H C V A Y T L Q N T K S F G F I S I Y D L R K I L L L S F L D K D K A K N I V S G L L E Q C E K H W K D L S E N L F D A I R T E L Q K E F P V P L I R Y T L P R S K G G K L V S S K L A D K Q E K Y E S E F E R R K E K L T E I L S E K D F D L S Q I P R R M I D E W L N V L P T S R E K K L K G Y V E T L K L D C R E R L R V F E K R E K G E H P L P P R I G E M A T D L A K D I I R M V I D Q G V K Q R I T S A Y Y S E I Q R C L A Q Y A G D D N R R H L D S I I R E L R L K D T K N G H P F L G K V L R P G L G H T E K L Y Q R Y F E E K K E W L E A T F Y P A A S P K R V P R F V N P P T G K Q K E L P L I I R N L M K E R P E W R D W K Q R K N S H P I D L P S Q L F E N E I C R L L K D K

		I G K E P S G K L K W N E M F K L Y W D K E F P N G M Q R F Y R C K R R V E V F D K V V E Y E Y S E E G G N Y K K Y Y E A L I D E V V R Q K I S S S K E K S K L Q V E D L T L S V R R V F K R A I N E K E Y Q L R L L C E D D R L L F M A V R D L Y D W K E A Q L D L D K I D N M L G E P V S V S Q V I Q L E G G Q P D A V I K A E C K L K D V S K L M R Y C Y D G R V K G L M P Y F A N H E A T Q E Q V E M E L R H Y E D H R R R V F N W V F A L E K S V L K N E K L R R F Y E E S Q G G C E H R R C I D A L R K A S L V S E E E Y E F L V H I R N K S A H N Q F P D L E I G K L P P N V T S G F C E C I W S K Y K A I I C R I I P F I D P E R R F F G K L L E Q K
Alistipes sp. ZOR00009（配列番号72）	6	M S N E I G A F R E H Q F A Y A P G N E K Q E E A T F A T Y F N L A L S N V E G M M F G E V E S N P D K I E K S L D T L P P A I L R Q I A S F I W L S K E D H P D K A Y S T E E V K V I V T D L V R R L C F Y R N Y F S H C F Y L D T Q Y F Y S D E L V D T T A I G E K L P Y N F H H F I T N R L F R Y S L P E I T L F R W N E G E R K Y E I L R D G L I F F C C L F L K R G Q A E R F L N E L R F F K R T D E E G R I K R T I F T K Y C T R E S H K H I G I E E Q D F L I F Q D I I G D L N R V P K V C D G V V D L S K E N E R Y I K N R E T S N E S D E N K A R Y R L L I R E K D K F P Y Y L M R Y I V D F G V L P C I T F K Q N D Y S T K E G R G Q F H Y Q D A A V A Q E E R C Y N F V V R N G N V Y Y S Y M P Q A Q N V V R I S E L Q G T I S V E E L R N M V Y A S I N G K D V N K S V E Q Y L Y H L H L L Y E K I L T I S G Q T I K E G R V D V E D Y R P L L D K L L L R P A S N G E E L R R E L R K L L P K R V C D L L S N R F D C S E G V S A V E K R L K A I L L R H E Q L L L S Q N P A L H I D K I K S V I D Y L Y L F F S D D E K F R Q Q P T E K A H R G L K D E E F Q M Y H Y L V G D Y D S H P L A L W K E L E A S G R L K P E M R K L T S A T S L H G L Y M L C L K G T V E W C R K Q L M S I G K G T A K V E A I A D R V G L K L Y D K L K E Y T P E Q L E R E V K L V V M H G Y A A A A T P K P K A Q A A I P S K L T E L R F Y S F L G K R E M S F A A F I R Q D K K A

		QKLWLRNFYTVENIKTLQKRQAAA DAACKKLYNLVGEVERVHTNDKVL VLVAQRYRERLLNVGSKCAVTLDN PERQQKLADVYEVQNAWLSIRFDD LDFTLTHVNLSNLRKAYNLIPRKH ILAFKEYLDNRVKQKLCEECRNVR RKEDLCTCCSPRYSNLTSWLKENH SESSIERERAATMMLLDVERKLLSF LLDERRKAIIEYGKFIPFSALVKE CRLADAGLCGIRNDVLHDNVISYA DAIGKLSAYFPKEASEAVEYIRRT KEVREQRREELMANSSQ
Prevotella sp. MA2016（配列番号７３）	７ａ	MSKECKKQRQEKKRRLQKANFSISL TGKHVFGAYFNMARTNFVKTINY ILPIAGVRGNYSENQINKMLHALF LIQAGRNEELTTEQKQWEKKLRLN PEQQTKFQKLLFKHFPVLGPMMAD VΛDHKΛYLNKKKSTVQTEDETFΛM LKGVSLADCLDIICLMADTLTECR NFYTHKDPYNKPSQLΛDQYLHQEM IAKKLDKVVVASRRILKDREGLSV NEVEFLTGIDHLHQEVLKDEFGNA KVKDGKVMKTFVEYDDFYFKISGK RLVNGYTVTTKDDKPVNVNTMLPA LSDFGLLYFCVLFLSKPYAKLFID EVRLFEYSPFDDKENMIMSEMLSI YRIRTPRLHKIDSHDSKATLAMDI FGELRRCPMELYNLLDKNAGQPFF HDEVKHPNSHTPDVSKRLRYDDRF PTLALRYIDETELFKRIRFQLQLG SFRYKFYDKENCIDGRVRVRRIQK EINGYGRMQEVADKRMDKWGDLIQ KREERSVKLEHEELYINLDQFLED TADSTPYVTDRRPAYNIHANRIGL YWEDSQNPKQYKVFDENGMYIPEL VVTEDKKAPIKMPAPRCALSVYDL PAMLFYEYLREQQDNEFPSAEQVI IEYEDDYRKFFKAVAEGKLKPFKR PKEFRDFLKKEYPKLRMADIPKKL QLFLCSHGLCYNNKPETVYERLDR LTLQHLEERELHIQNRLEHYQKDR DMIGNKDNQYGKKSFSDVRHGALA

		R Y L A Q S M M E W Q P T K L K D K E K G H D K L T G L N Y N V L T A Y L A T Y G H P Q V P E E G F T P R T L E Q V L I N A H L I G G S N P H P F I N K V L A L G N R N I E E L Y L H Y L E E E L K H I R S R I Q S L S S N P S D K A L S A L P F I H H D R M R Y H E R T S E E M M A L A A R Y T T I Q L P D G L F T P Y I L E I L Q K H Y T E N S D L Q N A L S Q D V P V K L N P T C N A A Y L I T L F Y Q T V L K D N A Q P F Y L S D K T Y T R N K D G E K A E S F S F K R A Y E L F S V L N N N K K D T F P F E M I P L F L T S D E I Q E R L S A K L L D G D G N P V P E V G E K G K P A T D S Q G N T I W K R R I Y S E V D D Y A E K L T D R D M K I S F K G E W E K L P R W K Q D K I I K R R D E T R R Q M R D E L L Q R M P R Y I R D I K D N E R T L R R Y K T Q D M V L F L L A E K M F T N I I S E Q S S E F N W K Q M R L S K V C N E A F L R Q T L T F R V P V T V G E T T I Y V E Q E N M S L K N Y G E F Y R F L T D D R L M S L L N N I V E T L K P N E N G D L V I R H T D L M S E L A A Y D Q Y R S T I F M L I Q S I E N L I I T N N A V L D D P D A D G F W V R E D L P K R N N F A S L L E L I N Q L N N V E L T D D E R K L L V A I R N A F S H N S Y N I D F S L I K D V K H L P E V A K G I L Q H L Q S M L G V E I T K
P r e v o t e l l a s p . M A 2 0 1 6（配列番号７４）	７ｂ	M S K E C K K Q R Q E K K R R L Q K A N F S I S L T G K H V F G A Y F N M A R T N F V K T I N Y I L P I A G V R G N Y S E N Q I N K M L H A L F L I Q A G R N E E L T T E Q K Q W E K K L R L N P E Q Q T K F Q K L L F K H F P V L G P M M A D V A D H K A Y L N K K K S T V Q T E D E T F A M L K G V S L A D C L D I I C L M A D T L T E C R N F Y T H K D P Y N K P S Q L A D Q Y L H Q E M I A K K L D K V V V A S R R I L K D R E G L S V N E V E F L T G I D H L H Q E V L K D E F G N A K V K D G K V M K T F V E Y D D F Y F K I S G K R L V N G Y T V T T K D D K P V N V N T M L P A L S D F G L L Y F C V L F L S K P Y A K L F I D E V R L F E Y S P F D D K E N M I M S E M L S I Y R I R T P R L H K I D S H D S K A T L A M D I F G E L R R C P M E L Y N L L D K N A G Q P F F

		H D E V K H P N S H T P D V S K R L R Y D D R F P T L A L R Y I D E T E L F K R I R F Q L Q L G S F R Y K F Y D K E N C I D G R V R V R R I Q K E I N G Y G R M Q E V A D K R M D K W G D L I Q K R E E R S V K L E H E E L Y I N L D Q F L E D T A D S T P Y V T D R R P A Y N I H A N R I G L Y W E D S Q N P K Q Y K V F D E N G M Y I P E L V V T E D K K A P I K M P A P R C A L S V Y D L P A M L F Y E Y L R E Q Q D N E F P S A E Q V I I E Y E D D Y R K F F K A V A E G K L K P F K R P K E F R D F L K K E Y P K L R M A D I P K K L Q L F L C S H G L C Y N N K P E T V Y E R L D R L T L Q H L E E R E L H I Q N R L E H Y Q K D R D M I G N K D N Q Y G K K S F S D V R H G A L A R Y L A Q S M M E W Q P T K L K D K E K G H D K L T G L N Y N V L T A Y L A T Y G H P Q V P E E G F T P R T L E Q V L I N A H L I G G S N P H P F I N K V L A L G N R N I E E L Y L H Y L E E E L K H I R S R I Q S L S S N P S D K A L S A L P F I H H D R M R Y H E R T S E E M M A L A A R Y T T I Q L P D G L F T P Y I L E I L Q K H Y T E N S D L Q N A L S Q D V P V K L N P T C N A A Y L I T L F Y Q T V L K D N A Q P F Y L S D K T Y T R N K D G E K A E S F S F K R A Y E L F S V L N N N K K D T F P F E M I P L F L T S D E I Q E R L S A K L L D G D G N P V P E V G E K G K P A T D S Q G N T I W K R R I Y S E V D D Y A E K L T D R D M K I S F K G E W E K L P R W K Q D K I I K R R D E T R R Q M R D E L L Q R M P R Y I R D I K D N E R T L R R Y K T Q D M V L F L L A E K M F T N I I S E Q S S E F N W K Q M R L S K V C N E A F L R Q T L T F R V P V T V G E T T I Y V E Q E N M S L K N Y G E F Y R F L T D D R L M S L L N N I V E T L K P N E N G D L V I R H T D L M S E L A A Y D Q Y R S T I F M L I Q S I E N L I I T N N A V L D D P D A D G F W V R E D L P K R N N F A S L L E L I N Q L N N V E L T D D E R K L L V A I R N A F S H N S Y N I D F S L I K D V K H L P E V A K G I L Q H L Q S M L G V E I T K
Riemerel	8	M E K P L L P N V Y T L K H K F F W G A F L N I A R H N A F I T I C H I N E Q L G L K T P S N D

l a a n a t i p e s t i f e r （配列番号７５）		D K I V D V V C E T W N N I L N N D H D L L K K S Q L T E L I L K H F P F L T A M C Y H P P K K E G K K K G H Q K E Q Q K E K E S E A Q S Q A E A L N P S K L I E A L E I L V N Q L H S L R N Y Y S H Y K H K K P D A E K D I F K H L Y K A F D A S L R M V K E D Y K A H F T V N L T R D F A H L N R K G K N K Q D N P D F N R Y R F E K D G F F T E S G L L F F T N L F L D K R D A Y W M L K K V S G F K A S H K Q R E K M T T E V F C R S R I L L P K L R L E S R Y D H N Q M L L D M L S E L S R C P K L L Y E K L S E E N K K H F Q V E A D G F L D E I E E E Q N P F K D T L I R H Q D R F P Y F A L R Y L D L N E S F K S I R F Q V D L G T Y H Y C I Y D K K I G D E Q E K R H L T R T L L S F G R L Q D F T E I N R P Q E W K A L T K D L D Y K E T S N Q P F I S K T T P H Y H I T D N K I G F R L G T S K E L Y P S L E I K D G A N R I A K Y P Y N S G F V A H A F I S V H E L L P L M F Y Q H L T G K S E D L L K E T V R H I Q R I Y K D F E E E R I N T I E D L E K A N Q G R L P L G A F P K Q M L G L L Q N K Q P D L S E K A K I K I E K L I A E T K L L S H R L N T K L K S S P K L G K R R E K L I K T G V L A D W L V K D F M R F Q P V A Y D A Q N Q P I K S S K A N S T E F W F I R R A L A L Y G G E K N R L E G Y F K Q T N L I G N T N P H P F L N K F N W K A C R N L V D F Y Q Q Y L E Q R E K F L E A I K N Q P W E P Y Q Y C L L L K I P K E N R K N L V K G W E Q G G I S L P R G L F T E A I R E T L S E D L M L S K P I R K E I K K H G R V G F I S R A I T L Y F K E K Y Q D K H Q S F Y N L S Y K L E A K A P L L K R E E H Y E Y W Q Q N K P Q S P T E S Q R L E L H T S D R W K D Y L L Y K R W Q H L E K K L R L Y R N Q D V M L W L M T L E L T K N H F K E L N L N Y H Q L K L E N L A V N V Q E A D A K L N P L N Q T L P M V L P V K V Y P A T A F G E V Q Y H K T P I R T V Y I R E E H T K A L K M G N F K A L V K D R R L N G L F S F I K E E N D T Q K H P I S Q L R L R R E L E I Y Q S L R V D A F K E T L S L E E K L L N K H T S L S S L E N E F R A L L E E W K K E Y A A S S M V T D E H I A F I A S V R N A F C H N Q Y P F Y K E A L H A

10 20 30 40

		P I P L F T V A Q P T T E E K D G L G I A E A L L K V L R E Y C E I V K S Q I
P r e v o t e l l a a u r a n t i a c a（配列番号７６）	9	M E D D K K T T G S I S Y E L K D K H F W A A F L N L A R H N V Y I T I N H I N K L L E I R E I D N D E K V L D I K T L W Q K G N K D L N Q K A R L R E L M T K H F P F L E T A I Y T K N K E D K K E V K Q E K Q A E A Q S L E S L K D C L F L F L D K L Q E A R N Y Y S H Y K Y S E F S K E P E F E E G L L E K M Y N I F G N N I Q L V I N D Y Q H N K D I N P D E D F K H L D R K G Q F K Y S F A D N E G N I T E S G L L F F V S L F L E K K D A I W M Q Q K L N G F K D N L E N K K K M T H E V F C R S R I L M P K L R L E S T Q T Q D W I L L D M L N E L I R C P K S L Y E R L Q G D D R E K F K V P F D P A D E D Y N A E Q E P F K N T L I R H Q D R F P Y F V L R Y F D Y N E I F K N L R F Q I D L G T Y H F S I Y K K L I G G Q K E D R H L T H K L Y G F E R I Q E F A K Q N R P D E W K A I V K D L D T Y E T S N K R Y I S E T T P H Y H L E N Q K I G I R F R N G N K E I W P S L K T N D E N N E K S K Y K L D K Q Y Q A E A F L S V H E L L P M M F Y Y L L L K K E K P N N D E I N A S I V E G F I K R E I R N I F K L Y D A F A N G E I N N I D D L E K Y C A D K G I P K R H L P K Q M V A I L Y D E H K D M V K E A K R K Q K E M V K D T K K L L A T L E K Q T Q K E K E D D G R N V K L L K S G E I A R W L V N D M M R F Q P V Q K D N E G K P L N N S K A N S T E Y Q M L Q R S L A L Y N N E E K P T R Y F R Q V N L I E S N N P H P F L K W T K W E E C N N I L T F Y Y S Y L T K K I E F L N K L K P E D W K K N Q Y F L K L K E P K T N R E T L V Q G W K N G F N L P R G I F T E P I R E W F K R H Q N N S K E Y E K V E A L D R V G L V T K V I P L F F K E E Y F K D K E E N F K E D T Q K E I N D C V Q P F Y N F P Y N V G N I H K P K E K D F L H R E E R I E L W D K K K D K F K G Y K E K I K S K K L T E K D K E E F R S Y L E F Q S W N K F E R E L R L V R N Q D I V T W L L C K E L I D K L K I D E L N I E E L K K L R L N N I D T D T A K K E K N N I L N R V M P M E L P V T V Y E I D D S H K I V K D K P L H T I Y I K E A E T K L L K Q G N F

		K A L V K D R R L N G L F S F V K T N S E A E S K R N P I S K L R V E Y E L G E Y Q E A R I E I I Q D M L A L E E K L I N K Y K D L P T N K F S E M L N S W L E G K D E A D K A R F Q N D V D F L I A V R N A F S H N Q Y P M H N K I E F A N I K P F S L Y T A N N S E E K G L G I A N Q L K D K T K E T T D K I K K I E K P I E T K E
Prevotella sacharolytica（配列番号７７）	１０	M E D K P F W A A F F N L A R H N V Y L T V N H I N K L L D L E K L Y D E G K H K E I F E R E D I F N I S D D V M N D A N S N G K K R K L D I K K I W D D L D T D L T R K Y Q L R E L I L K H F P F I Q P A I I G A Q T K E R T T I D K D K R S T S T S N D S L K Q T G E G D I N D L L S L S N V K S M F F R L L Q I L E Q L R N Y Y S H V K H S K S A T M P N F D E D L L N W M R Y I F I D S V N K V K E D Y S S N S V I D P N T S F S H L I Y K D E Q G K I K P C R Y P F T S K D G S I N A F G L L F F V S L F L E K Q D S I W M Q K K I P G F K K A S E N Y M K M T N E V F C R N H I L L P K I R L E T V Y D K D W M L L D M L N E V V R C P L S L Y K R L T P A A Q N K F K V P E K S S D N A N R Q E D D N P F S R I L V R H Q N R F P Y F V L R F F D L N E V F T T L R F Q I N L G C Y H F A I C K K Q I G D K K E V H H L I R T L Y G F S R L Q N F T Q N T R P E E W N T L V K T T E P S S G N D G K T V Q G V P L P Y I S Y T I P H Y Q I E N E K I G I K I F D G D T A V D T D I W P S V S T E K Q L N K P D K Y T L T P G F K A D V F L S V H E L L P M M F Y Y Q L L L C E G M L K T D A G N A V E K V L I D T R N A I F N L Y D A F V Q E K I N T I T D L E N Y L Q D K P I L I G H L P K Q M I D L L K G H Q R D M L K A V E Q K K A M L I K D T E R R L K L L D K Q L K Q E T D V A A K N T G T L L K N G Q I A D W L V N D M M R F Q P V K R D K E G N P I N C S K A N S T E Y Q M L Q R A F A F Y A T D S C R L S R Y F T Q L H L I H S D N S H L F L S R F E Y D K Q P N L I A F Y A A Y L K A K L E F L N E L Q P Q N W A S D N Y F L L L R A P K N D R Q K L A E G W K N G F N L P R G L F T E K I K T W F N E H K T I V D I S D C D I F K N R V G Q V A R L I P V F F D K K F K D H S Q P F Y R Y D F N V G N V S K P

		TEANYLSKGKREELFKSYQNKFKN NIPAEKTKEYREYKNFSLWKKFER ELRLIKNQDILIWLMCKNLFDEKI KPKKDILEPRIAVSYIKLDSLQTN TSTAGSLNALAKVVPMTLAIHIDS PKPKGKAGNNEKENKEFTVYIKEE GTKLLKWGNFKTLLADRRIKGLFS YIEHDDIDLKQHPLTKRRVDLELD LYQTCRIDIFQQTLGLEAQLLDKY SDLNTDNFYQMLIGWRKKEGIPRN IKEDTDFLKDVRNAFSHNQYPDSK KIAFRRIRKFNPKELILEEEEGLG IATQMYKEVEKVVNRIKRIELFD
HMPREF9712_03108[Myroides odoratimimus CCUG10230]（配列番号78）	11	MKDILTTDTTEKQNRFYSHKIADK YFFGGYFNLASNNIYEVFEEVNKR NTFGKLAKRDNGNLKNYIIHVFKD ELSISDFEKRVAIFASYFPILETV DKKSIKERNRTIDLTLSQRIRQFR EMLISLVTAVDQLRNFYTHYHHSD IVIENKVLDFLNSSFVSTALHVKD KYLKTDKTKEFLKETIAAELDILI EAYKKKQIEKKNTRFKANKREDIL NAIYNEAFWSFINDKDKDKDKETV VAKGADAYFEKNHHKSNDPDFALN ISEKGIVYLLSFFLTNKEMDSLKA NLTGFKGKVDRESGNSIKYMATQR IYSFHTYRGLKQKIRTSEEGVKET LLMQMIDELSKVPNVVYQHLSTTQ QNSFIEDWNEYYKDYEDDVETDDL SRVIHPVIRKRYEDRFNYFAIRFL DEFFDFPTLRFQVHLGDYVHDRRT KQLGKVESDRIIKEKVTVFARLKD INSAKASYFHSLEEQDKEELDNKW TLFPNPSYDFPKEHTLQHQGEQKN AGKIGIYVKLRDTQYKEKAALEEA RKSLNPKERSATKASKYDIITQII EANDNVKSEKPLVFTGQPIAYLSM NDIHSMLFSLLTDNAELKKTPEEV EAKLIDQIGKQINEILSKDTDTKI LKKYKDNDLKETDTDKITRDLARD KEEIEKLILEQKQRADDYNYTSST KFNIDKSRKRKHLLFNAEKGKIGV

		WLANDIKRFMFKESKSKWKGYQHT ELQKLFAYFDTSKSDLELILSNMV MVKDYPIELIDLVKKSRTLVDFLN KYLEARLEYIENVITRVKNSIGTP QFKTVRKECFTFLKKSNYTVVSLD KQVERILSMPLFIERGFMDDKPTM LEGKSYKQHKEKFADWFVHYKENS NYQNFYDTEVYEITTEDKREKAKV TKKIKQQQKNDVFTLMMVNYMLEE VLKLSSNDRLSLNELYQTKEERIV NKQVAKDTQERNKNYIWNKVVDLQ LCDGLVHIDNVKLKDIGNFRKYEN DSRVKEFLTYQSDIVWSAYLSNEV DSNKLYVIERQLDNYESIRSKELL KEVQEIECSVYNQVANKESLKQSG NENFKQYVLQGLLPIGMDVREMLI LSTDVKFKKEEIIQLGQAGEVEQD LYSLIYIRNKFAHNQLPIKEFFDF CENNYRSISDNEYYAEYYMEIFRS IKEKYAN
Prevotella intermedia（配列番号79）	12	MEDDKKTTDSIRYELKDKHFWAAF LNLARHNVYITVNHINKILEEDEI NRDGYENTLENSWNEIKDINKKDR LSKLIIKHFPFLEATTYRQNPTDT TKQKEEKQAEAQSLESLKKSFFVF IYKLRDLRNHYSHYKHSKSLERPK FEEDLQNKMYNIFDVSIQFVKEDY KHNTDINPKKDFKHLDRKRKGKFH YSFADNEGNITESGLLFFVSLFLE KKDAIWVQKKLEGFKCSNKSYQKM TNEVFCRSRMLLPKLRLESTQTQD WILLDMLNELIRCPKSLYERLQGV NRKKFYVSFDPADEDYDAEQEPFK NTLVRHQDRFPYFALRYFDYNEVF ANLRFQIDLGTYHFSIYKKLIGGQ KEDRHLTHKLYGFERIQEFDKQNR PDEWKAIVKDSDTFKKKEEKEEEK PYISETTPHYHLENKKIGIAFKNH NIWPSTQTELTNNKRKKYNLGTSI KAEAFLSVHELLPMMFYYLLLKTE NTKNDNKVGGKKETKKQGKHKIEA IIESKIKDIYALYDAFANGEINSE

		D E L K E Y L K G K D I K I V H L P K Q M I A I L K N E H K D M A E K A E A K Q E K M K L A T E N R L K T L D K Q L K G K I Q N G K R Y N S A P K S G E I A S W L V N D M M R F Q P V Q K D E N G E S L N N S K A N S T E Y Q L L Q R T L A F F G S E H E R L A P Y F K Q T K L I E S S N P H P F L N D T E W E K C S N I L S F Y R S Y L K A R K N F L E S L K P E D W E K N Q Y F L M L K E P K T N R E T L V Q G W K N G F N L P R G F F T E P I R K W F M E H W K S I K V D D L K R V G L V A K V T P L F F S E K Y K D S V Q P F Y N Y P F N V G D V N K P K E E D F L H R E E R I E L W D K K K D K F K G Y K A K K K F K E M T D K E K E E H R S Y L E F Q S W N K F E R E L R L V R N Q D I V T W L L C T E L I D K L K I D E L N I K E L K K L R L K D I N T D T A K K E K N N I L N R V M P M E L P V T V Y K V N K G G Y I I K N K P L H T I Y I K E A E T K L L K Q G N F K A L V K D R R L N G L F S F V K T P S E A E S E S N P I S K L R V E Y E L G K Y Q N A R L D I I E D M L A L E K K L I D K Y N S L D T D N F H N M L T G W L E L K G E A K K A R F Q N D V K L L T A V R N A F S H N Q Y P M Y D E N L F G N I E R F S L S S S N I I E S K G L D I A A K L K E E V S K A A K K I Q N E E D N K K E K E T
C a p n o c y t o p h a g a c a n i m o r s u s（配列番号８０）	１３	M K N I Q R L G K G N E F S P F K K E D K F Y F G G F L N L A N N N I E D F F K E I I T R F G I V I T D E N K K P K E T F G E K I L N E I F K K D I S I V D Y E K W V N I F A D Y F P F T K Y L S L Y L E E M Q F K N R V I C F R D V M K E L L K T V E A L R N F Y T H Y D H E P I K I E D R V F Y F L D K V L L D V S L T V K N K Y L K T D K T K E F L N Q H I G E E L K E L C K Q R K D Y L V G K G K R I D K E S E I I N G I Y N N A F K D F I C K R E K Q D D K E N H N S V E K I L C N K E P Q N K K Q K S S A T V W E L C S K S S S K Y T E K S F P N R E N D K H C L E V P I S Q K G I V F L L S F F L N K G E I Y A L T S N I K G F K A K I T K E E P V T Y D K N S I R Y M A T H R M F S F L A Y K G L K R K I R T S E I N Y N E D G Q A S S T Y E K E T L M L Q M L D E L N K V P D V V Y Q N L S E D V Q K T F I E D W N E Y L K E

		N N G D V G T M E E E Q V I H P V I R K R Y E D K F N Y F A I R F L D E F A Q F P T L R F Q V H L G N Y L C D K R T K Q I C D T T T E R E V K K K I T V F G R L S E L E N K K A I F L N E R E E I K G W E V F P N P S Y D F P K E N I S V N Y K D F P I V G S I L D R E K Q P V S N K I G I R V K I A D E L Q R E I D K A I K E K K L R N P K N R K A N Q D E K Q K E R L V N E I V S T N S N E Q G E P V V F I G Q P T A Y L S M N D I H S V L Y E F L I N K I S G E A L E T K I V E K I E T Q I K Q I I G K D A T T K I L K P Y T N A N S N S I N R E K L L R D L E Q E Q Q I L K T L L E E Q Q Q R E K D K K D K K S K R K H E L Y P S E K G K V A V W L A N D I K R F M P K A F K E Q W R G Y H H S L L Q K Y L A Y Y E Q S K E E L K N L L P K E V F K H F P F K L K G Y F Q Q Q Y L N Q F Y T D Y L K R R L S Y V N E L L L N I Q N F K N D K D A L K A T E K E C F K F F R K Q N Y I I N P I N I Q I Q S I L V Y P I F L K R G F L D E K P T M I D R E K F K E N K D T E L A D W F M H Y K N Y K E D N Y Q K F Y A Y P L E K V E E K E K F K R N K Q I N K Q K K N D V Y T L M M V E Y I I Q K I F G D K F V E E N P L V L K G I F Q S K A E R Q Q N N T H A A T T Q E R N L N G I L N Q P K D I K I Q G K I T V K G V K L K D I G N F R K Y E I D Q R V N T F L D Y E P R K E W M A Y L P N D W K E K E K Q G Q L P P N N V I D R Q I S K Y E T V R S K I L L K D V Q E L E K I I S D E I K E E H R H D L K Q G K Y Y N F K Y Y I L N G L L R Q L K N E N V E N Y K V F K L N T N P E K V N I T Q L K Q E A T D L E Q K A F V L T Y I R N K F A H N Q L P K K E F W D Y C Q E K Y G K I E K E K T Y A E Y F A E V F K R E K E A L I K
P o r p h y r o m o n a s g u l a e（配列番号８１）	１４	M T E Q S E R P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F L N L A R H N A Y I T L T H I D R Q L A Y S K A D I T N D Q D V L S F K A L W K N F D N D L E R K S R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S K S S G N K S S K N K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H S G S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K I D H E H N D E V D P H Y H F N H L V R K G K K D R Y G H N D N P

		S F K H H F V D G E G M V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E T Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R M D D W M L L D M L N E L V R C P K P L Y D R L R E D D R A C F R V P V D I L P D E D D T D G G G E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K M I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I S Q T S P H Y H I E K G K I G L R F M P E G Q H L W P S P E V G T T R T G R S K Y A Q D K R L T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E V S A E R V Q G R I K R V I E D V Y A V Y D A F A R D E I N T R D E L D A C L A D K G I R R G H L P R Q M I A I L S Q E H K D M E E K I R K K L Q E M M A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D A S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L R A R K A F L E R I G R S D R V E N R P F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K G E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G H D E V A S Y K E V G F M A K A V P L Y F E R A C E D R V Q P F Y D S P F N V G N S L K P K K G R F L S K E E R A E E W E R G K E R F R D L E A W S Y S A A R R I E D A F A G I E Y A S P G N K K K I E Q L L R D L S L W E A F E S K L K V R A D R I N L A K L K K E I L E A Q E H P Y H D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R P N V Q E Q G S L N V L N R V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E E A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G G L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C V F E L T L R L E E S L L T R Y P H L P D E S F R E M L E S W S D P L L A K W P E L H G K V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E A V F S S I R K Y D P S S P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E T V E R I I Q A
Prev otel	15	M N I P A L V E N Q K K Y F G T Y S V M A M L N A Q T V L D H I Q K V A D I E G E Q N E N N E N

l a s p . P 5 － 1 2 5 （配列番号８２）		L W F H P V M S H L Y N A K N G Y D K Q P E K T M F I I E R L Q S Y F P F L K I M A E N Q R E Y S N G K Y K Q N R V E V N S N D I F E V L K R A F G V L K M Y R D L T N H Y K T Y E E K L N D G C E F L T S T E Q P L S G M I N N Y Y T V A L R N M N E R Y G Y K T E D L A F I Q D K R F K F V K D A Y G K K K S Q V N T G F F L S L Q D Y N G D T Q K K L H L S G V G I A L L I C L F L D K Q Y I N I F L S R L P I F S S Y N A Q S E E R R I I I R S F G I N S I K L P K D R I H S E K S N K S V A M D M L N E V K R C P D E L F T T L S A E K Q S R F R I I S D D H N E V L M K R S S D R F V P L L L Q Y I D Y G K L F D H I R F H V N M G K L R Y L L K A D K T C I D G Q T R V R V I E Q P L N G F G R L E E A E T M R K Q E N G T F G N S G I R I R D F E N M K R D D A N P A N Y P Y I V D T Y T H Y I L E N N K V E M F I N D K E D S A P L L P V I E D D R Y V V K T I P S C R M S T L E I P A M A F H M F L F G S K K T E K L I V D V H N R Y K R L F Q A M Q K E E V T A E N I A S F G I A E S D L P Q K I L D L I S G N A H G K D V D A F I R L T V D D M L T D T E R R I K R F K D D R K S I R S A D N K M G K R G F K Q I S T G K L A D F L A K D I V L F Q P S V N D G E N K I T G L N Y R I M Q S A I A V Y D S G D D Y E A K Q Q F K L M F E K A R L I G K G T T E P H P F L Y K V F A R S I P A N A V E F Y E R Y L I E R K F Y L T G L S N E I K K G N R V D V P F I R R D Q N K W K T P A M K T L G R I Y S E D L P V E L P R Q M F D N E I K S H L K S L P Q M E G I D F N N A N V T Y L I A E Y M K R V L D D D F Q T F Y Q W N R N Y R Y M D M L K G E Y D R K G S L Q H C F T S V E E R E G L W K E R A S R T E R Y R K Q A S N K I R S N R Q M R N A S S E E I E T I L D K R L S N S R N E Y Q K S E K V I R R Y R V Q D A L L F L L A K K T L T E L A D F D G E R F K L K E I M P D A E K G I L S E I M P M S F T F E K G G K K Y T I T S E G M K L K N Y G D F F V L A S D K R I G N L L E L V G S D I V S K E D I M E E F N K Y D Q C R P E I S S I V F N L E K W A F D T Y P E L S A R V D R E E K V D F K S I L K I L L N N K N I N K E Q S D I L R K I R N A F

10 20 30 40

		DHNNYPDKGVVEIKALPEIAMSIK KAFGEYAIMK
Flavobacteriumbranchiophilum（配列番号83）	16	MENLNKILDKENEICISKIFNTKG IAAPITEKALDNIKSKQKNDLNKE ARLHYFSIGHSFKQIDTKKVFDYV LIEELKDEKPLKFITLQKDFFTKE FSIKLQKLINSIRNINNHYVHNFN DINLNKIDSNVFHFLKESFELAII EKYYKVNKKYPLDNEIVLFLKELF IKDENTALLNYFTNLSKDEAIEYI LTFTITENKIWNINNEHNILNIEK GKYLTFEAMLFLITIFLYKNEANH LLPKLYDFKNNKSKQELFTFFSKK FTSQDIDAEEGHLIKFRDMIQYLN HYPTAWNNDLKLESENKNKIMTTK LIDSIIEFELNSNYPSFATDIQFK KEAKAFLFASNKKRNQTSFSNKSY NEEIRHNPHIKQYRDEIASALTPI SFNVKEDKFKIFVKKHVLEEEYFPN SIGYEKFLEYNDFTEKEKEDFGLK LYSNPKTNKLIERIDNHKLVKSHG RNQDRFMDFSMRFLAENNYFGKDA FFKCYKFYDTQEQDEFLQSNENND DVKFHKGKVTTYIKYEEHLKNYSY WDCPFVEENNSMSVKISIGSEEKI LKIQRNLMIYFLENALYNENVENQ GYKLVNNYYRELKKDVEESIASLD LIKSNPDFKSKYKKILPKRLLHNY APAKQDKAPENAFETLLKKADFRE EQYKKLLKKAEHEKNKEDFVKRNK GKQFKLHFIRKACQMMMYFKEKYNT LKEGNAAFEKKDPVIEKRKNKEHE FGHHKNLNITREEFNDYCKWMFAF NGNDSYKKYLRDLFSEKHFFDNQE YKNLFESSVNLEAFYAKTKELFKK WIETNKPTNNENRYTLENYKNLIL QKQVFINVYHFSKYLIDKNLLNSE NNVIQYKSLENVEYLISDFYFQSK LSIDQYKTCGKLFNKLKSNKLEDC LLYEIAYNYIDKKNVHKIDIQKIL TSKIILTINDANTPYKISVPFNKL ERYTEMIAIKNQNNLKARFLIDLP

10

20

30

40

		L Y L S K N K I K K G K D S A G Y E I I I K N D L E I E D I N T I N N K I I N D S V K F T E V L M E L E K Y F I L K D K C I L S K N Y I D N S E I P S L K Q F S K V W I K E N E N E I I N Y R N I A C H F H L P L L E T F D N L L L N V E Q K F I K E E L Q N V S T I N D L S K P Q E Y L I L L F I K F K H N N F Y L N L F N K N E S K T I K N D K E V K K N R V L Q K F I N Q V I L K K K
M y r o i d e s o d o r a t i m i m u s（配列番号８４）	１７	M K D I L T T D T T E K Q N R F Y S H K I A D K Y F F G G Y F N L A S N N I Y E V F E E V N K R N T F G K L A K R D N G N L K N Y I I H V F K D E L S I S D F E K R V A I F A S Y F P I L E T V D K K S I K E R N R T I D L T L S Q R I R Q F R E M L I S L V T A V D Q L R N F Y T H Y H H S D I V I E N K V L D F L N S S F V S T A L H V K D K Y L K T D K T K E F L K E T I A A E L D I L I E A Y K K K Q I E K K N T R F K A N K R E D I L N A I Y N E A F W S F I N D K D K D K D K E T V V A K G A D A Y F E K N H H K S N D P D F A L N I S E K G I V Y L L S F F L T N K E M D S L K A N L T G F K G K V D R E S G N S I K Y M A T Q R I Y S F H T Y R G L K Q K I R T S E E G V K E T L L M Q M I D E L S K V P N V V Y Q H L S T T Q Q N S F I E D W N E Y Y K D Y E D D V E T D D L S R V T H P V I R K R Y E D R F N Y F A I R F L D E F F D F P T L R F Q V H L G D Y V H D R R T K Q L G K V E S D R I I K E K V T V F A R L K D I N S A K A S Y F H S L E E Q D K E E L D N K W T L F P N P S Y D F P K E H T L Q H Q G E Q K N A G K I G I Y V K L R D T Q Y K E K A A L E E A R K S L N P K E R S A T K A S K Y D I I T Q I I E A N D N V K S E K P L V F T G Q P I A Y L S M N D I H S M L F S L L T D N A E L K K T P E E V E A K L I D Q I G K Q I N E I L S K D T D T K I L K K Y K D N D L K E T D T D K I T R D L A R D K E E I E K L I L E Q K Q R A D D Y N Y T S S T K F N I D K S R K R K H L L F N A E K G K I G V W L A N D I K R F M F K E S K S K W K G Y Q H I E L Q K L F A Y F D T S K S D L E L I L S N M V M V K D Y P I E L I D L V K K S R T L V D F L N K Y L E A R L E Y I E N V I T R V K N S I G T P Q F K T V R K E C F T F L K K S N Y T V V S L D

		K Q V E R I L S M P L F I E R G F M D D K P T M L E G K S Y K Q H K E K F A D W F V H Y K E N S N Y Q N F Y D T E V Y E I T T E D K R E K A K V T K K I K Q Q Q K N D V F T L M M V N Y M L E E V L K L S S N D R L S L N E L Y Q T K E E R I V N K Q V A K D T Q E R N K N Y I W N K V V D L Q L C D G L V H I D N V K L K D I G N F R K Y E N D S R V K E F L T Y Q S D I V W S A Y L S N E V D S N K L Y V I E R Q L D N Y E S I R S K E L L K E V Q E I E C S V Y N Q V A N K E S L K Q S G N E N F K Q Y V L Q G L L P I G M D V R E M L I L S T D V K F K K E E I I Q L G Q A G E V E Q D L Y S L I Y I R N K F A H N Q L P I K E F F D F C E N N Y R S I S D N E Y Y A E Y Y M E I F R S I K E K Y A N
F l a v o b a c t e r i u m c o l u m n a r e（配列番号８５）	１８	M S S K N E S Y N K Q K T F N H Y K Q E D K Y F F G G F L N N A D D N L R Q V G K E F K T R I N F N H N N N E L A S V F K D Y F N K E K S V A K R E H A L N L L S N Y F P V L E R I Q K H T N H N F E Q T R E I F E L L L D T I K K L R D Y Y T H H Y H K P I T I N P K I Y D F L D D T L L D V L I T I K K K K V K N D T S R E L L K E K L R P E L T Q L K N Q K R E E L I K K G K K L L E E N L E N A V F N H C L I P F L E E N K T D D K Q N K T V S L R K Y R K S K P N E E T S I T L T Q S G L V F L M S F F L H R K E F Q V F T S G L E R F K A K V N T I K E E E I S L N K N N I V Y M I T H W S Y S Y Y N F K G L K H R I K T D Q G V S T L E Q N N T T H S L T N T N T K E A L L T Q I V D Y L S K V P N E I Y E T L S E K Q Q K E F E E D I N E Y M R E N P E N E D S T F S S I V S H K V I R K R Y E N K F N Y F A M R F L D E Y A E L P T L R F M V N F G D Y I K D R Q K K I L E S I Q F D S E R I I K K E I H L F E K L S L V T E Y K K N V Y L K E T S N I D L S R F P L F P N P S Y V M A N N N I P F Y I D S R S N N L D E Y L N Q K K K A Q S Q N K K R N L T F E K Y N K E Q S K D A I I A M L Q K E I G V K D L Q Q R S T I G L L S C N E L P S M L Y E V I V K D I K G A E L E N K I A Q K I R E Q Y Q S I R D F T L D S P Q K D N I P T T L I K T I N T D S S V T F E N Q P I D I P R L K N A L Q K E L T L T Q E K L L N

		V K E H E I E V D N Y N R N K N T Y K F K N Q P K N K V D D K K L Q R K Y V F Y R N E I R Q E A N W L A S D L I H F M K N K S L W K G Y M H N E L Q S F L A F F E D K K N D C I A L L E T V F N L K E D C I L T K G L K N L F L K H G N F I D F Y K E Y L K L K E D F L S T E S T F L E N G F I G L P P K I L K K E L S K R L K Y I F I V F Q K R Q F I I K E L E E K K N N L Y A D A I N L S R G I F D E K P T M I P F K K P N P D E F A S W F V A S Y Q Y N N Y Q S F Y E L T P D I V E R D K K K K Y K N L R A I N K V K I Q D Y Y L K L M V D T L Y Q D L F N Q P L D K S L S D F Y V S K A E R E K I K A D A K A Y Q K L N D S S L W N K V I H L S L Q N N R I T A N P K L K D I G K Y K R A L Q D E K I A T L L T Y D A R T W T Y A L Q K P E K E N E N D Y K E L H Y T A L N M E L Q E Y E K V R S K E L L K Q V Q E L E K K I L D K F Y D F S N N A S H P E D L E I E D K K G K R H P N F K L Y I T K A L L K N E S E I I N L E N I D I E I L L K Y Y D Y N T E E L K E K I K N M D E D E K A K I I N T K E N Y N K I T N V L I K K A L V L I I I R N K M A H N Q Y P P K F I Y D L A N R F V P K K E E E Y F A T Y F N R V F E T I T K E L W E N K E K K D K T Q V
P o r p h y r o m o n a s g i n g i v a l i s （配列番号８６）	１９	M T E Q N E K P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F L N L A R H N A Y I T L A H I D R Q L A Y S K A D I T N D E D I L F F K G Q W K N L D N D L E R K A R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S Q S S G N K S S K K K E L S K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H P E S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V D P H R H F N H L V R K G K K D K Y G N N D N P F F K H H F V D R E G T V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E A Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K S L Y D R L R E E D R A R F R V P V D I L S D E D D T D G T E E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K N I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D

		K P Y I T Q T T P H Y H I E K G K I G L R F V P E G Q H L W P S P E V G A T R T G R S K Y A Q D K R L T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E V S A E K V Q G R I K R V I E D V Y A V Y D A F A R D E I N T R D E L D A C L A D K G I R R G H L P R Q M I A I L S Q E H K D M E E K V R K K L Q E M I A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V V A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L E A R K A F L Q S I G R S D R V E N H R F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K G E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G Y D E V G S Y K E V G F M A K A V P L Y F E R A S K D R V Q P F Y D Y P F N V G N S L K P K K G R F L S K E K R A E E W E S G K E R F R L A K L K K E I L E A K E H P Y H D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R T D V Q E Q G S L N V L N R V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E Q A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G A L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C A F E Q T L E L E E S L L T R Y P H L P D K N F R K M L E S W S D P L L D K W P D L H G N V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E T L F S S I R K Y D P S S P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E M V E R I I Q A
Porphyromonas sp. COT－052 OH4946（配列番号87）	20	M T E Q S E R P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F L N L A R H N A Y I T L T H I D R Q L A Y S K A D I T N D Q D V L S F K A L W K N F D N D L E R K S R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S K S S G N K S S K N K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H S E S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V D P H R H F N H L V R K G K K D R Y G H N D N P S F K H H F V D S E G M V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E T Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K P L Y D R L

		R E D D R A C F R V P V D I L P D E D D T D G G G E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K M I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I S Q T T P H Y H I E K G K I G L R F V P E G Q H L W P S P E V G T T R T G R S K Y A Q D K R L T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E V S A E K V Q G R I K R V I E D V Y A I Y D A F A R D E I N T L K E L D A C L A D K G I R R G H L P K Q M I G I L S Q E R K D M E E K V R K K L Q E M I A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L R A R K A F L E R I G R S D R V E N C P F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K G E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G Y D E V G S Y R E V G F M A K A V P L Y F E R A C E D R V Q P F Y D S P F N V G N S L K P K K G R F L S K E D R A E E W E R G K E R F R D L E A W S H S A A R R I K D A F A G I E Y A S P G N K K K I E Q L L R D L S L W E A F E S K L K V R A D K I N L A K L K K E I L E A Q E H P Y H D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R P N V Q E Q G S L N V L N R V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E E A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G G L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C V F E L T L R L E E S L L S R Y P H L P D E S F R E M L E S W S D P L L A K W P E L H G K V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E A V F S S I R K Y D P S S P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E T V E R I I Q A
P r e v o t e l l a i n t e r m e d i a （配列	2 1	M E D D K K T K E S T N M L D N K H F W A A F L N L A R H N V Y I T V N H I N K V L E L K N K K D Q D I I I D N D Q D I L A I K T H W E K V N G D L N K T E R L R E L M T K H F P F L E T A I Y T K N K E D K E E V K Q E K Q A K A Q S F D S L K H C L F L F L E K L Q E A R N Y Y S H Y K Y S

番号88）		ESTKEPMLEKELLKKMYNIFDDNI QLVIKDYQHNKDINPDEDFKHLDR TEEEFNYYFTTNKKGNITASGLLF FVSLFLEKKDAIWMQQKLRGFKDN RESKKKMTHEVFCRSRMLLPKLRL ESTQTQDWILLDMLNELIRCPKSL YERLQGEYRKKFNVPFDSADEDYD AEQEPFKNTLVRHQDRFPYFALRY FDYNEIFTNLRFQIDLGTYHFSIY KKLIGGQKEDRHLTHKLYGFERIQ EFAKQNRTDEWKAIVKDFDTYETS EEPYISETAPHYHLENQKIGIRFR NDNDEIWPSLKTNGENNEKRKYKL DKQYQAEAFLSVHELLPMMFYYLL LKKEEPNNDKKNASIVEGFIKREI RDIYKLYDAFANGEINNIDDLEKY CEDKGIPKRHLPKQMVAILYDEHK DMAEEAKRKQKEMVKDTKKLLATL EKQTQGEIEDGGRNIRLLKSGEIA RWLVNDMMRFQPVQKDNEGNPLNN SKANSTEYQMLQRSLALYNKEEKP TRYFRQVNLINSSNPHPFLKWTKW EECNNILSFYRSYLTKKIEFLNKL KPEDWEKNQYFLKLKEPKTNRETL VQGWKNGFNLPRGIFTEPIREWFK RHQNDSEEYEKVETLDRVGLVTKV IPLFFKKEDSKDKEEYLKKDAQKE INNCVQPFYGFPYNVGNIHKPDEK DFLPSEERKKLWGDKKYKFKGYKA KVKSKKLTDKEKEEYRSYLEFQSW NKFERELRLVRNQDIVTWLLCTEL IDKLKVEGLNVEELKKLRLKDIDT DTAKQEKNNILNRVMPMQLPVTVY EIDDSHNIVKDRPLHTVYIEETKT KLLKQGNFKALVKDRRLNGLFSFV DTSSETELKSNPISKSLVEYELGE YQNARIETIKDMLLLEETLIEKYK TLPTDNFSDMLNGWLEGKDEADKA RFQNDVKLLVAVRNAFSHNQYPMR NRIAFANINPFSLSSADTSEEKKL DIANQLKDKTHKIIKRIIEIEKPI ETKE	

PIN17_0200[Prevotella intermedia 17](配列番号89)	AFJ0752 3	MKMEDDKKTKESTNMLDNKHFWAA FLNLARHNVYITVNHINKVLELKN KKDQDIIIDNDQDILAIKTHWEKV NGDLNKTERLRELMTKHFPFLETA IYTKNKEDKEEVKQEKQAKAQSFD SLKHCLFLFLEKLQEARNYYSHYK YSESTKEPMLEKELLKKMYNIFDD NIQLVIKDYQHNKDINPDEDFKHL DRTEEEFNYYFTTNKKGNITASGL LFFVSLFLEKKDAIWMQQKLRGFK DNRESKKKMTHEVFCRSRMLLPKL RLESTQTQDWILLDMLNELIRCPK SLYERLQGEYRKKFNVPFDSADED YDAEQEPFKNTLVRHQDRFPYFAL RYFDYNEIFTNLRFQIDLGTYHFS IYKKLIGGQKEDRHLTHKLYGFER IQEFAKQNRTDEWKAIVKDFDTYE TSEEPYISETAPHYHLENQKIGIR FRNDNDEIWPSLKTNGENNEKRKY KLDKQYQAEAFLSVHELLPMMFYY LLLKKEEPNNDKKNASIVEGFIKR EIRDIYKLYDAFANGEINNIDDLE KYCEDKGIPKRHLPKQMVAILYDE HKDMAEEAKRKQKEMVKDTKKLLA TLEKQTQGEIEDGGRNIRLLKSGE IARWLVNDMMRFQPVQKDNEGNPL NNSKANSTEYQMLQRSLALYNKEE KPTRYFRQVNLINSSNPHPFLKWT KWEECNNILSFYRSYLTKKIEFLN KLKPEDWEKNQYFLKLKEPKTNRE TLVQGWKNGFNLPRGIFTEPIREW FKRHQNDSEEYEKVETLDRVGLVT KVIPLFFKKEDSKDKEEYLKKDAQ KEINNCVQPFYGFPYNVGNIHKPD EKDFLPSEERKKLWGDKKYKFKGY KAKVKSKKLTDKEKEEYRSYLEFQ SWNKFERELRLVRNQDIVTWLLCT ELIDKLKVEGLNVEELKKLRLKDI DTDTAKQEKNNILNRVMPMQLPVT VYEIDDSHNIVKDRPLHTVYIEET KTKLLKQGNFKALVKDRRLNGLFS FVDTSSETELKSNPISKSLVEYEL

		GEYQNARIETIKDMLLLEETLIEK YKTLPTDNFSDMLNGWLEGKDEAD KARFQNDVKLLVAVRNAFSHNQYP MRNRIAFANINPFSLSSADTSEEK KLDIANQLKDKTHKIIKRIIEIEK PIETKE
Prevotella intermedia（配列番号90）	BAU18623	MEDDKKTTDSISYELKDKHFWAAF LNLARHNVYITVNHINKVLELKNK KDQDIIIDNDQDILAIKTHWEKVN GDLNKTERLREMTKHFPFLETAI YSKNKEDKEEVKQEKQAKAQSFDS LKHCLFLFLEKLQETRNYYSHYKY SESTKEPMLEKELLKKMYNIFDDN IQLVIKDYQHNKDINPDEDFKHLD RTEEDFNYYFTRNKKGNITESGLL FFVSLFLEKKDAIWMQQKLRGFKD NRESKKKMTHEVFCRSRMLLPKLR LESTQTQDWILLDMLNELIRCPKS LYERLQGEDREKFKVPFDPADEDY DAEQEPFKNTLVRHQDRFPYFALR YFDYNEIFTNLRFQIDLGTFHFSI YKKLIGGQKEDRHLTHKLYGFERI QEFAKQNRPDEWKAIVKDLDTYET SNERYISETTPHYHLENQKIGIRF RNDNDEIWPSLKTNGENNEKSKYK LDKQYQAEAFLSVHELLPMMFYYL LLKKEEPNNDKKNASIVEGFIKRE IRDMYKLYDAFANGEINNIDDLEK YCEDKGIPKRHLPKQMVAILYDEH KDMVKEAKRKQRKMVKDTEKLLAA LEKQTQEKTEDGGRNIRLLKSGEI ARWLVNDMMRFQPVQKDNEGNPLN NSKANSTEYQMLQRSLALYNKEEK PTRYFRQVNLINSSNPHPFLKWTK WEECNNILSFYRSYLTKKIEFLNK LKPEDWEKNQYFLKLKEPKTNRET LVQGWKNGFNLPRGIFTEPIREWF KRHQNDSKEYEKVEALDRVGLVTK VIPLFFKKEDSKDKEEDLKKDAQK EINNCVQPFYSFPYNVGNIHKPDE KDFLHREERIELWDKKKDKFKGYK AKVKSKKLTDKEKEEYRSYLEFQS

		WNKFERELRLVRNQDIVTWLLCTE LIDKLKVEGLNVEELKKLRLKDID TDTAKQEKNNILNRVMPMQLPVTV YEIDDSHNIVKDRPLHTVYIEETK TKLLKQGNFKALVKDRRLNGLFSF VDTSSEAELKSNPISKSLVEYELG EYQNARIETIKDMLLLEETLIEKY KNLPTDNFSDMLNGWLEGKDEADK ARFQNDVKLLVAVRNAFSHNQYPM RNRIAFANINPFSLSSADTSEEKK LDIANQLKDKTHKIIKRIIEIEKP IETKE
HMPREF6485_0083[Prevotella buccae ATCC 33574](配列番号91)	EFU31981	MQKQDKLFVDRKKNAIFAFPKYIT IMENKEKPEPIYYELTDKHFWAAF LNLARHNVYTTINHINRRLEIAEL KDDGYMMGIKGSWNEQAKKLDKKV RLRDLIMKHFPFLEAAAYEMTNSK SPNNKEQREKEQSEALSLNNLKNV LFIFLEKLQVLRNYYSHYKYSEES PKPIFETSLLKNMYKVFDANVRLV KRDYMHHENIDMQRDFTHLNRKKQ VGRTKNIIDSPNFHYHFADKEGNM TIAGLLFFVSLFLDKKDAIWMQKK LKGFKDGRNLREQMTNEVFCRSRI SLPKLKLENVQTKDWMQLDMLNEL VRCPKSLYERLREKDRESFKVPFD IFSDDYNAEEEPFKNTLVRHQDRF PYFVLRYFDLNEIFEQLRFQIDLG TYHFSIYNKRIGDEDEVRHLTHHL YGFARIQDFAPQNQPEEWRKLVKD LDHFETSQEPYISKTAPHYHLENE KIGIKFCSAHNNLFPSLQTDKTCN GRSKFNLGTQFTAEAFLSVHELLP MMFYYLLLTKDYSRKESADKVEGI IRKEISNIYAIYDAFANNEINSIA DLTRRLQNTNILQGHLPKQMISIL KGRQKDMGKEAERKIGEMIDDTQR RLDLLCKQTNQKIRIGKRNAGLLK SGKIADWLVNDMMRFQPVQKDQNN IPINNSKANSTEYRMLQRALALFG SENFRLKAYFNQMNLVGNDNPHPF LAETQWEHQTNILSFYRNYLEARK

10 20 30 40

		K Y L K G L K P Q N W K Q Y Q H F L I L K V Q K T N R N T L V T G W K N S F N L P R G I F T Q P I R E W F E K H N N S K R I Y D Q I L S F D R V G F V A K A I P L Y F A E E Y K D N V Q P F Y D Y P F N I G N R L K P K K R Q F L D K K E R V E L W Q K N K E L F K N Y P S E K K K T D L A Y L D F L S W K K F E R E L R L I K N Q D I V T W L M F K E L F N M A T V E G L K I G E I H L R D I D T N T A N E E S N N I L N R I M P M K L P V K T Y E T D N K G N I L K E R P L A T F Y I E E T E T K V L K Q G N F K A L V K D R R L N G L F S F A E T T D L N L E E H P I S K L S V D L E L I K Y Q T T R I S I F E M T L G L E K K L I D K Y S T L P T D S F R N M L E R W L Q C K A N R P E L K N Y V N S L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D A T L F A E V K K F T L F P S V D T K K I E L N I A P Q L L E I V G K A I K E I E K S E N K N
H M P R E F 9 1 4 4 _ 1 1 4 6 [P r e v o t e l l a p a l l e n s A T C C 7 0 0 8 2 1] (配列番号 9 2)	E G Q 1 8 4 4 4	M K E E E K G K T P V V S T Y N K D D K H F W A A F L N L A R H N V Y I T V N H I N K I L G E G E I N R D G Y E N T L E K S W N E I K D I N K K D R L S K L I I K H F P F L E V T T Y Q R N S A D T T K Q K E E K Q A E A Q S L E S L K K S F F V F I Y K L R D L R N H Y S H Y K H S K S L E R P K F E E D L Q E K M Y N I F D A S I Q L V K E D Y K H N T D I K T E E D F K H L D R K G Q F K Y S F A D N E G N I T E S G L L F F V S L F L E K K D A I W V Q K K L E G F K C S N E S Y Q K M T N E V F C R S R M L L P K L R L Q S T Q T Q D W I L L D M L N E L I R C P K S L Y E R L R E E D R K K F R V P I E I A D E D Y D A E Q E P F K N A L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D Y N E I F T N L R F Q I D L G T Y H F S I Y K K Q I G D Y K E S H H L T H K L Y G F E R I Q E F T K Q N R P D E W R K F V K T F N S F E T S K E P Y I P E T T P H Y H L E N Q K I G I R F R N D N D K I W P S L K T N S E K N E K S K Y K L D K S F Q A E A F L S V H E L L P M M F Y Y L L L K T E N T D N D N E I E T K K K E N K N D K Q E K H K I E E I I E N K I T E I Y A L Y D A F A N G K I N S I D K L E E Y C K G K D I E I G H L P K Q M I A I L K S E H K D M A T E A K R K Q E E M L A D V Q K S L E S L D N Q I N E E I E N V E R K N S S L

		K S G E I A S W L V N D M M R F Q P V Q K D N E G N P L N N S K A N S T E Y Q M L Q R S L A L Y N K E E K P T R Y F R Q V N L I E S S N P H P F L N N T E W E K C N N I L S F Y R S Y L E A K K N F L E S L K P E D W E K N Q Y F L M L K E P K T N C E T L V Q G W K N G F N L P R G I F T E P I R K W F M E H R K N I T V A E L K R V G L V A K V I P L F F S E E Y K D S V Q P F Y N Y L F N V G N I N K P D E K N F L N C E E R R E L L R K K K D E F K K M T D K E K E E N P S Y L E F Q S W N K F E R E L R L V R N Q D I V T W L L C M E L F N K K K I K E L N V E K I Y L K N I N T N T T K K E K N T E E K N G E E K I I K E K N N I L N R I M P M R L P I K V Y G R E N F S K N K K K K I R R N T F F T V Y I E E K G T K L L K Q G N F K A L E R D R R L G G L F S F V K T H S K A E S K S N T I S K S R V E Y E L G E Y Q K A R I E I I K D M L A L E E T L I D K Y N S L D T D N F H N M L T G W L K L K D E P D K A S F Q N D V D L L I A V R N A F S H N Q Y P M R N R I A F A N I N P F S L S S A N T S E E K G L G I A N Q L K D K T H K T I E K I I E I E K P I E T K E
H M P R E F 9 7 1 4 _ 0 2 1 3 2 [M y r o i d e s o d o r a t i m i m u s C C U G 1 2 9 0 1] (配列番号 9 3)	E H O 0 8 7 6 1	M K D I L T T D T T E K Q N R F Y S H K I A D K Y F F G G Y F N L A S N N I Y E V F E E V N K R N T F G K L A K R D N G N L K N Y I I H V F K D E L S I S D F E K R V A I F A S Y F P I L E T V D K K S I K E R N R T I D L T L S Q R I R Q F R E M L I S L V T A V D Q L R N F Y T H Y H H S E I V I E N K V L D F L N S S L V S T A L H V K D K Y L K T D K T K E F L K E T I A A E L D I L I E A Y K K K Q I E K K N T R F K A N K R E D I L N A I Y N E A F W S F I N D K D K D K E T V V A K G A D A Y F E K N H H K S N D P D F A L N I S E K G I V Y L L S F F L T N K E M D S L K A N L T G F K G K V D R E S G N S I K Y M A T Q R I Y S F H T Y R G L K Q K I R T S E E G V K E T L L M Q M I D E L S K V P N V V Y Q H L S T T Q Q N S F I E D W N E Y Y K D Y E D D V E T D D L S R V I H P V I R K R Y E D R F N Y F A I R F L D E F F D F P T L R F Q V H L G D Y V H D R R T K Q L G K V E S D R I I K E K V T V F A R L K D I N S A K A N Y F H S L E E Q D K E E L D N K W T L

		F P N P S Y D F P K E H T L Q H Q G E Q K N A G K I G I Y V K L R D T Q Y K E K A A L E E A R K S L N P K E R S A T K A S K Y D I I T Q I I E A N D N V K S E K P L V F T G Q P I A Y L S M N D I H S M L F S L L T D N A E L K K T P E E V E A K L I D Q I G K Q I N E I L S K D T D T K I L K K Y K D N D L K E T D T D K I T R D L A R D K E E I E K L I L E Q K Q R A D D Y N Y T S S T K F N I D K S R K R K H L L F N A E K G K I G V W L A N D I K R F M T E E F K S K W K G Y Q H T E L Q K L F A Y Y D T S K S D L D L I L S D M V M V K D Y P I E L I A L V K K S R T L V D F L N K Y L E A R L G Y M E N V I T R V K N S I G T P Q F K T V R K E C F T F L K K S N Y T V V S L D K Q V E R I L S M P L F I E R G F M D D K P T M L E G K S Y Q Q H K E K F A D W F V H Y K E N S N Y Q N F Y D T E V Y E I T T E D K R E K A K V T K K I K Q Q Q K N D V F T L M M V N Y M L E E V L K L S S N D R L S L N E L Y Q T K E E R I V N K Q V A K D T Q E R N K N Y I W N K V V D L Q L C E G L V R I D K V K L K D I G N F R K Y E N D S R V K E F L T Y Q S D I V W S A Y L S N E V D S N K L Y V I E R Q L D N Y E S I R S K E L L K E V Q E I E C S V Y N Q V A N K E S L K Q S G N E N F K Q Y V L Q G L V P I G M D V R E M L I L S T D V K F I K E E I I Q L G Q A G E V E Q D L Y S L I Y I R N K F A H N Q L P I K E F F D F C E N N Y R S I S D N E Y Y A E Y Y M E I F R S I K E K Y T S
HMPREF9711_00870[Myroides odoratimimus CCUG 3837](配列	EKB 0604 14	M K D I L T T D T T E K Q N R F Y S H K I A D K Y F F G G Y F N L A S N N I Y E V F E E V N K R N T F G K L A K R D N G N L K N Y I I H V F K D E L S I S D F E K R V A I F A S Y F P I L E T V D K K S I K E R N R T I D L T L S Q R I R Q F R E M L I S L V T A V D Q L R N F Y T H Y H H S E I V I E N K V L D F L N S S L V S T A L H V K D K Y L K T D K T K E F L K E T I A A E L D I L I E A Y K K K Q I E K K N T R F K A N K R E D I L N A I Y N E A F W S F I N D K D K D K E T V V A K G A D A Y F E K N H H K S N D P D F A L N I S E K G I V Y L L S F F L T N K E M D S L K A N L T G F K G K V D R E S G N S I K Y M A T Q R I Y

番号94）		SFHTYRGLKQKIRTSEEGVKETLL MQMIDELSKVPNVVYQHLSTTQQN SFIEDWNEYYKDYEDDVETDDLSR VIHPVIRKRYEDRFNYFAIRFLDE FFDFPTLRFQVHLGDYVHDRRTKQ LGKVESDRIIKEKVTVFARLKDIN SAKASYFHSLEEQDKEELDNKWTL FPNPSYDFPKEHTLQHQGEQKNAG KIGIYVKLRDTQYKEKAALEEARK SLNPKERSATKASKYDIITQIIEA NDNVKSEKPLVFTGQPIAYLSMND IHSMLFSLLTDNAELKKTPEEVEA KLIDQIGKQINEILSKDTDTKILK KYKDNDLKETDTDKITRDLARDKE EIEKLILEQKQRADDYNYTSSTKF NIDKSRKRKHLLFNAEKGKIGVWL ANDIKRFMFKESKSKWKGYQHTEL QKLFAYFDTSKSDLELILSDMVMV KDYPIELIDLVRKSRTLVDFLNKY LEARLGYIENVITRVKNSIGTPQF KTVRKECFAFLKESNYTVASLDKQ IERILSMPLFIERGFMDSKPTMLE GKSYQQHKEDFADWFVHYKENSNY QNFYDTEVYEIITEDKREQAKVTK KIKQQQKNDVFTLMMVNYMLEEVL KLPSNDRLSLNELYQTKEERIVNK QVAKDTQERNKNYIWNKVVDLQLC EGLVRIDKVKLKDIGNFRKYENDS RVKEFLTYQSDIVWSGYLSNEVDS NKLYVIERQLDNYESIRSKELLKE VQEIECIVYNQVANKESLKQSGNE NFKQYVLQGLLPRGTDVREMLILS TDVKFKKEEIMQLGQVREVEQDLY SLIYIRNKFAHNQLPIKEFFDFCE NNYRPISDNEYYAEYYMEIFRSIK EKYAS
HMPREF9699_0005[Bergeye	EK B5 41 93	MENKTSLGNNIYYNPFKPQDKSYF AGYFNAAMENTDSVFRELGKRLKG KEYTSENFFDAIFKENISLVEYER YVKLLSDYFPMARLLDKKEVPIKE RKENFKKNFKGIIKAVRDLRNFYT HKEHGEVEITDEIFGVLDEMLKST

l l a z o o h e l c u m A T C C 4 3 7 6 7]（配列番号 9 5）		V L T V K K K K V K T D K T K E I L K K S I E K Q L D I L C Q K K L E Y L R D T A R K I E E K R R N Q R E R G E K E L V A P F K Y S D K R D D L I A A I Y N D A F D V Y I D K K K D S L K E S S K A K Y N T K S D P Q Q E E G D L K I P I S K N G V V F L L S L F L T K Q E I H A F K S K I A G F K A T V I D E A T V S E A T V S H G K N S I C F M A T H E I F S H L A Y K K L K R K V R T A E I N Y G E A E N A E Q L S V Y A K E T L M M Q M L D E L S K V P D V V Y Q N L S E D V Q K T F I E D W N E Y L K E N N G D V G T M E E E Q V I H P V I R K R Y E D K F N Y F A I R F L D E F A Q F P T L R F Q V H L G N Y L H D S R P K E N L I S D R R I K E K I T V F G R L S E L E H K K A L F I K N T E T N E D R E H Y W E I F P N P N Y D F P K E N I S V N D K D F P I A G S I L D R E K Q P V A G K I G I K V K L L N Q Q Y V S E V D K A V K A H Q L K Q R K A S K P S I Q N I I E E I V P I N E S N P K E A I V F G G Q P T A Y L S M N D I H S I L Y E F F D K W E K K K E K L E K K G E K E L R K E I G K E L E K K I V G K I Q A Q I Q Q I I D K D T N A K I L K P Y Q D G N S T A I D K E K L I K D L K Q E Q N I L Q K L K D E Q T V R E K E Y N D F I A Y Q D K N R E I N K V R D R N H K Q Y L K D N L K R K Y P E A P A R K E V L Y Y R E K G K V A V W L A N D I K R F M P T D F K N E W K G E Q H S L L Q K S L A Y Y E Q C K E E L K N L L P E K V F Q H L P F K L G G Y F Q Q K Y L Y Q F Y T C Y L D K R L E Y I S G L V Q Q A E N F K S E N K V F K K V E N E C F K F L K K Q N Y T H K E L D A R V Q S I L G Y P I F L E R G F M D E K P T I I K G K T F K G N E A L F A D W F R Y Y K E Y Q N F Q T F Y D T E N Y P L V E L E K K Q A D R K R K T K I Y Q Q K K N D V F T L L M A K H I F K S V F K Q D S I D Q F S L E D L Y Q S R E E R L G N Q E R A R Q T G E R N T N Y I W N K T V D L K L C D G K I T V E N V K L K N V G D F I K Y E Y D Q R V Q A F L K Y E E N I E W Q A F L I K E S K E E E N Y P Y V V E R E I E Q Y E K V R R E E L L K E V H L I E E Y I L E K V K D K E I L K K G D N Q N F K Y Y I L N G L L K Q L K N E D V E S Y K V F N L N T E P E

10 20 30 40

		D V N I N Q L K Q E A T D L E Q K A F V L T Y I R N K F A H N Q L P K K E F W D Y C Q E K Y G K I E K E K T Y A E Y F A E V F K K E K E A L I K
H M P R E F 9 1 5 1 _ 0 1 3 8 7 [P r e v o t e l l a s a c c h a r o l y t i c a F 0 0 5 5] (配 列 番 号 9 6)	E K Y 0 0 0 8 9	M M E K E N V Q G S H I Y Y E P T D K C F W A A F Y N L A R H N A Y L T I A H I N S F V N S K K G I N N D D K V L D I I D D W S K F D N D L L M G A R L N K L I L K H F P F L K A P L Y Q L A K R K T R K Q Q G K E Q Q D Y E K K G D E D P E V I Q E A I A N A F K M A N V R K T L H A F L K Q L E D L R N H F S H Y N Y N S P A K K M E V K F D D G F C N K L Y Y V F D A A L Q M V K D D N R M N P E I N M Q T D F E H L V R L G R N R K I P N T F K Y N F T N S D G T I N N N G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I K G F K G G T E N Y M R M T N E V F C R N R M V I P K L R L E T D Y D N H Q L M F D M L N E L V R C P L S L Y K R L K Q E D Q D K F R V P I E F L D E D N E A D N P Y Q E N A N S D E N P T E E T D P L K N T L V R H Q H R F P Y F V L R Y F D L N E V F K Q L R F Q I N L G C Y H F S I Y D K T I G E R T E K R H L T R T L F G F D R L Q N F S V K L Q P E H W K N M V K H L D T E E S S D K P Y L S D A M P H Y Q I E N E K I G I H F L K T D T E K K E T V W P S L E V E E V S S N R N K Y K S E K N L T A D A F L S T H E L L P M M F Y Y Q L L S S E E K T R A A A G D K V Q G V L Q S Y R K K I F D I Y D D F A N G T I N S M Q K L D E R L A K D N L L R G N M P Q Q M L A I L E H Q E P D M E Q K A K E K L D R L I T E T K K R I G K L E D Q F K Q K V R I G K R R A D L P K V G S I A D W L V N D M M R F Q P A K R N A D N T G V P D S K A N S T E Y R L L Q E A L A F Y S A Y K D R L E P Y F R Q V N L I G G T N P H P F L H R V D W K K C N H L L S F Y H D Y L E A K E Q Y L S H L S P A D W Q K H Q H F L L L K V R K D I Q N E K K D W K K S L V A G W K N G F N L P R G L F T E S I K T W F S T D A D K V Q I T D T K L F E N R V G L I A K L I P L Y Y D K V Y N D K P Q P F Y Q Y P F N I N D R Y K P E D T R K R F T A A S S K L W N E K K M L Y K N A Q P D S S D K I E Y P Q Y L D F L S W K K L E R E L R M L R N Q D M M V W L M C K D L F A Q C T V E G V E F A D L K L S Q L E V D V

		N V Q D N L N V L N N V S S M I L P L S V Y P S D A Q G N V L R N S K P L H T V Y V Q E N N T K L L K Q G N F K S L L K D R R L N G L F S F I A A E G E D L Q Q H P L T K N R L E Y E L S I Y Q T M R I S V F E Q T L Q L E K A I L T R N K T L C G N N F N N L L N S W S E H R T D K K T L Q P D I D F L I A V R N A F S H N Q Y P M S T N T V M Q G I E K F N I Q T P K L E E K D G L G I A S Q L A K K T K D A A S R L Q N I I N G G T N
A343_1752[Porphyromonas gingivalis JCVISC001](配列番号97)	EOA10535	M T E Q N E K P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F F N L A R H N A Y I T L T H I D R Q L A Y S K A D I T N D E D I L F F K G Q W K N L D N D L E R K A R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S Q S S G N K S S K K K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H P E S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V D P H R H F N H L V R K G K K D R C G N N D N P F F K H H F V D R E E K V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E T Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K S L Y D R L R E E D R A R F R V P V D I L S D E D D T D G T E E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K N I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I T Q T T P H Y H I E K G K I G L R F V P E G Q L L W P S P E V G A T R T G R S K Y A Q D K R F T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E A S A E R V Q G R I K R V I E D V Y A V Y D A F A R G E I D T L D R L D A C L A D K G I R R G H L P R Q M I A I L S Q E H K D M E E K V R K K L Q E M I A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L K A R K A F L Q S I G R S D R V E N H R F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K G E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G L D E V G S Y K E V G F M A K A V P L Y F E R

		A C K D R V Q P F Y D Y P F N V G N S L K P K K G R F L S K E K R A E E W E S G K E R F R D L E A W S H S A A R R I E D A F A G I E N A S R E N K K K I E Q L L Q D L S L W E T F E S K L K V K A D K I N I A K L K K E I L E A K E H P Y L D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R T D V H E Q G S L N V L N R V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E Q A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G A L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C A F E Q T L E L E E S L L T R Y P H L P D K N F R K M L E S W S D P L L D K W P D L H G N V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E T L F S S I R K Y D P S S P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E M V E R I I Q A
HMPREF1981_03090[Bacteroides pyogenes F0041](配列番号98)	ER I 81700	M E S I K N S Q K S T G K T L Q K D P P Y F G L Y L N M A L L N V R K V E N H I R K W L G D V A L L P E K S G F H S L L T T D N L S S A K W T R F Y Y K S R K F L P F L E M F D S D K K S Y E N R R E T T E C L D T I D R Q K I S S L L K E V Y G K L Q D I R N A F S H Y H I D D Q S V K H T A L I I S S E M H R F I E N A Y S F A L Q K T R A R F T G V F V E T D F L Q A E E K G D N K K F F A I G G N E G I K L K D N A L I F L I C L F L D R E E A F K F L S R A T G F K S T K E K G F L A V R E T F C A L C C R Q P H E R L L S V N P R E A L L M D M L N E L N R C P D I L F E M L D E K D Q K S F L P L L G E E E Q A H I L E N S L N D E L C E A I D D P F E M I A S L S K R V R Y K N R F P Y L M L R Y I E E K N L L P F I R F R I D L G C L E L A S Y P K K M G E E N N Y E R S V T D H A M A F G R L T D F H N E D A V L Q Q I T K G I T D E V R F S L Y A P R Y A I Y N N K I G F V R T G G S D K I S F P T L K K K G G E G H C V A Y T L Q N T K S F G F I S I Y D L R K I L L L S F L D K D K A K N I V S G L L E Q C E K H W K D L S E N L F D A I R T E L Q K E F P V P L I R Y T L P R S K G G K L V S S K L A D K Q E K Y E S E F E R R K E K L T E I L S E K D F D L S Q I P R R M I D E W L N V L P T S R E K K L K G Y V E T L K L D C R E R L R V F E K R E K G E H P V

		P P R I G E M A T D L A K D I I R M V I D Q G V K Q R I T S A Y Y S E I Q R C L A Q Y A G D D N R R H L D S I I R E L R L K D T K N G H P F L G K V L R P G L G H T E K L Y Q R Y F E E K K E W L E A T F Y P A A S P K R V P R F V N P P T G K Q K E L P L I I R N L M K E R P E W R D W K Q R K N S H P I D L P S Q L F E N E I C R L L K D K I G K E P S G K L K W N E M F K L Y W D K E F P N G M Q R F Y R C K R R V E V F D K V V E Y E Y S E E G G N Y K K Y Y E A L I D E V V R Q K I S S S K E K S K L Q V E D L T L S V R R V F K R A I N E K E Y Q L R L L C E D D R L L F M A V R D L Y D W K E A Q L D L D K I D N M L G E P V S V S Q V I Q L E G G Q P D A V I K A E C K L K D V S K L M R Y C Y D G R V K G L M P Y F A N H E A T Q E Q V E M E L R H Y E D H R R R V F N W V F A L E K S V L K N E K L R R F Y E E S Q G G C E H R R C I D A L R K A S L V S E E E Y E F L V H I R N K S A H N Q F P D L E I G K L P P N V T S G F C E C I W S K Y K A I I C R I I P F I D P E R R F F G K L L E Q K
H M P R E F 1 5 5 3 _ 0 2 0 6 5 [P o r p h y r o m o n a s g i n g i v a l i s F 0 5 6 8] （配列番号９９）	E R J 6 5 6 3 7	M N T V P A S E N K G Q S R T V E D D P Q Y F G L Y L N L A R E N L I E V E S H V R I K F G K K K L N E E S L K Q S L L C D H L L S V D R W T K V Y G H S R R Y L P F L H Y F D P D S Q I E K D H D S K T G V D P D S A Q R L I R E L Y S L L D F L R N D F S H N R L D G T T F E H L E V S P D I S S F I T G T Y S L A C G R A Q S R F A D F F K P D D F V L A K N R K E Q L I S V A D G K E C L T V S G L A F F I C L F L D R E Q A S G M L S R I R G F K R T D E N W A R A V H E T F C D L C I R H P H D R L E S S N T K E A L L L D M L N E L N R C P R I L Y D M L P E E E R A Q F L P A L D E N S M N N L S E N S L N E E S R L L W D G S S D W A E A L T K R I R H Q D R F P Y L M L R F I E E M D L L K G I R F R V D L G E I E L D S Y S K K V G R N G E Y D R T I T D H A L A F G K L S D F Q N E E E V S R M I S G E A S Y P V R F S L F A P R Y A I Y D N K I G Y C H T S D P V Y P K S K T G E K R A L S N P R S M G F I S V H D L R K L L L M E L L C E G S F S R M Q S D F L R K A N R I L D E T A E G K L Q F S A L F P E M R H

		R F I P P Q N P K S K D R R E K A E T T L E K Y K Q E I K G R K D K L N S Q L L S A F D M D Q R Q L P S R L L D E W M N I R P A S H S V K L R T Y V K Q L N E D C R L R L Q K F R K D G D G K A R A I P L V G E M A T F L S Q D I V R M I I S E E T K K L I T S A Y Y N E M Q R S L A Q Y A G E E N R H Q F R A I V A E L R L L D P S S G H P F L S A T M E T A H R Y T E D F Y K C Y L E K K R E W L A K T F Y R P E Q D E N T K R R I S V F F V P D G E A R K L L P L L I R R R M K E Q N D L Q D W I R N K Q A H P I D L P S H L F D S K I M E L L K V K D G K K K W N E A F K D W W S T K Y P D G M Q P F Y G L R R E L N I H G K S V S Y I P S D G K K F A D C Y T H L M E K T V Q D K K R E L R T A G K P V P P D L A A D I K R S F H R A V N E R E F M L R L V Q E D D R L M L M A I N K M M T D R E E D I L P G L K N I D S I L D E E N Q F S L A V H A K V L E K E G E G G D N S L S L V P A T I E I K S K R K D W S K Y I R Y R Y D R R V P G L M S H F P E H K A T L D E V K T L L G E Y D R C R I K I F D W A F A L E G A I M S D R D L K P Y L H E S S S R E G K S G E H S T L V K M L V E K K G C L T P D E S Q Y L I L I R N K A A H N Q F P C A A E M P L I Y R D V S A K V G S I E G S S A K D L P E G S S L V D S L W K K Y E M I I R K I L P I L D P E N R F F G K L L N N M S Q P I N D L
HMPREF1988_01768[Porphyromonas gingivalis F0185]（配列番号100）	ER J8 1987	M N T V P A S E N K G Q S R T V E D D P Q Y F G L Y L N L A R E N L I E V E S H V R I K F G K K K L N E E S L K Q S L L C D H L L S V D R W T K V Y G H S R R Y L P F L H Y F D P D S Q I E K D H D S K T G V D P D S A Q R L I R E L Y S L L D F L R N D F S H N R L D G T T F E H L E V S P D I S S F I T G T Y S L A C G R A Q S R F A D F F K P D D F V L A K N R K E Q L I S V A D G K E C L T V S G L A F F I C L F L D R E Q A S G M L S R I R G F K R T D E N W A R A V H E T F C D L C I R H P H D R L E S S N T K E A L L L D M L N E L N R C P R I L Y D M L P E E E R A Q F L P A L D E N S M N N L S E N S L N E E S R L L W D G S S D W A E A L T K R I R H Q D R F P Y L M L R F I E E M D L L K G I R F R V D L G E I E L D S Y

		S K K V G R N G E Y D R T I T D H A L A F G K L S D F Q N E E E V S R M I S G E A S Y P V R F S L F A P R Y A I Y D N K I G Y C H T S D P V Y P K S K T G E K R A L S N P Q S M G F I S V H D L R K L L L M E L L C E G S F S R M Q S G F L R K A N R I L D E T A E G K L Q F S A L F P E M R H R F I P P Q N P K S K D R R E K A E T T L E K Y K Q E I K G R K D K L N S Q L L S A F D M N Q R Q L P S R L L D E W M N I R P A S H S V K L R T Y V K Q L N E D C R L R L R K F R K D G D G K A R A I P L V G E M A T F L S Q D I V R M I I S E E T K K L I T S A Y Y N E M Q R S L A Q Y A G E E N R R Q F R A I V A E L H L L D P S S G H P F L S A T M E T A H R Y T E D F Y K C Y L E K K R E W L A K T F Y R P E Q D E N T K R R I S V F F V P D G E A R K L L P L L I R R R M K E Q N D L Q D W I R N K Q A H P I D L P S H L F D S K I M E L L K V K D G K K K W N E A F K D W W S T K Y P D G M Q P F Y G L R R E L N I H G K S V S Y I P S D G K K F A D C Y T H L M E K T V Q D K K R E L R T A G K P V P P D L A A D I K R S F H R A V N E R E F M L R L V Q E D D R L M L M A I N K M M T D R E E D I L P G L K N I D S I L D E E N Q F S L A V H A K V L E K E G E G G D N S L S L V P A T I E I K S K R K D W S K Y I R Y R Y D R R V P G L M S H F P E H K A T L D E V K T L L G E Y D R C R I K I F D W A F A L E G A I M S D R D L K P Y L H E S S S R E G K S G E H S T L V K M L V E K K G C L T P D E S Q Y L I L I R N K A A H N Q F P C A A E M P L I Y R D V S A K V G S I E G S S A K D L P E G S S L V D S L W K K Y E M I I R K I L P I L D H E N R F F G K L L N N M S Q P I N D L
H M P R E F 1 9 9 0 _ 0 1 8 0 0 [P o r p h y r o m o n a s g i n g i	E R J 8 7 3 3 5	M N T V P A S E N K G Q S R T V E D D P Q Y F G L Y L N L A R E N L I E V E S H V R I K F G K K K L N E E S L K Q S L L C D H L L S V D R W T K V Y G H S R R Y L P F L H Y F D P D S Q I E K D H D S K T G V D P D S A Q R L I R E L Y S L L D F L R N D F S H N R L D G T T F E H L E V S P D I S S F I T G T Y S L A C G R A Q S R F A D F F K P D D F V L A K N R K E Q L I S V A D G K E C L T V S G L A F F I C L F L D R E Q A S G M L S

v a l i s W 4 0 8 7] （配列番号 1 0 1）		R I R G F K R T D E N W A R A V H E T F C D L C I R H P H D R L E S S N T K E A L L L D M L N E L N R C P R I L Y D M L P E E E R A Q F L P A L D E N S M N N L S E N S L N E E S R L L W D G S S D W A E A L T K R I R H Q D R F P Y L M L R F I E E M D L L K G I R F R V D L G E I E L D S Y S K K V G R N G E Y D R T I T D H A L A F G K L S D F Q N E E E V S R M I S G E A S Y P V R F S L F A P R Y A I Y D N K I G Y C H T S D P V Y P K S K T G E K R A L S N P R S M G F I S V H D L R K L L L M E L L C E G S F S R M Q S D F L R K A N R I L D E T A E G K L Q F S A L F P E M R H R F I P P Q N P K S K D R R E K A E T T L E K Y K Q E I K G R K D K L N S Q L L S A F D M D Q R Q L P S R L L D E W M N I R P A S H S V K L R T Y V K Q L N E D C R L R L Q K F R K D G D G K A R A I P L V G E M A T F L S Q D I V R M I I S E E T K K L I T S A Y Y N E M Q R S L A Q Y A G E E N R H Q F R A I V A E L R L L D P S S G H P F L S A T M E T A H R Y T E D F Y K C Y L E K K R E W L A K T F Y R P E Q D E N T K R R I S V F F V P D G E A R K L L P L L I R R R M K E Q N D L Q D W I R N K Q A H P I D L P S H L F D S K V M E L L K V K D G K K K W N E A F K D W W S T K Y P D G M Q P F Y G L R R E L N I H G K S V S Y I P S D G K K F A D C Y T H L M E K T V R D K K R E L R T Λ G K P V P P D L Λ Λ Y I K R S F H R Λ V N E R E F M L R L V Q E D D R L M L M A I N K I M T D R E E D I L P G L K N I D S I L D K E N Q F S L A V H A K V L E K E G E G G D N S L S L V P A T I E I K S K R K D W S K Y I R Y R Y D R R V P G L M S H F P E H K A T L D E V K T L L G E Y D R C R I K I F D W Λ F Λ L E G Λ I M S D R D L K P Y L H E S S S R E G K S G E H S T L V K M L V E K K G C L T P D E S Q Y L I L I R N K A A H N Q F P C A A E I P L I Y R D V S A K V G S I E G S S A K D L P E G S S L V D S L W K K Y E M I I R K I L P I L D P E N R F F G K L L N N M S Q P I N D L
M 5 7 3 _ 1 1 7 0 4 2	K J 8 6 7	M K M E D D K K T T E S T N M L D N K H F W A A F L N L A R H N V Y I T V N H I N K V L E L K N K K D Q D I I I D N D Q D I L A I K T H W E K V

[Prevotella intermedia ZT](配列番号１０２)	５６	NGDLNKTERLRELMTKHFPFLETA IYTKNKEDKEEVKQEKQAEAQSLE SLKDCLFLFLEKLQEARNYYSHYK YSESTKEPMLEEGLLEKMYNIFDD NIQLVIKDYQHNKDINPDEDFKHL DRKGQFKYSFADNEGNITESGLLF FVSLFLEKKDAIWMQQKLTGFKDN RESKKKMTHEVFCRRRMLLPKLRL ESTQTQDWILLDMLNELIRCPKSL YERLQGEYRKKFNVPFDSADEDYD AEQEPFKNTLVRHQDRFPYFALRY FDYNEIFTNLRFQIDLGTYHFSIY KKLIGGQKEDRHLTHKLYGFERIQ EFAKQNRPDEWKALVKDLDTYETS NERYISETTPHYHLENQKIGIRFR NGNKEIWPSLKTNGENNEKSKYKL DKPYQAEAFLSVHELLPMMFYYLL LKKEEPNNDKKNASIVEGFIKREI RDMYKLYDAFANGEINNIGDLEKY CEDKGIPKRHLPKQMVAILYDEPK DMVKEAKRKQKEMVKDTKKLLATL EKQTQEEIEDGGRNIRLLKSGEIA RWLVNDMMRFQPVQKDNEGNPLNN SKANSTEYQMLQRSLALYNKEEKP TRYFRQVNLINSSNPHPFLKWTKW EECNNILSFYRNYLTKKIEFLNKL KPEDWEKNQYFLKLKEPKTNRETL VQGWKNGFNLPRGIFTEPIREWFK RHQNDSKEYEKVEALKRVGLVTKV IPLFFKEEYFKEDAQKEINNCVQP FYSFPYNVGNIHKPDEKDFLPSEE RKKLWGDKKDKFKGYKAKVKSKKL TDKEKEEYRSYLEFQSWNKFERFL RLVRNQDIVTWLLCTELIDKMKVE GLNVEELQKLRLKDIDTDTAKQEK NNILNRIMPMQLPVTVYEIDDSHN IVKDRPLHTVYIEETKTKLLKQGN FKALVKDRRLNGLFSFVDTSSKAE LKDKPISKSVVEYELGEYQNARIE TIKDMLLLEKTLIKKYEKLPTDNF SDMLNGWLEGKDESDKARFQNDVK LLVAVRNAFSHNQYPMRNRIAFAN

10 20 30 40

		I N P F S L S S A D I S E E K K L D I A N Q L K D K T H K I I K K I I E I E K P I E T K E
A 2 0 3 3 _ 1 0 2 0 5 [B a c t e r o i d e t e s b a c t e r i u m G W A 2 _ 3 1 _ 9] (配 列 番 号 1 0 3)	O F X 1 8 0 2 0 . 1	M E N Q T Q K G K G I Y Y Y Y T K N E D K H Y F G S F L N L A N N N I E Q I I E E F R I R L S L K D E K N I K E I I N N Y F T D K K S Y T D W E R G I N I L K E Y L P V I D Y L D L A I T D K E F E K I D L K Q K E T A K R K Y F R T N F S L L I D T I I D L R N F Y T H Y F H K P I S I N P D V A K F L D K N L L N V C L D I K K Q K M K T D K T K Q A L K D G L D K E L K K L I E L K K A E L K E K K I K T W N I T E N V E G A V Y N D A F N H M V Y K N N A G V T I L K D Y H K S I L P D D K I D S E L K L N F S I S G L V F L L S M F L S K K E I E Q F K S N L E G F K G K V I G E N G E Y E I S K F N N S L K Y M A T H W I F S Y L T F K G L K Q R V K N T F D K E T L L M Q M I D E L N K V P H E V Y Q T L S K E Q Q N E F L E D I N E Y V Q D N E E N K K S M E N S I V V H P V I R K R Y D D K F N Y F A I R F L D E F A N F P T L K F F V T A G N F V H D K R E K Q I Q G S M L T S D R M I K E K I N V F G K L T E I A K Y K S D Y F S N E N T L E T S E W E L F P N P S Y L L I Q N N I P V H I D L I H N T E E A K Q C Q I A I D R I K C T T N P A K K R N T R K S K E E I I K I I Y Q K N K N I K Y G D P T A L L S S N E L P A L I Y E L L V N K K S G K E L E N I I V E K I V N Q Y K T I A G F E K G Q N L S N S L I T K K L K K S E P N E D K I N A E K I I L A I N R E L E I T E N K L N I I K N N R A E F R T G A K R K H I F Y S K E L G Q E A T W I A Y D L K R F M P E A S R K E W K G F H H S E L Q K F L A F Y D R N K N D A K A L L N M F W N F D N D Q L I G N D L N S A F R E F H F D K F Y E K Y L I K R D E I L E G F K S F I S N F K D E P K L L K K G I K D I Y R V F D K R Y Y I I K S T N A Q K E Q L L S K P I C L P R G I F D N K P T Y I E G V K V E S N S A L F A D W Y Q Y T Y S D K H E F Q S F Y D M P R D Y K E Q F E K F E L N N I K S I Q N K K N L N K S D K F I Y F R Y K Q D L K I K Q I K S Q D L F I K L M V D E L F N V V F K N N I E L N L K K L Y Q T S D E R F K N Q L I A D V Q K N R E K G D T S D N K M N E N F I W N M T I P L S

		L C N G Q I E E P K V K L K D I G K F R K L E T D D K V I Q L L E Y D K S K V W K K L E I E D E L E N M P N S Y E R I R R E K L L K G I Q E F E H F L L E K E K F D G I N H P K H F E Q D L N P N F K T Y V I N G V L R K N S K L N Y T E I D K L L D L E H I S I K D I E T S A K E I H L A Y F L I H V R N K F G H N Q L P K L E A F E L M K K Y Y K K N N E E T Y A E Y F H K V S S Q I V N E F K N S L E K H S
S A M N 0 5 4 2 1 5 4 2 _ 0 6 6 6 [C h r y s e o b a c t e r i u m j e j u e n s e]（配列番号１０４）	S D I 2 7 2 8 9 . 1	M E K T Q T G L G I Y Y D H T K L Q D K Y F F G G F F N L A Q N N I D N V I K A F I I K F F P E R K D K D I N I A Q F L D I C F K D N D A D S D F Q K K N K F L R I H F P V I G F L T S D N D K A G F K K K F A L L L K T I S E L R N F Y T H Y Y H K S I E F P S E L F E L L D D I F V K T T S E I K K L K K K D D K T Q Q L L N K N L S E E Y D I R Y Q Q Q I E R L K E L K A Q G K R V S L T D E T A I R N G V F N A A F N H L I Y R D G E N V K P S R L Y Q S S Y S E P D P A E N G I S L S Q N S I L F L L S M F L E R K E T E D L K S R V K G F K A K I I K Q G E E Q I S G L K F M A T H W V F S Y L C F K G I K Q K L S T E F H E E T L L I Q I I D E L S K V P D E V Y S A F D S K T K E K F L E D I N E Y M K E G N A D L S L E D S K V I H P V I R K R Y E N K F N Y F A I R F L D E Y L S S T S L K F Q V H V G N Y V H D R R V K H I N G T G F Q T E R I V K D R I K V F G R L S N I S N L K A D Y I K E Q L E L P N D S N G W E I F P N P S Y I F I D N N V P I H V L A D E A T K K G I E L F K D K R R K E Q P E E L Q K R K G K I S K Y N I V S M I Y K E A K G K D K L R I D E P L A L L S L N E I P A L L Y Q I L E K G A T P K D I E L I I K N K L T E R F E K I K N Y D P E T P A P A S Q I S K R L R N N T T A K G Q E A L N A E K L S L L I E R E I E N T E T K L S S I E E K R L K A K K E Q R R N T P Q R S I F S N S D L G R I A A W L A D D I K R F M P A E Q R K N W K G Y Q H S Q L Q Q S L A Y F E K R P Q E A F L L L K E G W D T S D G S S Y W N N W V M N S F L E N N H F E K F Y K N Y L M K R V K Y F S E L A G N I K Q H T H N T K F L R K F I K Q Q M P A D L F P K R H Y I L K D L E T E K N K V L S K P L

		V F S R G L F D N N P T F I K G V K V T E N P E L F A E W Y S Y G Y K T E H V F Q H F Y G W E R D Y N E L L D S E L Q K G N S F A K N S I Y Y N R E S Q L D L I K L K Q D L K I K K I K I Q D L F L K R I A E K L F E N V F N Y P T T L S L D E F Y L T Q E E R A E K E R I A L A Q S L R E E G D N S P N I I K D D F I W S K T I A F R S K Q I Y E P A I K L K D I G K F N R F V L D D E E S K A S K L L S Y D K N K I W N K E Q L E R E L S I G E N S Y E V I R R E K L F K E I Q N L E L Q I L S N W S W D G I N H P R E F E M E D Q K N T R H P N F K M Y L V N G I L R K N I N L Y K E D E D F W L E S L K E N D F K T L P S E V L E T K S E M V Q L L F L V I L I R N Q F A H N Q L P E I Q F Y N F I R K N Y P E I Q N N T V A E L Y L N L I K L A V Q K L K D N S
S A M N 0 5 4 4 4 3 6 0 _ 1 1 3 6 6 [C h r y s e o b a c t e r i u m c a r n i p u l l o r u m]（配列番号１０５）	S H M 5 2 8 1 2 . 1	M N T R V T G M G V S Y D H T K K E D K H F F G G F L N L A Q D N I T A V I K A F C I K F D K N P M S S V Q F A E S C F T D K D S D T D F Q N K V R Y V R T H L P V I G Y L N Y G G D R N T F R Q K L S T L L K A V D S L R N F Y T H Y Y H S P L A L S T E L F E L L D T V F A S V A V E V K Q H K M K D D K T R Q L L S K S L A E E L D I R Y K Q Q L E R L K E L K E Q G K N I D L R D E A G I R N G V L N A A F N H L I Y K E G E I A K P T L S Y S S F Y Y G A D S A E N G I T I S Q S G L L F L L S M F L G K K E I E D L K S R I R G F K A K I V R D G E E N I S G L K F M A T H W I F S Y L S F K G M K Q R L S T D F H E E T L L I Q I I D E L S K V P D E V Y H D F D T A T R E K F V E D I N E Y I R E G N E D F S L G D S T I I H P V I R K R Y E N K F N Y F A V R F L D E F I K F P S L R F Q V H L G N F V H D R R I K D I H G T G F Q T E R V V K D R I K V F G K L S E I S S L K T E Y I E K E L D L D S D T G W E I F P N P S Y V F I D N N I P I Y I S T N K T F K N G S S E F I K L R R K E K P E E M K M R G E D K K E K R D I A S M I G N A G S L N S K T P L A M L S L N E M P A L L Y E I L V K K T T P E E I E L I I K E K L D S H F E N I K N Y D P E K P L P A S Q I S K R L R N N T T D K G K K V I N P E K L I H L I N K E I D A T E A K F A L L A K N R K E L K E

		K F R G K P L R Q T I F S N M E L G R E A T W L A D D I K R F M P D I L R K N W K G Y Q H N Q L Q Q S L A F F N S R P K E A F T I L Q D G W D F A D G S S F W N G W I I N S F V K N R S F E Y F Y E A Y F E G R K E Y F S S L A E N I K Q H T S N H R N L R R F I D Q Q M P K G L F E N R H Y L L E N L E T E K N K I L S K P L V F P R G L F D T K P T F I K G I K V D E Q P E L F A E W Y Q Y G Y S T E H V F Q N F Y G W E R D Y N D L L E S E L E K D N D F S K N S I H Y S R T S Q L E L I K L K Q D L K I K K I K I Q D L F L K L I A G H I F E N I F K Y P A S F S L D E L Y L T Q E E R L N K E Q E A L I Q S Q R K E G D H S D N I I K D N F I G S K T V T Y E S K Q I S E P N V K L K D I G K F N R F L L D D K V K T L L S Y N E D K V W N K N D L D L E L S I G E N S Y E V I R R E K L F K K I Q N F E L Q T L T D W P W N G T D H P E E F G T T D N K G V N H P N F K M Y V V N G I L R K H T D W F K E G E D N W L E N L N E T H F K N L S F Q E L E T K S K S I Q T A F L I I M I R N Q F A H N Q L P A V Q F F E F I Q K K Y P E I Q G S T T S E L Y L N F I N L A V V E L L E L L E K
S A M N 0 5 4 2 1 7 8 6 _ 1 0 1 1 1 1 9 [C h r y s e o b a c t e r i u m u r e i l y t i c u m]（配列番号１０６）	S I S 7 0 4 8 1 . 1	M E T Q I L G N G I S Y D H T K T E D K H F F G G F L N T A Q N N I D L L I K A Y I S K F E S S P R K L N S V Q F P D V C F K K N D S D A D F Q H K L Q F I R K H L P V I Q Y L K Y G G N R E V L K E K F R L L L Q A V D S L R N F Y T H F Y H K P I Q L P N E L L T L L D T I F G E I G N E V R Q N K M K D D K T R H L L K K N L S E E L D F R Y Q E Q L E R L R K L K S E G K K V D L R D T E A I R N G V L N A A F N H L I F K D A E D F K P T V S Y S S S Y Y Y D S D T A E N G I S I S Q S G L L F L L S M F L G R R E M E D L K S R V R G F K A R I I K H E E Q H V S G L K F M A T H W V F S E F C F K G I K T R L N A D Y H E E T L L I Q L I D E L S K V P D E L Y R S F D V A T R E R F I E D I N E Y I R D G K E D K S L I E S K I V H P V I R K R Y E S K F N Y F A I R F L D E F V N F P T L R F Q V H A G N Y V H D R R I K S I E G T G F K T E R L V K D R I K V F G K L S T I S S L K A E Y L A K A V N I T D D T G W E L L P H

		P S Y V F I D N N I P I H L T V D P S F K N G V K E Y Q E K R K L Q K P E E M K N R Q G G D K M H K P A I S S K I G K S K D I N P E S P V A L L S M N E I P A L L Y E I L V K K A S P E E V E A K I R Q K L T A V F E R I R D Y D P K V P L P A S Q V S K R L R N N T D T L S Y N K E K L V E L A N K E V E Q T E R K L A L I T K N R R E C R E K V K G K F K R Q K V F K N A E L G T E A T W L A N D I K R F M P E E Q K K N W K G Y Q H S Q L Q Q S L A F F E S R P G E A R S L L Q A G W D F S D G S S F W N G W V M N S F A R D N T F D G F Y E S Y L N G R M K Y F L R L A D N I A Q Q S S T N K L I S N F I K Q Q M P K G L F D R R L Y M L E D L A T E K N K I L S K P L I F P R G I F D D K P T F K K G V Q V S E E P E A F A D W Y S Y G Y D V K H K F Q E F Y A W D R D Y E E L L R E E L E K D T A F T K N S I H Y S R E S Q I E L L A K K Q D L K V K K V R I Q D L Y L K L M A E F L F E N V F G H E L A L P L D Q F Y L T Q E E R L K Q E Q E A I V Q S Q R P K G D D S P N I V K E N F I W S K T I P F K S G R V F E P N V K L K D I G K F R N L L T D E K V D I L L S Y N N T E I G K Q V I E N E L I I G A G S Y E F I R R E Q L F K E I Q Q M K R L S L R S V R G M G V P I R L N L K
P r e v o t e l l a b u c c a e（配列番号１０７）	W P _ 0 0 4 3 4 3 5 8 1	M Q K Q D K L F V D R K K N A I F A F P K Y I T I M E N Q E K P E P I Y Y E L T D K H F W A A F L N L A R H N V Y T T I N H I N R R L E I A E L K D D G Y M M D I K G S W N E Q A K K L D K K V R L R D L I M K H F P F L E A A A Y E I T N S K S P N N K E Q R E K E Q S E A L S L N N L K N V L F I F L E K L Q V L R N Y Y S H Y K Y S E E S P K P I F E T S L L K N M Y K V F D A N V R L V K R D Y M H H E N I D M Q R D F T H L N R K K Q V G R T K N I I D S P N F H Y H F A D K E G N M T I A G L L F F V S L F L D K K D A I W M Q K K L K G F K D G R N L R E Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E N V Q T K D W M Q L D M L N E L V R C P K S L Y E R L R E K D R E S F K V P F D I F S D D Y D A E E E P F K N T L V R H Q D R F P Y F V L R Y F D L N E I F E Q L R F Q I D L G T Y H F S I Y N K R I G D E D E V R H L T H H L

		Y G F A R I Q D F A Q Q N Q P E V W R K L V K D L D Y F E A S Q E P Y I P K T A P H Y H L E N E K I G I K F C S T H N N L F P S L K T E K T C N G R S K F N L G T Q F T A E A F L S V H E L L P M M F Y Y L L L T K D Y S R K E S A D K V E G I I R K E I S N I Y A I Y D A F A N G E I N S I A D L T C R L Q K T N I L Q G H L P K Q M I S I L E G R Q K D M E K E A E R K I G E M I D D T Q R R L D L L C K Q T N Q K I R I G K R N A G L L K S G K I A D W L V N D M M R F Q P V Q K D Q N N I P I N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G S E N F R L K A Y F N Q M N L V G N D N P H P F L A E T Q W E H Q T N I L S F Y R N Y L E A R K K Y L K G L K P Q N W K Q Y Q H F L I L K V Q K T N R N T L V T G W K N S F N L P R G I F T Q P I R E W F E K H N N S K R I Y D Q I L S F D R V G F V A K A I P L Y F A E E Y K D N V Q P F Y D Y P F N I G N K L K P Q K G Q F L D K K E R V E L W Q K N K E L F K N Y P S E K K K T D L A Y L D F L S W K K F E R E L R L I K N Q D I V T W L M F K E L F N M A T V E G L K I G E I H L R D I D T N T A N E E S N N I L N R I M P M K L P V K T Y E T D N K G N I L K E R P L A T F Y I E E T E T K V L K Q G N F K V L A K D R R L N G L L S F A E T T D I D L E K N P I T K L S V D H E L I K Y Q T T R I S I F E M T L G L E K K L I N K Y P T L P T D S F R N M L E R W L Q C K A N R P E L K N Y V N S L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D A T L F A E V K K F T L F P S V D T K K I E L N I A P Q L L E I V G K A I K E I E K S E N K N
P o r p h y r o m o n a s g i n g i v a l i s（配列番号１０８）	W P _ 0 0 5 8 7 3 5 1 1	M N T V P A S E N K G Q S R T V E D D P Q Y F G L Y L N L A R E N L I E V E S H V R I K F G K K K L N E E S L K Q S L L C D H L L S V D R W T K V Y G H S R R Y L P F L H Y F D P D S Q I E K D H D S K T G V D P D S A Q R L I R E L Y S L L D F L R N D F S H N R L D G T T F E H L E V S P D I S S F I T G T Y S L A C G R A Q S R F A D F F K P D D F V L A K N R K E Q L I S V A D G K E C L T V S G L A F F I C L F L D R E Q A S G M L S R I R G F K R T D E N W A R A V H E T F C D L C I R H P H D R L E S S N T K E A L L L D M L N E L N R C P R I L Y D M L P E E E R A Q F L P A L

		D E N S M N N L S E N S L N E E S R L L W D G S S D W A E A L T K R I R H Q D R F P Y L M L R F I E E M D L L K G I R F R V D L G E I E L D S Y S K K V G R N G E Y D R T I T D H A L A F G K L S D F Q N E E E V S R M I S G E A S Y P V R F S L F A P R Y A I Y D N K I G Y C H T S D P V Y P K S K T G E K R A L S N P Q S M G F I S V H N L R K L L L M E L L C E G S F S R M Q S D F L R K A N R I L D E T A E G K L Q F S A L F P E M R H R F I P P Q N P K S K D R R E K A E T T L E K Y K Q E I K G R K D K L N S Q L L S A F D M N Q R Q L P S R L L D E W M N I R P A S H S V K L R T Y V K Q L N E D C R L R L R K F R K D G D G K A R A I P L V G E M A T F L S Q D I V R M I I S E E T K K L I T S A Y Y N E M Q R S L A Q Y A G E E N R R Q F R A I V A E L H L L D P S S G H P F L S A T M E T A H R Y T E D F Y K C Y L E K K R E W L A K T F Y R P E Q D E N T K R R I S V F F V P D G E A R K L L P L L I R R R M K E Q N D L Q D W I R N K Q A H P I D L P S H L F D S K I M E L L K V K D G K K K W N E A F K D W W S T K Y P D G M Q P F Y G L R R E L N I H G K S V S Y I P S D G K K F A D C Y T H L M E K T V Q D K K R E L R T A G K P V P P D L A A D I K R S F H R A V N E R E F M L R L V Q E D D R L M L M A I N K M M T D R E E D I L P G L K N I D S I L D E E N Q F S L A V H A K V L E K E G E G G D N S L S L V P A T I E I K S K R K D W S K Y I R Y R Y D R R V P G L M S H F P E H K A T L D E V K T L L G E Y D R C R I K I F D W A F A L E G A I M S D R D L K P Y L H E S S S R E G K S G E H S T L V K M L V E K K G C L T P D E S Q Y L I L I R N K A A H N Q F P C A A E M P L I Y R D V S A K V G S I E G S S A K D L P E G S S L V D S L W K K Y E M I I R K I L P I L D P E N R F F G K L L N N M S Q P I N D L
P o r p h y r o m o n a s g i n g i v a l i s	W P _ 0 0 5 8 7 4 1 9 5	M T E Q N E K P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F F N L A R H N A Y I T L A H I D R Q L A Y S K A D I T N D E D I L F F K G Q W K N L D N D L E R K A R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S Q S S G N K S S K K K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D

（配列番号１０９）		F R N Y Y S H Y R H P E S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V D P H R H F N H L V R K G K K D K Y G N N D N P F F K H H F V D R E E K V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E A Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K S L Y D R L R E E D R A R F R V P V D I L S D E D D T D G T E E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K N I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I T Q T T P H Y H I E K G K I G L R F V P E G Q L L W P S P E V G A T R T G R S K Y A Q D K R F T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E A S A E K V Q G R I K R V I E D V Y A V Y D A F A R D E I N T R D E L D A C L A D K G I R R G H L P R Q M I A I L S Q E H K D M E E K V R K K L Q E M I A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L K A R K A F L Q S I G R S D R E E N H R F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K S E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G Y D E V G S Y K E V G F M A K A V P L Y F E R A C K D R V Q P F Y D Y P F N V G N S L K P K K G R F L S K E K R A E E W E S G K E R F R D L E A W S H S A A R R I E D A F V G I E Y A S W E N K K K I E Q L L Q D L S L W E T F E S K L K V K A D K I N I A K L K K E I L E A K E H P Y H D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R T D V Q E Q G S L N V L N H V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E E A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G A L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C A F E Q T L E L E E S L L T R Y P H L P D E S F R E M L E S W S D P L L D K W P D L Q R E V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E T I F S S I R K Y D P S S L D A I E E R M G L

		NIAHRLSEEVKLAKEMVERIIQA
Prevotella palleans（配列番号110）	WP_064048331	MKEEEKGKTPVVSTYNKDDKHFWA
		AFLNLARHNVYITVNHINKILGEG
		EINRDGYENTLEKSWNEIKDINKK
		DRLSKLIIKHFPFLEVTTYQRNSA
		DTTKQKEEKQAEAQSLESLKKSFF
		VFIYKLRDLRNHYSHYKHSKSLER
		PKFEEDLQEKMYNIFDASIQLVKE
		DYKHNTDIKTEEDFKHLDRKGQFK
		YSFADNEGNITESGLLFFVSLFLE
		KKDAIWVQKKLEGFKCSNESYQKM
		TNEVFCRSRMLLPKLRLQSTQTQD
		WILLDMLNELIRCPKSLYERLREE
		DRKKFRVPIEIADEDYDAEQEPFK
		NALVRHQDRFPYFALRYFDYNEIF
		TNLRFQIDLGTYHFSIYKKQIGDY
		KESHHLTHKLYGFERIQEFTKQNR
		PDEWRKFVKTFNSFETSKEPYIPE
		TTPHYHLENQKIGIRFRNDNDKIW
		PSLKTNSEKNEKSKYKLDKSFQAE
		AFLSVHELLPMMFYYLLLKTENTD
		NDNEIETKKKENKNDKQEKHKIEE
		IIENKITEIYALYDAFANGKINSI
		DKLEEYCKGKDIEIGHLPKQMIAI
		LKSEHKDMATEAKRKQEEMLADVQ
		KSLESLDNQINEEIENVERKNSSL
		KSGEIASWLVNDMMRFQPVQKDNE
		GNPLNNSKANSTEYQMLQRSLALY
		NKEEKPTRYFRQVNLIESSNPHPF
		LNNTEWEKCNNILSFYRSYLEAKK
		NFLESLKPEDWEKNQYFLMLKEPK
		TNCETLVQGWKNGFNLPRGIFTEP
		IRKWFMEHRKNITVAELKRVGLVA
		KVIPLFFSEEYKDSVQPFYNYLFN
		VGNINKPDEKNFLNCEERRELLRK
		KKDEFKKMTDKEKEENPSYLEFQS
		WNKFERELRLVRNQDIVTWLLCME
		LFNKKKIKELNVEKIYLKNINTNT
		TKKEKNTEEKNGEEKIIKEKNNIL
		NRIMPMRLPIKVYGRENFSKNKKK
		KIRRNTFFTVYIEEKGTKLLKQGN
		FKALERDRRLGGLFSFVKTHSKAE

		S K S N T I S K S R V E Y E L G E Y Q K A R I E I I K D M L A L E E T L I D K Y N S L D T D N F H N M L T G W L K L K D E P D K A S F Q N D V D L L I A V R N A F S H N Q Y P M R N R I A F A N I N P F S L S S A N T S E E K G L G I A N Q L K D K T H K T I E K I I E I E K P I E T K E
M y r o i d e s o d o r a t i m i m u s （配列番号 1 1 1 ）	W P _ 0 0 6 2 6 1 4 1 4	M K D I L T T D T T E K Q N R F Y S H K I A D K Y F F G G Y F N L A S N N I Y E V F E E V N K R N T F G K L A K R D N G N L K N Y I I H V F K D E L S I S D F E K R V A I F A S Y F P I L E T V D K K S I K E R N R T I D L T L S Q R I R Q F R E M L I S L V T A V D Q L R N F Y T H Y H H S E I V I E N K V L D F L N S S L V S T A L H V K D K Y L K T D K T K E F L K E T I A A E L D I L I E A Y K K K Q I E K K N T R F K A N K R E D I L N A I Y N E A F W S F I N D K D K D K E T V V A K G A D A Y F E K N H H K S N D P D F A L N I S E K G I V Y L L S F F L T N K E M D S L K A N L T G F K G K V D R E S G N S I K Y M A T Q R I Y S F H T Y R G L K Q K I R T S E E G V K E T L L M Q M I D E L S K V P N V V Y Q H L S T T Q Q N S F I E D W N E Y Y K D Y E D D V E T D D L S R V I H P V I R K R Y E D R F N Y F A I R F L D E F F D F P T L R F Q V H L G D Y V H D R R T K Q L G K V E S D R I I K E K V T V F A R L K D I N S A K A N Y F H S L E E Q D K E E L D N K W T L F P N P S Y D F P K E H T L Q H Q G E Q K N A G K I G I Y V K L R D T Q Y K E K A A L E E A R K S L N P K E R S A T K A S K Y D I I T Q I I E A N D N V K S E K P L V F T G Q P I A Y L S M N D I H S M L F S L L T D N A E L K K T P E E V E A K L I D Q I G K Q I N E I L S K D T D T K I L K K Y K D N D L K E T D T D K I T R D L A R D K E E I E K L I L E Q K Q R A D D Y N Y T S S T K F N I D K S R K R K H L L F N A E K G K I G V W L A N D I K R F M T E E F K S K W K G Y Q H T E L Q K L F A Y Y D T S K S D L D L I L S D M V M V K D Y P I E L I A L V K K S R T L V D F L N K Y L E A R L G Y M E N V I T R V K N S I G T P Q F K T V R K E C F T F L K K S N Y T V V S L D K Q V E R I L S M P L F I E R G F M D D K P T M L E G K S Y Q Q H K E K F A D W F V H Y K E N S N Y

		QNFYDTEVYEITTEDKREKAKVTK KIKQQQKNDVFTLMMVNYMLEEVL KLSSNDRLSLNELYQTKEERIVNK QVAKDTQERNKNYIWNKVVDLQLC EGLVRIDKVKLKDIGNFRKYENDS RVKEFLTYQSDIVWSAYLSNEVDS NKLYVIERQLDNYESIRSKELLKE VQEIECSVYNQVANKESLKQSGNE NFKQYVLQGLVPIGMDVREMLILS TDVKFIKEEIIQLGQAGEVEQDLY SLIYIRNKFAHNQLPIKEFFDFCE NNYRSISDNEYYAEYYMEIFRSIK EKYTS
Myroides odoratimus（配列番号112）	WP_026255509	MKDILTTDTTEKQNRFYSHKIADK YFFGGYFNLASNNIYEVFEEVNKR NTFGKLAKRDNGNLKNYIIHVFKD ELSISDFEKRVAIFASYFPILETV DKKSIKERNRTIDLTLSQRIRQFR EMLISLVTAVDQLRNFYTHYHHSE IVIENKVLDFLNSSLVSTALHVKD KYLKTDKTKEFLKETIAAELDILI EAYKKKQIEKKNTRFKANKREDIL NAIYNEAFWSFINDKDKDKETVVA KGADAYFEKNHHKSNDPDFALNIS EKGIVYLLSFFLTNKEMDSLKANL TGFKGKVDRESGNSIKYMATQRIY SFHTYRGLKQKIRTSEEGVKETLL MQMIDELSKVPNVVYQHLSTTQQN SFIEDWNEYYKDYEDDVETDDLSR VIHPVIRKRYEDRFNYFAIRFLDE FFDFPTLRFQVHLGDYVHDRRTKQ LGKVESDRIIKEKVTVFARLKDIN SAKASYFHSLEEQDKEELDNKWTL FPNPSYDFPKEHTLQHQGEQKNAG KIGIYVKLRDTQYKEKAALEEARK SLNPKERSATKASKYDIITQIIEA NDNVKSEKPLVFTGQPIAYLSMND IHSMLFSLLTDNAELKKTPEEVEA KLIDQIGKQINEILSKDTDTKILK KYKDNDLKETDTDKITRDLARDKE EIEKLILEQKQRADDYNYTSSTKF NIDKSRKRKHLLFNAEKGKIGVWL

10 20 30 40

		ANDIKRFMFKESKSKWKGYQHTELQKLFAYFDTSKSDLELILSDMVMVKDYPIELIDLVRKSRTLVDFLNKYLEARLGYIENVITRVKNSIGTPQFKTVRKECFAFLKESNYTVASLDKQIERILSMPLFIERGFMDSKPTMLEGKSYQQHKEDFADWFVHYKENSNYQNFYDTEVYEIITEDKREQAKVTKKIKQQQKNDVFTLMMVNYMLEEVLKLPSNDRLSLNELYQTKEERIVNKQVAKDTQERNKNYIWNKVVDLQLCEGLVRIDKVKLKDIGNFRKYENDSKSPNNKEQREKEQSEALSLNNLKNVLFIFLEKLQVLRNYYSHYKYSEERLFKNWMQLDMLNELVRCPKSLYERLREKDRESFKVPFDIFSDDYDAEEEPFKNTLVRHQDRFPYFVLRYFDLNEIFESQLRFQIDLGTYHFSIYNKRIGDEDEVRHLTHHLYGFARIQDFAPQNQPEEWRKLVKDLDHFETSQEPYISKTAPHYHLENEKIGIKFCSTHNNLFPSLKREKTCNGRSKFNLGTQFTAEAFLSVHELLPMMFYYLLTKDYSRKESADKVEGI
Prevotellasp．MSX73（配列番号113）	WP_074121663	MQKQDKLFVDRKKNAIFAFPKYITIMENQEKPEPIYYELTDKHFWAAFLNLARHNVYTTINHINRRLEIAELKDDGYMMGIKGSWNEQAKKLDKKVRLRDLIMKHFPFLEAAAYEITNSKSPNNKEQREKEQSEALSLNNLKNVLFIFLEKLQVLRNYYSHYKYSEESKPKPIFETSLLKNMYKVFDRKKDRNLREQMTNEVFCRSRISLPKLKLENVQTKDWMQLDMLNELVRCPKSLYERLREKDRESFKVPFDIFSDDYDAEEEPFKNTLVRHQDRFPYFVLRYFDLNEIFESQLRFQIDLGTYHFSIYNKRIGDEDEVRHLTHHLYGFARIQDFAPQNQPEEWRKLVKDLDHFETSQEPYISKTAPHYHLENEKIGIKFCSTHNNLFPSLKREKTCNGRSKFNLGTQFTAEAFLSVHELLPMMFYYLLTKDYSRKESADKVEGI

		I R K E I S N I Y A I Y D A F A N N E I N S I A D L T C R L Q K T N I L Q G H L P K Q M I S I L E G R Q K D M E K E A E R K I G E M I D D T Q R R L D L L C K Q T N Q K I R I G K R N A G L L K S G K I A D W L V S D M M R F Q P V Q K D T N N A P I N N S K A N S T E Y R M L Q H A L A L F G S E S S R L K A Y F R Q M N L V G N A N P H P F L A E T Q W E H Q T N I L S F Y R N Y L E A R K K Y L K G L K P Q N W K Q Y Q H F L I L K V Q K T N R N T L V T G W K N S F N L P R G I F T Q P I R E W F E K H N N S K R I Y D Q I L S F D R V G F V A K A I P L Y F A E E Y K D N V Q P F Y D Y P F N I G N K L K P Q K G Q F L D K K E R V E L W Q K N K E L F K N Y P S E K N K T D L A Y L D F L S W K K F E R E L R L I K N Q D I V T W L M F K E L F K T T T V E G L K I G E I H L R D I D T N T A N E E S N N I L N R I M P M K L P V K T Y E T D N K G N I L K E R P L A T F Y I E E T E T K V L K Q G N F K V L A K D R R L N G L L S F A E T T D I D L E K N P I T K L S V D Y E L I K Y Q T T R I S I F E M T L G L E K K L I D K Y S T L P T D S F R N M L E R W L Q C K A N R P E L K N Y V N S L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D A T L F A E V K K F T L F P S V D T K K I E L N I A P Q L L E I V G K A I K E I E K S E N K N
Porphyromonas gingivalis（配列番号114）	WP_012458414	M T E Q N E R P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F F N L A R H N A Y I T L A H I D R Q L A Y S K A D I T N D E D I L F F K G Q W K N L D N D L E R K A R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S Q S S G N K S S K K K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H P E S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V D P H R H F N H L V R K G K K D R Y G N N D N P F F K H H F V D R E E K V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E T Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K S L Y D R L R E E D R A R F R V P V D I L S D E D D T D G T E E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K N I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D

		F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I T Q T T P H Y H I E K G K I G L R F V P E G Q H L W P S P E V G A T R T G R S K Y A Q D K R L T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S D E A S A E R V Q G R I K R V I E D V Y A V Y D A F A R G E I N T R D E L D A C L A D K G I R R G H L P R Q M I G I L S Q E H K D M E E K V R K K L Q E M I V D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L K A R K A F L Q S I G R S D R V E N H R F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K G E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G L D E V G S Y K E V G F M A K A V P L Y F E R A C K D R V Q P F Y D Y P F N V G N S L K P K K G R F L S K E K R A E E W E S G K E R F R L A K L K K E I L E A K E H P Y L D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M I C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R T D V Q E Q G N L N V L N R V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E Q A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G A L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C A F E Q T L E L E E S L L T R Y P H L P D K N F R K M L E S W S D P L L D K W P D L H G N V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E A V F S S I R K Y D P S S P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E M A E R I I Q A
Paludibacter propionicigenes（配列番号１１５）	WP__013446107	M K T S A N N I Y F N G I N S F K K I F D S K G A I A P I A E K S C R N F D I K A Q N D V N K E Q R I H Y F A V G H T F K Q L D T E N L F E Y V L D E N L R A K R P T R F I S L Q Q F D K E F I E N I K R L I S D I R N I N S H Y I H R F D P L K I D A V P T N I I D F L K E S F E L A V I Q I Y L K E K G I N Y L Q F S E N P H A D Q K L V A F L H D K F L P L D E K K T S M L Q N E T P Q L K E Y K E Y R K Y F K T L S K Q A A I D Q L L F A E K E T D Y I W N L F D S H P V L T I S A G K Y L S F Y S C L F L L S M F L Y K S E A N Q L I S K I K G F K K N T T E E E K S K R E I F T F F

		S K R F N S M D I D S E E N Q L V K F R D L I L Y L N H Y P V A W N K D L E L D S S N P A M T D K L K S K I I E L E I N R S F P L Y E G N E R F A T F A K Y Q I W G K K H L G K S I E K E Y I N A S F T D E E I T A Y T Y E T D T C P E L K D A H K K L A D L K A A K G L F G K R K E K N E S D I K K T E T S I R E L Q H E P N P I K D K L I Q R I E K N L L T V S Y G R N Q D R F M D F S A R F L A E I N Y F G Q D A S F K M Y H F Y A T D E Q N S E L E K Y E L P K D K K K Y D S L K F H Q G K L V H F I S Y K E H L K R Y E S W D D A F V I E N N A I Q L K L S F D G V E N T V T I Q R A L L I Y L L E D A L R N I Q N N T A E N A G K Q L L Q E Y Y S H N K A D L S A F K Q I L T Q Q D S I E P Q Q K T E F K K L L P R R L L N N Y S P A I N H L Q T P H S S L P L I L E K A L L A E K R Y C S L V V K A K A E G N Y D D F I K R N K G K Q F K L Q F I R K A W N L M Y F R N S Y L Q N V Q A A G H H K S F H I E R D E F N D F S R Y M F A F E E L S Q Y K Y Y L N E M F E K K G F F E N N E F K I L F Q S G T S L E N L Y E K T K Q K F E I W L A S N T A K T N K P D N Y H L N N Y E Q Q F S N Q L F F I N L S H F I N Y L K S T G K L Q T D A N G Q I I Y E A L N N V Q Y L I P E Y Y Y T D K P E R S E S K S G N K L Y N K L K A T K L E D A L L Y E M A M C Y L K A D K Q I A D K A K H P I T K L L T S D V E F N I T N K E G I Q L Y H L L V P F K K I D A F I G L K M H K E Q Q D K K H P T S F L A N I V N Y L E L V K N D K D I R K T Y E A F S T N P V K R T L T Y D D L A K I D G H L I S K S I K F T N V T L E L E R Y F I F K E S L I V K K G N N I D F K Y I K G L R N Y Y N N E K K K N E G I R N K A F H F G I P D S K S Y D Q L I R D A E V M F I A N E V K P T H A T K Y T D L N K Q L H T V C D K L M E T V H N D Y F S K E G D G K K K R E A A G Q K Y F E N I I S A K
P o r p h y r o m o n a s g i n g i v	W _ 1 8 6	P 0 3 1 1 M T E Q N E K P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F F N L A R H N A Y I T L A H I D R Q L A Y S K A D I T N D E D I L F F K G Q W K N L D N D L E R K A R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S Q S S G N K S S K N K E L T K K E K E E

a l i s（配列番号１１６）	５５	L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H P E S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V D P H R H F N H L V R K G K K D R Y G N N D N P F F K H H F V D R E G T V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E T Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K S L Y D R L R E E D R A R F R V P V D I L S D E E D T D G A E E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F Q I D L G T Y H F A I Y K K N I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I T Q T T P H Y H I E K G K I G L R F V P E G Q H L W P S P E V G A T R T G R S K Y A Q D K R F T A E A F L S A H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E A S A E R V Q G R I K R V I E D V Y A V Y D A F A R D E I N T R D E L D A C L A D K G I R R G H L P R Q M I G I L S Q E H K D M E E K I R K K L Q E M M A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L K A R K A F L Q S I G R S D R V E N H R F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K G E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G L D E V G S Y K E V G F M A K A V P L Y F E R A C K D W V Q P F Y N Y P F N V G N S L K P K K G R F L S K E K R A E E W E S G K E R F R L A K L K K E I L E A K E H P Y L D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M I C G D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R T D V Q E Q G S L N V L N R V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E Q A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G A L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C A F E Q T L E L E E S L L T R C P H L P D K N F R K M L E S W S D P L L D K W P D L H R K V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E A V F S S I R K Y D P S F P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E T V E R I I Q A

10 20 30 40

Flavobacterium columnare（配列番号１１７）	WP_014165541	MSSKNESYNKQKTFNHYKQEDKYF FGGFLNNADDNLRQVGKEFKTRIN FNHNNNELASVFKDYFNKEKSVAK REHALNLLSNYFPVLERIQKHTNH NFEQTREIFELLLDTIKKLRDYYT HHYHKPITINPKIYDFLDDTLLDV LITIKKKKKVKNDTSRELLKEKLRP ELTQLKNQKREELIKKGKKLLEENL ENAVFNHCLRPFLEENKTDDKQNK TVSLRKYRKSKPNEETSITLTQSG LVFLMSFFLHRKEFQVFTSGLEGF KAKVNTIKEEEISLNKNNIVYMIT HWSYSYYNFKGLKHRIKTDQGVST LEQNNTTHSLTNTNTKEALLTQIV DYLSKVPNEIYETLSEKQQKEFED EDINEYMRENPENEDSTFSSIVSHK VIRKRYENKFNYFAMRFLDEYAEL PTLRFMVNFGDYIKDRQKKILESI QFDSERIIKKEIHLFEKLSLVTEY KKNVYLKETSNIDLSRFPLFPNPS YVMANNNIPFYIDSRSNNLDEYLN QKKKAQSQNKKRNLTFEKYNKEQS KDAIIAMLQKEIGVKDLQQRSTIG LLSCNELPSMLYEVIVKDIKGAEL ENKIAQKIREQYQSIRDFTLDSPQ KDNIPTTLIKTINTDSSVTFENQP IDIPRLKNAIQKELTLTQEKLLNV KEHEIEVDNYNRNKNTYKFKNQPK NKVDDKKLQRKYVFYRNEIRQEAN WLASDLIHFMKNKSLWKGYMHNEL QSFLAFFEDKKNDCIALLETVFNL KEDCILTKGLKNLFLKHGNFIDFY KEYLKLKEDFLNTESTFLENGLIG LPPKILKKELSKRFKYIFIVFQKR QFIIKELEEKKNNLYADAINLSRG IFDEKPTMIPFKKPNPDEFASWFV ASYQYNNYQSFYELTPDIVERDKK KKKYKNLRAINKVKIQDYYLKLMVD TLYQDLFNQPLDKSLSDFYVSKAE REKIKADAKAYQKRNDSSLWNKVI HLSLQNNRITANPKLKDIGKYKRA LQDEKIATLLTYDDRTWTYALQK

10

20

30

40

		P E K E N E N D Y K E L H Y T A L N M E L Q E Y E K V R S K E L L K Q V Q E L E K Q I L E E Y T D F L S T Q I H P A D F E R E G N P N F K K Y L A H S I L E N E D D L D K L P E K V E A M R E L D E T I T N P I I K K A I V L I I I R N K M A H N Q Y P P K F I Y D L A N R F V P K K E E E Y F A T Y F N R V F E T I T K E L W E N K E K K D K T Q V
Psychroflexus torquis（配列番号１１８）	WP_015027465	M E S I I G L G L S F N P Y K T A D K H Y F G S F L N L V E N N L N A V F A E F K E R I S Y K A K D E N I S S L I E K H F I D N M S I V D Y E K K I S I L N G Y L P I I D F L D D E L E N N L N T R V K N F K K N F I I L A E A I E K L R D Y Y T H F Y H D P I T F E D N K E P L L E L L D E V L L K T I L D V K K K Y L K T D K T K E I L K D S L R E E M D L L V I R K T D E L R E K K K T N P K I Q H T D S S Q I K N S I F N D A F Q G L L Y E D K G N N K K T Q V S H R A K T R L N P K D I H K Q E E R D F E I P L S T S G L V F L M S L F L S K K E I E D F K S N I K G F K G K V V K D E N H N S L K Y M A T H R V Y S I L A F K G L K Y R I K T D T F S K E T L M M Q M I D E L S K V P D C V Y Q N L S E T K Q K D F I E D W N E Y F K D N E E N T E N L E N S R V V H P V I R K R Y E D K F N Y F A I R F L D E F A N F K T L K F Q V F M G Y Y I H D Q R T K T I G T T N I T T E R T V K E K I N V F G K L S K M D N L K K H F F S Q L S D D E N T D W E F F P N P S Y N F L T Q A D N S P A N N I P I Y L E L K N Q Q I I K E K D A I K A E V N Q T Q N R N P N K P S K R D L L N K I L K T Y E D F H Q G D P T A I L S L N E I P A L L H L F L V K P N N N K T G Q Q I E N I I R I K I E K Q F K A I N H P S K N N N K G I P K S L F A D T N V R V N A I K L K K D L E A E L D M L N K K H I A F K E N Q K A S S N Y D K L L K E H Q F T P K N K R P E L R K Y V F Y K S E K G E E A T W L A N D I K R F M P K D F K T K W K G C Q H S E L Q R K L A F Y D R H T K Q D I K E L L S G C E F D H S L L D I N A Y F Q K D N F E D F F S K Y L E N R I E T L E G V L K K L H D F K N E P T P L K G V F K N C F K F L K R Q N Y V T E S P E I I K K R I L A K P T F L P R G V F D E R P T

		MKKGKNPLKDKNEFAEWFVEYLEN KDYQKFYNAEEYRMRDADFKKNAV IKKQKLKDFYTLQMVNYLLKEVFG KDEMNLQLSELFQTRQERLKLQGI AKKQMNKETGDSSENTRNQTYIWN KDVPVSFFNGKVTIDKVKLKNIGK YKRYERDERVKTFIGYEVDEKWMM YLPHNWKDRYSVKPINVIDLQIQE YEEIRSHELLKEIQNLEQYIYDHT TDKNILLQDGNPNFKMYVLNGLLI GIKQVNIPDFIVLKQNTNFDKIDF TGIASCSELEKKTIILIAIRNKFA HNQLPNKMIYDLANEFLKIEKNET YANYYLKVLKKMISDLA
Rimerella anatipestifer（配列番号１１９）	WP_015346520	MFFSFHNAQRVIFKHLYKAFDASL RMVKEDYKAHFTVNLTRDFAHLNR KGKNKQDNPDFNRYRFEKDGFFTE SGLLFFTNLFLDKRDAYWMLKKVS GFKASHKQREKMTTEVFCRSRILL PKLRLESRYDHNQMLLDMLSELSR CPKLLYEKLSEENKKHFQVEADGF LDEIEEEQNPFKDTLIRHQDRFPY FALRYLDLNESFKSIRFQVDLGTY HYCIYDKKIGDEQEKRHLTRTLLS FGRLQDFTEINRPQEWKALTKDLD YKETSNQPFISKTTPHYHITDNKI GFRLGTSKELYPSLEIKDGANRIA KYPYNSGFVAHAFISVHELLPLMF YQHLTGKSEDLLKETVRHIQRIYK DFEEERINTIEDLEKANQGRLPLG AFPKQMLGLLQNKQPDLSEKAKIK IEKLIAETKLLSHRLNTKLKSSPK LGKRREKLIKTGVLADWLVKDFMR FQPVAYDAQNQPIKSSKANSTEFW FIRRALALYGGEKNRLEGYFKQTN LIGNTNPHPFLNKFNWKACRNLVD FYQQYLEQREKFLEAIKHQPWEPY QYCLLLKVPKENRKNLVKGWEQGG ISLPRGLFTEAIRETLSKDLTLSK PIRKEIKKHGRVGFISRAITLYFK EKYQDKHQSFYNLSYKLEAKAPLL KKEEHYEYWQQNKPQSPTESQRLE

		LHTSDRWKDYLLYKRWQHLEKKLR LYRNQDIMLWLMTLELTKNHFKEL NLNYHQLKLENLAVNVQEADAKLN PLNQTLPMVLPVKVYPTTAFGEVQ YHETPIRTVYIREEQTKALKMGNF KALVKDRRLNGLFSFIKEENDTQK HPISQLRLRRELEIYQSLRVDAFK ETLSLEEKLLNKHASLSSLENEFR TLLEEWKKKYAASSMVTDKHIAFI ASVRNAFCHNQYPFYKETLHAPIL LFTVAQPTTEEKDGLGIAEALLKV LREYCEIVKSQI
Prevotella pleuritidis（配列番号120）	WP_021584635	MENDKRLEESACYTLNDKHFWAAF LNLARHNVYITVNHINKTLELKNK KNQEIIIDNDQDILAIKTHWAKVN GDLNKTDRLREMIKHFPFLEAAI YSNNKEDKEEVKEEKQAKAQSFKS LKDCLFLFLEKLQEARNYYSHYKY SESSKEPEFEEGLLEKMYNTFDAS IRLVKEDYQYNKDIDPEKDFKHLE RKEDFNYLFTDKDNKGKITKNGLL FFVSLFLEKKDAIWMQQKFRGFKD NRGNKEKMTHEVFCRSRMLLPKIR LESTQTQDWILLDMLNELIRCPKS LYERLQGAYREKFKVPFDSIDEDY DAEQEPFRNTLVRHQDRFPYFALR YFDYNEIFKNLRFQIDLGTYHFSI YKKLIGGKKEDRHLTHKLYGFERI QEFTKQNRPDKWQAIIKDLDTYET SNERYISETTPHYHLENQKIGIRF RNDNNDIWPSLKTNGEKNEKSKYN LDKPYQAEAFLSVHELLPMMFYYL LLKMENTDNDKEDNEVGTKKKGNK NNKQEKHKIEEIIENKIKDIYALY DAFTNGEINSIDELAEQREGKDIE IGHLPKQLIVILKNKSKDMAEKAN RKQKEMIKDTKKRLATLDKQVKGE IEDGGRNIRLLKSGEIARWLVNDM MRFQPVQKDNEGKPLNNSKANSTE YQMLQRSLALYNKEEKPTRYFRQV NLIKSSNPHPFLEDTKWEECYNIL SFYRNYLKAKIKFLNKLKPEDWKK

10 20 30 40

		N Q Y F L M L K E P K T N R K T L V Q G W K N G F N L P R G I F T E P I K E W F K R H Q N D S E E Y K K V E A L D R V G L V A K V I P L F F K E E Y F K E D A Q K E I N N C V Q P F Y S F P Y N V G N I H K P E E K N F L H C E E R R K L W D K K K D K F K G Y K A K E K S K K M T D K E K E E H R S Y L E F Q S W N K F E R E L R L V R N Q D I L T W L L C T K L I D K L K I D E L N I E E L Q K L R L K D I D T D T A K K E K N N I L N R V M P M R L P V T V Y E I D K S F N I V K D K P L H T V Y I E E T G T K L L K Q G N F K A L V K D R R L N G L F S F V K T S S E A E S K S K P I S K L R V E Y E L G A Y Q K A R I D I I K D M L A L E K T L I D N D E N L P T N K F S D M L K S W L K G K G E A N K A R L Q N D V G L L V A V R N A F S H N Q Y P M Y N S E V F K G M K L L S L S S D I P E K E G L G I A K Q L K D K I K E T I E R I I E I E K E I R N
P o r p h y r o m o n a s g i n g i v a l i s（配列番号１２１）	W P _ 0 2 1 6 6 3 1 9 7	M N T V P A S E N K G Q S R T V E D D P Q Y F G L Y L N L A R E N L I E V E S H V R I K F G K K K L N E E S L K Q S L L C D H L L S V D R W T K V Y G H S R R Y L P F L H Y F D P D S Q I E K D H D S K T G V D P D S A Q R L I R E L Y S L L D F L R N D F S H N R L D G T T F E H L E V S P D I S S F I T G T Y S L A C G R A Q S R F A D F F K P D D F V L A K N R K E Q L I S V A D G K E C L T V S G L A F F I C L F L D R E Q A S G M L S R I R G F K R T D E N W A R A V H E T F C D L C I R H P H D R L E S S N T K E A L L L D M L N E L N R C P R I L Y D M L P E E E R A Q F L P A L D E N S M N N L S E N S L N E E S R L L W D G S S D W A E A L T K R I R H Q D R F P Y L M L R F I E E M D L L K G I R F R V D L G E I E L D S Y S K K V G R N G E Y D R T I T D H A L A F G K L S D F Q N E E E V S R M I S G E A S Y P V R F S L F A P R Y A I Y D N K I G Y C H T S D P V Y P K S K T G E K R A L S N P R S M G F I S V H D L R K L L L M E L L C E G S F S R M Q S D F L R K A N R I L D E T A E G K L Q F S A L F P E M R H R F I P P Q N P K S K D R R E K A E T T L E K Y K Q E I K G R K D K L N S Q L L S A F D M D Q R Q L P S R L L D E W M N I R P A S H S V K L R T

		Y V K Q L N E D C R L R L Q K F R K D G D G K A R A I P L V G E M A T F L S Q D I V R M I I S E E T K K L I T S A Y Y N E M Q R S L A Q Y A G E E N R H Q F R A I V A E L R L L D P S S G H P F L S A T M E T A H R Y T E D F Y K C Y L E K K R E W L A K T F Y R P E Q D E N T K R R I S V F F V P D G E A R K L L P L L I R R R M K E Q N D L Q D W I R N K Q A H P I D L P S H L F D S K I M E L L K V K D G K K K W N E A F K D W W S T K Y P D G M Q P F Y G L R R E L N I H G K S V S Y I P S D G K K F A D C Y T H L M E K T V Q D K K R E L R T A G K P V P P D L A A D I K R S F H R A V N E R E F M L R L V Q E D D R L M L M A I N K M M T D R E E D I L P G L K N I D S I L D E E N Q F S L A V H A K V L E K E G E G G D N S L S L V P A T I E I K S K R K D W S K Y I R Y R Y D R R V P G L M S H F P E H K A T L D E V K T L L G E Y D R C R I K I F D W A F A L E G A I M S D R D L K P Y L H E S S S R E G K S G E H S T L V K M L V E K K G C L T P D E S Q Y L I L I R N K A A H N Q F P C A A E M P L I Y R D V S A K V G S I E G S S A K D L P E G S S L V D S L W K K Y E M I I R K I L P I L D P E N R F F G K L L N N M S Q P I N D L
P o r p h y r o m o n a s g i n g i v a l i s（配列番号１２２）	W P _ 0 2 1 6 6 5 4 7 5	M N T V P A S E N K G Q S R T V E D D P Q Y F G L Y L N L A R E N L I E V E S H V R I K F G K K K L N E E S L K Q S L L C D H L L S V D R W T K V Y G H S R R Y L P F L H Y F D P D S Q I E K D H D S K T G V D P D S A Q R L I R E L Y S L L D F L R N D F S H N R L D G T T F E H L E V S P D I S S F I T G T Y S L A C G R A Q S R F A D F F K P D D F V L A K N R K E Q L I S V A D G K E C L T V S G L A F F I C L F L D R E Q A S G M L S R I R G F K R T N E N W A R A V H E T F C D L C I R H P H D R L E S S N T K E A L L L D M L N E L N R C P R I L Y D M L P E E E R A Q F L P A L D E N S M N N L S E N S L N E E S R L L W D G S S D W A E A L T K R I R H Q D R F P Y L M L R F I E E M D L L K G I R F R V D L G E I E L D S Y S K K V G R N G E Y D R T I T D H A L A F G K L S D F Q N E E E V S R M I S G E A S Y P V R F S L F A P R Y A I Y D N K I G Y C H T S D P V Y P

		K S K T G E K R A L S N P Q S M G F I S V H D L R K L L L M E L L C E G S F S R M Q S G F L R K A N R I L D E T A E G K L Q F S A L F P E M R H R F I P P Q N P K S K D R R E K A E T T L E K Y K Q E I K G R K D K L N S Q L L S A F D M N Q R Q L P S R L L D E W M N I R P A S H S V K L R T Y V K Q L N E D C R L R L R K F R K D G D G K A R A I P L V G E M A T F L S Q D I V R M I I S E E T K K L I T S A Y Y N E M Q R S L A Q Y A G E E N R R Q F R A I V A E L H L L D P S S G H P F L S A T M E T A H R Y T E D F Y K C Y L E K K R E W L A K T F Y R P E Q D E N T K R R I S V F F V P D G E A R K L L P L L I R R R M K E Q N D L Q D W I R N K Q A H P I D L P S H L F D S K I M E L L K V K D G K K K W N E A F K D W W S T K Y P D G M Q P F Y G L R R E L N I H G K S V S Y I P S D G K K F A D C Y T H L M E K T V Q D K K R E L R T A G K P V P P D L A A D I K R S F H R A V N E R E F M L R L V Q E D D R L M L M A I N K M M T D R E E D I L P G L K N I D S I L D K E N Q F S L A V H A K V L E K E G E G G D N S L S L V P A T I E I K S K R K D W S K Y I R Y R Y D R R V P G L M S H F P E H K A T L D E V K T L L G E Y D R C R I K I F D W A F A L E G A I M S D R D L K P Y L H E S S S R E G K S G E H S T L V K M L V E K K G C L T P D E S Q Y L I L I R N K A A H N Q F P C A A E M P L I Y R D V S A K V G S I E G S S A K D L P E G S S L V D S L W K K Y E M I I R K I L P I L D H E N R F F G K L L N N M S Q P I N D L
P o r p h y r o m o n a s g i n g i v a l i s （配列番号１２３）	W P _ 0 2 1 6 7 7 6 5 7	M N T V P A S E N K G Q S R T V E D D P Q Y F G L Y L N L A R E N L I E V E S H V R I K F G K K K L N E E S L K Q S L L C D H L L S V D R W T K V Y G H S R R Y L P F L H Y F D P D S Q I E K D H D S K T G V D P D S A Q R L I R E L Y S L L D F L R N D F S H N R L D G T T F E H L E V S P D I S S F I T G T Y S L A C G R A Q S R F A D F F K P D D F V L A K N R K E Q L I S V A D G K E C L T V S G L A F F I C L F L D R E Q A S G M L S R I R G F K R T D E N W A R A V H E T F C D L C I R H P H D R L E S S N T K E A L L L D M L N E L N R C P R I L Y D M L P E E E R A Q F L P A L

		D E N S M N N L S E N S L N E E S R L L W D G S S D W A E A L T K R I R H Q D R F P Y L M L R F I E E M D L L K G I R F R V D L G E I E L D S Y S K K V G R N G E Y D R T I T D H A L A F G K L S D F Q N E E E V S R M I S G E A S Y P V R F S L F A P R Y A I Y D N K I G Y C H T S D P V Y P K S K T G E K R A L S N P Q S M G F I S V H D L R K L L L M E L L C E G S F S R M Q S G F L R K A N R I L D E T A E G K L Q F S A L F P E M R H R F I P P Q N P K S K D R R E K A E T T L E K Y K Q E I K G R K D K L N S Q L L S A F D M N Q R Q L P S R L L D E W M N I R P A S H S V K L R T Y V K Q L N E D C R L R L R K F R K D G D G K A R A I P L V G E M A T F L S Q D I V R M I I S E E T K K L I T S A Y Y N E M Q R S L A Q Y A G E E N R R Q F R A I V A E L H L L D P S S G H P F L S A T M E T A H R Y T E D F Y K C Y L E K K R E W L A K T F Y R P E Q D E N T K R R I S V F F V P D G E A R K L L P L L I R R R M K E Q N D L Q D W I R N K Q A H P I D L P S H L F D S K I M E L L K V K D G K K K W N E A F K D W W S T K Y P D G M Q P F Y G L R R E L N I H G K S V S Y I P S D G K K F A D C Y T H L M E K T V Q D K K R E L R T A G K P V P P D L A A D I K R S F H R A V N E R E F M L R L V Q E D D R L M L M A I N K M M T D R E E D I L P G L K N I D S I L D E E N Q F S L A V H A K V L E K E G E G G D N S L S L V P A T I E I K S K R K D W S K Y I R Y R Y D R R V P G L M S H F P E H K A T L D E V K T L L G E Y D R C R I K I F D W A F A L E G A I M S D R D L K P Y L H E S S S R E G K S G E H S T L V K M L V E K K G C L T P D E S Q Y L I L I R N K A A H N Q F P C A A E M P L I Y R D V S A K V G S I E G S S A K D L P E G S S L V D S L W K K Y E M I I R K I L P I L D H E N R F F G K L L N N M S Q P I N D L
P o r p h y r o m o n a s g i n g i v a l i s	W P _ 0 2 1 6 8 0 0 1 2	M N T V P A S E N K G Q S R T V E D D P Q Y F G L Y L N L A R E N L I E V E S H V R I K F G K K K L N E E S L K Q S L L C D H L L S V D R W T K V Y G H S R R Y L P F L H Y F D P D S Q I E K D H D S K T G V D P D S A Q R L I R E L Y S L L D F L R N D F S H N R L D G T T F E H L E V S P D

（配列番号１２４）		ＩＳＳＦＩＴＧＴＹＳＬＡＣＧＲＡＱＳＲＦＡＤＦＦ ＫＰＤＤＦＶＬＡＫＮＲＫＥＱＬＩＳＶＡＤＧＫＥＣ ＬＴＶＳＧＬＡＦＦＩＣＬＦＬＤＲＥＱＡＳＧＭＬＳ ＲＩＲＧＦＫＲＴＤＥＮＷＡＲＡＶＨＥＴＦＣＤＬＣ ＩＲＨＰＨＤＲＬＥＳＳＮＴＫＥＡＬＬＬＤＭＬＮＥ ＬＮＲＣＰＲＩＬＹＤＭＬＰＥＥＥＲＡＱＦＬＰＡＬ ＤＥＮＳＭＮＮＬＳＥＮＳＬＮＥＥＳＲＬＬＷＤＧＳ ＳＤＷＡＥＡＬＴＫＲＩＲＨＱＤＲＦＰＹＬＭＬＲＦ ＩＥＥＭＤＬＬＫＧＩＲＦＲＶＤＬＧＥＩＥＬＤＳＹ ＳＫＫＶＧＲＮＧＥＹＤＲＴＩＴＤＨＡＬＡＦＧＫＬ ＳＤＦＱＮＥＥＥＶＳＲＭＩＳＧＥＡＳＹＰＶＲＦＳ ＬＦＡＰＲＹＡＩＹＤＮＫＩＧＹＣＨＴＳＤＰＶＹＰ ＫＳＫＴＧＥＫＲＡＬＳＮＰＲＳＭＧＦＩＳＶＨＤＬ ＲＫＬＬＬＭＥＬＬＣＥＧＳＦＳＲＭＱＳＤＦＬＲＫ ＡＮＲＩＬＤＥＴＡＥＧＫＬＱＦＳＡＬＦＰＥＭＲＨ ＲＦＩＰＰＱＮＰＫＳＫＤＲＲＥＫＡＥＴＴＬＥＫＹ ＫＱＥＩＫＧＲＫＤＫＬＮＳＱＬＬＳＡＦＤＭＤＱＲ ＱＬＰＳＲＬＬＤＥＷＭＮＩＲＰＡＳＨＳＶＫＬＲＴ ＹＶＫＱＬＮＥＤＣＲＬＲＬＱＫＦＲＫＤＧＤＧＫＡ ＲＡＩＰＬＶＧＥＭＡＴＦＬＳＱＤＩＶＲＭＩＩＳＥ ＥＴＫＫＬＩＴＳＡＹＹＮＥＭＱＲＳＬＡＱＹＡＧＥ ＥＮＲＨＱＦＲＡＩＶＡＥＬＲＬＬＤＰＳＳＧＨＰＦ ＬＳＡＴＭＥＴＡＨＲＹＴＥＤＦＹＫＣＹＬＥＫＫＲ ＥＷＬＡＫＴＦＹＲＰＥＱＤＥＮＴＫＲＲＩＳＶＦＦ ＶＰＤＧＥＡＲＫＬＬＰＬＬＩＲＲＲＭＫＥＱＮＤＬ ＱＤＷＩＲＮＫＱＡＨＰＩＤＬＰＳＨＬＦＤＳＫＶＭ ＥＬＬＫＶＫＤＧＫＫＫＷＮＥＡＦＫＤＷＷＳＴＫＹ ＰＤＧＭＱＰＦＹＧＬＲＲＥＬＮＩＨＧＫＳＶＳＹＩ ＰＳＤＧＫＫＦＡＤＣＹＴＨＬＭＥＫＴＶＲＤＫＫＲ ＥＬＲＴＡＧＫＰＶＰＰＤＬＡＡＹＩＫＲＳＦＨＲＡ ＶＮＥＲＥＦＭＬＲＬＶＱＥＤＤＲＬＭＬＭＡＩＮＫ ＩＭＴＤＲＥＥＤＩＬＰＧＬＫＮＩＤＳＩＬＤＫＥＮ ＱＦＳＬＡＶＨＡＫＶＬＥＫＥＧＥＧＧＤＮＳＬＳＬ ＶＰＡＴＩＥＩＫＳＫＲＫＤＷＳＫＹＩＲＹＲＹＤＲ ＲＶＰＧＬＭＳＨＦＰＥＨＫＡＴＬＤＥＶＫＴＬＬＧ ＥＹＤＲＣＲＩＫＩＦＤＷＡＦＡＬＥＧＡＩＭＳＤＲ ＤＬＫＰＹＬＨＥＳＳＳＲＥＧＫＳＧＥＨＳＴＬＶＫ ＭＬＶＥＫＫＧＣＬＴＰＤＥＳＱＹＬＩＬＩＲＮＫＡ ＡＨＮＱＦＰＣＡＡＥＩＰＬＩＹＲＤＶＳＡＫＶＧＳ ＩＥＧＳＳＡＫＤＬＰＥＧＳＳＬＶＤＳＬＷＫＫＹＥ ＭＩＩＲＫＩＬＰＩＬＤＰＥＮＲＦＦＧＫＬＬＮＮＭ ＳＱＰＩＮＤＬ

10

20

30

40

Porphyromonas gingivalis（配列番号１２５）	WP_023846767	MNTVPASENKGQSRTVEDDPQYFG LYLNLARENLIEVESHVRIKFGKK KLNEESLKQSLLCDHLLSVDRWTK VYGHSRRYLPFLHYFDPDSQIEKD HDSKTGVDPDSAQRLIRELYSLLD FLRNDFSHNRLDGTTFEHLEVSPD ISSFITGTYSLACGRAQSRFADFF KPDDFVLAKNRKEQLISVADGKEC LTVSGLAFFICLFLDREQASGMLS RIRGFKRTDENWARAVHETFCDLC IRHPHDRLESSNTKEALLLDMLNE LNRCPRILYDMLPEEERAQFLPAL DENSMNNLSENSLNEESRLLWDGS SDWAEALTKRIRHQDRFPYLMLRF IEEMDLLKGIRFRVDLGEIELDSY SKKVGRNGEYDRTITDHALAFGKL SDFQNEEEVSRMISGEASYPVRFS LFAPRYAIYDNKIGYCHTSDPVYP KSKTGEKRALSNPRSMGFISVHDL RKLLLMELLCEGSFSRMQSDFLRK ANRILDETAEGKLQFSALFPEMRH RFIPPQNPKSKDRREKAETTLEKY KQEIKGRKDKLNSQLLSAFDMNQR QLPSRLLDEWMNIRPASHSVKLRT YVKQLNEDCRLRLRKFRKDGDGKA RAIPLVGEMATFLSQDIVRMIISE ETKKLITSAYYNEMQRSLAQYAGE ENRRQFRAIVAELHLLDPSSGHPF LSATMETAHRYTEDFYKCYLEKKR EWLAKTFYRPEQDENTKRRISVFF VPDGEARKLLPLLIRRRMKEQNDL QDWIRNKQAHPIDLPSHLFDSKIM ELLKVKDGKKKWNEAFKDWWSTKY PDGMQPFYGLRRELNIHGKSVSYI PSDGKKFADCYTHLMEKTVQDKKR ELRTAGKPVPPDLAADIKRSFHRA VNERFFMLRLVQEDDRLMLMAINK MMTDREEDILPGLKNIDSILDEEN QFSLAVHAKVLEKEGEGGDNSLSL VPATIEIKSKRKDWSKYIRYRYDR RVPGLMSHFPEHKATLDEVKTLLG EYDRCRIKIFDWAFALEGAIMSDR

10

20

30

40

		D L K P Y L H E S S S R E G K S G E H S T L V K M L V E K K G C L T P D E S Q Y L I L I R N K A A H N Q F P C A A E M P L I Y R D V S A K V G S I E G S S A K D L P E G S S L V D S L W K K Y E M I I R K I L P I L D P E N R F F G K L L N N M S Q P I N D L
P r e v o t e l l a f a l s e n i i （配列番号１２６）	W P _ 0 3 6 8 8 4 9 2 9	M K N D N N S T K S T D Y T L G D K H F W A A F L N L A R H N V Y I T V N H I N K V L E L K N K K D Q E I I I D N D Q D I L A I K T L W G K V D T D I N K K D R L R E L I M K H F P F L E A A T Y Q Q S S T N N T K Q K E E E Q A K A Q S F E S L K D C L F L F L E K L R E A R N Y Y S H Y K H S K S L E E P K L E E K L L E N M Y N I F D T N V Q L V I K D Y E H N K D I N P E E D F K H L G R A E G E F N Y Y F T R N K K G N I T E S G L L F F V S L F L E K K D A I W A Q T K I K G F K D N R E N K Q K M T H E V F C R S R M L L P K L R L E S T Q T Q D W I L L D M L N E L I R C P K S L Y K R L Q G E K R E K F R V P F D P A D E D Y D A E Q E P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D Y N E I F T N L R F Q I D L G T Y H F S I Y K K Q I G D K K E D R H L T H K L Y G F E R I Q E F A K E N R P D E W K A L V K D L D T F E E S N E P Y I S E T T P H Y H L E N Q K I G I R N K N K K K K K T I W P S L E T K T T V N E R S K Y N L G K S F K A E A F L S V H E L L P M M F Y Y L L L N K E E P N N G K I N A S K V E G I I E K K I R D I Y K L Y G A F A N E E I N N E E E L K E Y C E G K D I A I R H L P K Q M I A I L K N E Y K D M A K K A E D K Q K K M I K D T K K R L A A L D K Q V K G E V E D G G R N I K P L K S G R I A S W L V N D M M R F Q P V Q R D R D G Y P L N N S K A N S T E Y Q L L Q R T L A L F G S E R E R L A P Y F R Q M N L I G K D N P H P F L K D T K W K E H N N I L S F Y R S Y L E A K K N F L G S L K P E D W K K N Q Y F L K L K E P K T N R E T L V Q G W K N G F N L P R G I F T E P I R E W F I R H Q N E S E E Y K K V K D F D R I G L V A K V I P L F F K E D Y Q K E I E D Y V Q P F Y G Y P F N V G N I H N S Q E G T F L N K K E R E E L W K G N K T K F K D Y K T K E K N K E K T N K D K F K K K T D E E K E E F R S Y L D F Q S

		WKKFERELRLVRNQDIVTWLLCMELIDKLKIDELNIEELQKLRLKDIDTDTAKKEKNNILNRIMPMELPVTVYETDDSNNIIKDKPLHTIYIKEAETKLLKQGNFKALVKDRRLNGLFSFVETSSEAELKSKPISKSLVEYEELGEYQRARVEIIKDMLRLEETLIGNDEKLPTNKFRQMLDKWLEHKKETDDTDLKNDVKLLTEVRNAFSHNQYPMRDRIAFANIKPFSLSSANTSNEEGLGIAKKLKDKTKETIDRIIEIEEQTATKR
Prevotella pleuritidis（配列番号127）	WP_036931485	MENDKRLEESTCYTLNDKHFWAAFLNLARHNVYITINHINKLLEIRQIDNDEKVLDIKALWQKVDKDINQKARLRELMIKHFPFLEAAIYSNNKEDKEEVKEEKQAKAQSFKSLKDCLFLFLEKLQEAARNYYSHYKSSESSKEPEFEEGLLEKMYNTFGVSIRLVKEDYQYNKDIDPEKDFKHLERKEDFNYYTDKDNKGKITKNGLLFFVSLFLEKKDAIWMQQKLRGFKDNRGNKEKMTHEVFCRSRMLLPKIRLESTQTQDWILLDMLNELIRCPKSLYERLQGAYREKFKVPFDSIDEDYDAEQEPFRNTLVRHQDRFPYFALRYFDYNEEIFKNLRFQIDLGTYHFSIYKKLIGDNKEDRHLTHKLYGFERIQEFAKQKRPNEWQALVKDLDIYETSNEQYISETTPHYHLENQKIGIRFKNKKDKIWPSLETNGKENEKSKYNLDKSFQAEAFLSIHELLPMMFYDLLLKKEEPNNDEKNASIVEGFIKKEIKRMYAIYDAFANEEINSKEGLEEYCKNKGFQSVRHLPKQMIAILTNKSKNMAEKAKRKQKEMIKDTKKRLATLDKQVKGEIEDGGRNIRLLKSGEIARWLVNDMMRFQSVQKDKEGKPLNNSKANSTEYQMLQRSLALYNKEQKPTPYFIQVNLIKSSNPHPFLEETKWEECNNILSFYRSYLEAKKNFLESLKPEDWKKNQYFLMLKEPKTNRKTLVQGWKN

		G F N L P R G I F T E P I K E W F K R H Q N D S E E Y K K V E A L D R V G L V A K V I P L F F K E E Y F K E D A Q K E I N N C V Q P F Y S F P Y N V G N I H K P E E K N F L H C E E R R K L W D K K K D K F K G Y K A K E K S K K M T D K E K E E H R S Y L E F Q S W N K F E R E L R L V R N Q D I V T W L L C T E L I D K L K I D E L N I E E L Q K L R L K D I D T D T A K K E K N N I L N R I M P M Q L P V T V Y E I D K S F N I V K D K P L H T I Y I E E T G T K L L K Q G N F K A L V K D R R L N G L F S F V K T S S E A E S K S K P I S K L R V E Y E L G A Y Q K A R I D I I K D M L A L E K T L I D N D E N L P T N K F S D M L K S W L K G K G E A N K A R L Q N D V D L L V A I R N A F S H N Q Y P M Y N S E V F K G M K L L S L S S D I P E K E G L G I A K Q L K D K I K E T I E R I I E I E K E I R N
[Porphyromonas gingivalis（配列番号1278）	WP_039417390	M T E Q N E R P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F F N L A R H N A Y I T L A H I D R Q L A Y S K A D I T N D E D I L F F K G Q W K N L D N D L E R K A R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S Q S S G N K S S K K K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H P E S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V D P H R H F N H L V R K G K K D R Y G N N D N P F F K H H F V D R E G T V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E A Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K S L Y D R L R E E D R A R F R V P I D I L S D E D D T D G T E E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K N I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I T Q T T P H Y H I E K G K I G L R F V P E G Q H L W P S P E V G A T R T G R S K Y A Q D K R L T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E V S A E K V Q G R I K R V I E D V Y A V Y D A F A R G E I D T L D R L D A C L A D K G I R R G H L P R Q M I A I L S Q E H K D M E E K V R K K L Q E M I A D T D H R L D M L D R Q

		T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L K A R K A F L Q S I G R S D R E E N H R F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K S E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G Y D E V G S Y K E V G F M A K A V P L Y F E R A C K D R V Q P F Y D Y P F N V G N S L K P K K G R F L S K E K R A E E W E S G K E R F R L A K L K K E I L E A K E H P Y L D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R T D V H E Q G S L N V L N R V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E Q A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G A L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C A F E Q T L E L E E S L L T R Y P H L P D K N F R K M L E S W S D P L L D K W P D L H R K V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E A V F S S I R K Y D P S S P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E M A E R I I Q V
P o r p h y r o m o n a s g u l a e（配列番号１２９）	W P _ 0 3 9 4 1 8 9 1 2	M T E Q S E R P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F L N L A R H N A Y I T L T H I D R Q L A Y S K A D I T N D Q D V L S F K A L W K N L D N D L E R K S R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S K S S G N K S S K N K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H S G S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V D P H R H F N H L V R K G K K D R Y G H N D N P S F K H H F V D S E G M V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E T Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R M D D W M L L D M L N E L V R C P K P L Y D R L R E D D R A C F R V P V D I L P D E D D T D G G G E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K M I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I S Q T S P H Y H I E K G K I G L R F M P E G Q H L W P S P E V G T T R T G R S K Y A Q D

		K R L T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E V S A E K V Q G R I K R V I E D V Y A I Y D A F A R D E I N T L K E L D A C L A D K G I R R G H L P K Q M I A I L S Q E H K N M E E K V R K K L Q E M I A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D A S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H D T R W E S H T N I L S F Y R S Y L R A R K A F L E R I G R S D R M E N R P F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K S E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G Y D E V G S Y R E V G F M A K A V P L Y F E R A C E D R V Q P F Y D S P F N V G N S L K P K K G R F L S K E E R A E E W E R G K E R F R D L E A W S H S A A R R I E D A F A G I E Y A S P G N K K K I E Q L L R D L S L W E A F E S K L K V R A D K I N L A K L K K E I L E A Q E H P Y H D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R T N V Q E Q G S L N V L N H V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E E A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G G L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C A F E Q T L E L E E S L L T R Y P H L P D K N F R K M L E S W S D P L L A K W P E L H G K V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E A V F S S I R K Y D P S S P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E T V E R I I Q A
P o r p h y r o m o n a s g u l a e（配列番号１３０）	W P _ 0 3 9 4 1 9 7 9 2	M T E Q S E R P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F L N L A R H N A Y I T L T H I D R Q L A Y S K A D I T N D Q D V L S F K A L W K N L D N D L E R K S R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S K S S G N K S S K N K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H S G S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V D P H R H F N H L V R K G K K D R Y G H N D N P S F K H H F V D G E G M V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E T Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K P L Y D R L

		R E K D R A R F R V P V D I L P D E D D T D G G G E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K V I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I S Q T T P H Y H I E K G K I G L R F V P E G Q H L W P S P E V G T T R T G R S K Y A Q D K R L T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E V S A E K V Q G R I K R V I E D V Y A I Y D A F A R D E I N T R D E L D A C L A D K G I R R G H L P K Q M I G I L S Q E H K N M E E K V R K K L Q E M I A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L D E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L R A R K A F L E R I G R S D R V E N R P F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K S E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G Y D E V G S Y K E V G F M A K A V P L Y F E R A C K D R V Q P F Y D S P F N V G N S L K P K K G R F L S K E K R A E E W E S G K E R F R L A K L K K E I L E A Q E H P Y H D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R P N V Q E Q G S L N V L N R V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E E A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G G L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C V F E L T L R L E E S L L S R Y P H L P D E S F R E M L E S W S D P L L A K W P E L H G K V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E A V F S S I R K Y D P S S P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E T V E R I I Q A
P o r p h y r o m o n a s g u l a e（配列番号１３１）	W P _ 0 3 9 4 2 6 1 7 6	M T E Q S E R P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F L N L A R H N A Y I T L T H I D R Q L A Y S K A D I T N D Q D V L S F K A L W K N F D N D L E R K S R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S K S S G N K S S K N K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H S G S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V

		D P H Y H F N H L V R K G K K D R Y G H N D N P S F K H H F V D S E G M V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T G P Y E Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K P L Y D R L R E K D R A C F R V P V D I L P D E D D T D G G G E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K M I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I S Q T T P H Y H I E K G K I G L R F M P E G Q H L W P S P E V G T T R T G R S K Y A Q D K R L T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E V S A E K V Q G R I K R V I K D V Y A I Y D A F A R D E I N T L K E L D A C S A D K G I R R G H L P K Q M I G I L S Q E H K N M E E K V R K K L Q E M I A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L D E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L R A R K A F L E R I G R S D R V E N R P F L L L K E P K N D R Q T L V A G W K S E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G Y D E V G S Y K E V G F M A K A V P L Y F E R A C K D R V Q P F Y D S P F N V G N S L K P K K G R F L S K E K R A E E W E S G K E R F R L A K L K K E I L E A K E H P Y H D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R T D V H E Q G S L N V L N R V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E Q A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G G L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C A F E Q T L E L E E S L L T R Y P H L P D E N F R E M L E S W S D P L L G K W P D L H G K V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E A V F S S I R K Y D P S S P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E T V E R I I Q A
P o r p h y r o m o n a	W P _ 0 3 9	M T E Q S E R P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F L N L A R H N A Y I T L T H I D R Q L A Y S K A D I T N D Q D V L S F K A L W K N F D N D L E

s g u l a e（配列番号１３２）	4 3 1 7 7 8	R K S R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S K S S G N K S S K N K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H S E S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V D P H R H F N H L V R K G K K D R Y G H N D N P S F K H H F V D G E G M V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E T Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K P L Y D R L R E D D R A C F R V P V D I L P D E D D T D G G G E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K M I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I S Q T S P H Y H I E K G K I G L R F M P E G Q H L W P S P E V G T T R T G R S K Y A Q D K R L T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E V S A E K V Q G R I K R V I E D V Y A I Y D A F A R D E I N T L K E L D A C L A D K G I R R G H L P K Q M I A I L S Q E H K D M E E K I R K K L Q E M I A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K K R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L R A R K A F L E R I G R S D R M E N R P F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K S E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G Y D E V G S Y R E V G F M A K A V P L Y F E R A C E D R V Q P F Y D S P F N V G N S L K P K K G R F L S K E E R A E E W E R G K E R F R D L E A W S H S A A R R I E D A F A G I E Y A S P G N K K K I E Q L L R D L S L W E A F E S K L K V R A D K I N L A K L K K E I L E A Q E H P Y H D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R P N V Q E Q G S L N V L N R V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E E A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G G L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C V F E L T L R L E E S L L T R Y P

		H L P D E S F R K M L E S W S D P L L A K W P E L H G K V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E A V F S S I R K Y D P S S P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E T V E R I I Q V
P o r p h y r o m o n a s g u l a e （配列番号１３３）	W P _ 0 3 9 4 3 7 1 9 9	M T E Q S E R P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F L N L A R H N A Y I T L T H I D R Q L A Y S K A D I T N D E D I L F F K G Q W K N L D N D L E R K S R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K F F E S K S S G N K S S K N K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H S G S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D E V D P H Y H F N H L V R K G K K D R Y G H N D N P S F K H H F V D G E G M V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E P Y E Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K P L Y D R L R E K D R A C F R V P V D I L P D E D D T D G G G E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K M I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I S Q T T P H Y H I E K G K I G L R F V P E G Q H L W P S P E V G T T R T G R S K Y A Q D K R L T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E V S A E K V Q G R I K R V I E D V Y A I Y D A F A R D E I N T L K E L D A C L A D K G I R R G H L P K Q M I G I L S Q E R K D M E E K V R K K L Q E M I A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L R A R K A F L E R I G R S D R V E N C P F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K G E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G Y D E V G S Y R E V G F M A K A V P L Y F E R A C E D R V Q P F Y D S P F N V G N S L K P K K G R F L S K E K R A E E W E S G K E R F R L A K L K K E I L E A Q E H P Y H D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R P N V Q E Q G S L

		NVLNRVKPMRLPVVVYRADSRGHV HKEEAPLATVYIEERDTKLLKQGN FKSFVKDRRLNGLFSFVDTGALAM EQYPISKLRVEYELAKYQTARVCA FEQTLELEESLLTRYPHLPDESFR EMLESWSDPLLTKWPELHGKVRLL IAVRNAFSHNQYPMYDEAVFSSIW KYDPSSPDAIEERMGLNIAHRLSE EVKQAKETIERIIQA
Porphyromonas gulae（配列番号134）	WP__039442171	MTEQSERPYNGTYYTLEDKHFWAA FLNLARHNAYITLTHIDRQLAYSK ADITNDQDVLSFKALWKNLDNDLE RKSRLRSLILKHFSFLEGAAYGKK LFESKSSGNKSSKNKELTKKEKEE LQANALSLDNLKSILFDFLQKLKD FRNYYSHYRHSGSSELPLFDGNML QRLYNVFDVSVQRVKRDHEHNDKV DPHYHFNHLVRKGKKDRYGHNDNP SFKHHFVDSEGMVTEAGLLFFVSL FLEKRDAIWMQKKIRGFKGGTGPY EQMTNEVFCRSRISLPKLKLESLR TDDWMLLDMLNELVRCPKPLYDRL REKDRACFRVPVDILPDEDDTDGG GEDPFKNTLVRHQDRFPYFALRYF DLKKVFTSLRFHIDLGTYHFAIYK KMIGEQPEDRHLTRNLYGFGRIQD FAEEHRPEEWKRLVRDLDYLETGD KPYISQTTPHYHIEKGKIGLRFVP EGQHLWPSPEVGTTRTGRSKCAQD KRLTAEAFLSVHELMPMMFYYFLL REKYSEEVSAEKVQGRIKRVIEDV YAIYDAFARDEINTLKELDTCLAD KGIRRGHLPKQMITILSQERKDMK EKIRKKLQEMIADTDHRLDMLDRQ TDRKIRIGRKNAGLPKSGVIADWL VRDMMRFQPVAKDASGKPLNNSKA NSTEYRMLQRALALFGGEKERLTP YFRQMNLTGGNNPHPFLHETRWES HTNILSFYRSYLRARKAFLERIGR SDRVENCPFLLLKEPKTDRQTLVA GWKDEFHLPRGIFTEAVRDCLIEM GYDEVGSYREVGFMAKAVPLYFER

10 20 30 40

		A C E D R V Q P F Y D S P F N V G N S L K P K K G R F L S K E D R A E E W E R G M E R F R D L E A W S H S A A R R I K D A F A G I E Y A S P G N K K K I E Q L L R D L S L W E A F E S K L K V R A D K I N L A K L K K E I L E A Q E H P Y H D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R P N V Q E Q G S L N V L N R V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E A P L A T V Y I E E R N T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G G L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C V F E L T L R L E E S L L S R Y P H L P D E S F R E M L E S W S D P L L A K W P E L H G K V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E A V F S S I R K Y D P S S P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E T V E R I I Q A
P o r p h y r o m o n a s g u l a e（配列番号１３５）	W P _ 0 3 9 4 4 5 0 5 5	M N T V P A T E N K G Q S R T V E D D P Q Y F G L Y L N L A R E N L I E V E S H V R I K F G K K K L N E E S L K Q S L L C D H L L S I D R W T K V Y G H S R R Y L P F L H C F D P D S G I E K D H D S K T G V D P D S A Q R L I R E L Y S L L D F L R N D F S H N R L D G T T F E H L K V S P D I S S F I T G A Y T F A C E R A Q S R F A D F F K P D D F L L A K N R K E Q L I S V A D G K E C L T V S G F A F F I C L F L D R E Q A S G M L S R I R G F K R T D E N W A R A V H E T F C D L C I R H P H D R L E S S N T K E A L L L D M L N E L N R C P R I L Y D M L P E E E E R A Q F L P A L D E N S M N N L S E N S L N E E S R L L W D G S S D W A E A L T K R I R H Q D R F P Y L M L R F I E E M D L L K G I R F R V D L G E I E L D S Y S K K V G R N G E Y D R T I T D H A L A F G K L S D F Q N E E E V S R M I S G E A S Y P V R F S L F A P R Y A I Y D N K I G Y C H T S D P V Y P K S K T G E K R A L S N P Q S M G F I S V H D L R K L L L M E L L C E G S F S R M Q S D F L R K A N R I L D E T A E G K L Q F S A L F P E M R H R F I P P Q N P K S K D R R E K A E T T L E K Y K Q E I K G R K D K L N S Q L L S A F D M N Q R Q L P S R L L D E W M N I R P A S H S V K L R T Y V K Q L N E D C R L R L R K F R K D G D G K A R A I P L V G E M A T F L S Q D I V R M I I S E

		E T K K L I T S A Y Y N E M Q R S L A Q Y A G E E N R R Q F R A I V A E L H L L D P S S G H P F L S A T M E T A H R Y T E D F Y K C Y L E K K R E W L A K T F Y R P E Q D E N T K R R I S V F F V P D G E A R K L L P L L I R R R M K E Q N D L Q D W I R N K Q A H P I D L P S H L F D S K I M E L L K V K D G K K K W N E A F K D W W S T K Y P D G M Q P F Y G L R R E L N I H G K S V S Y I P S D G K K F A D C Y T H L M E K T V R D K K R E L R T A G K P V P P D L A A Y I K R S F H R A V N E R E F M L R L V Q E D D R L M L M A I N K M M T D R E E D I L P G L K N I D S I L D E E N Q F S L A V H A K V L E K E G E G G D N S L S L V P A T I E I K S K R K D W S K Y I R Y R Y D R R V P G L M S H F P E H K A T L D E V K T L L G E Y D R C R I K I F D W A F A L E G A I M S D R D L K P Y L H E S S S R E G K S G E H S T L V K M L V E K K G C L T P D E S Q Y L I L I R N K A A H N Q F P C A A E M P L I Y R D V S A K V G S I E G S S A K D L P E G S S L V D S L W K K Y E M I I R K I L P I L D H E N R F F G K L L N N M S Q P I N D L
C a p n o c y t o p h a g a c y n o d e g m i（配列番号１３６）	W P _ 0 4 1 9 8 9 5 8 1	M E N K T S L G N N I Y Y N P F K P Q D K S Y F A G Y L N A A M E N I D S V F R E L G K R L K G K E Y T S E N F F D A I F K E N I S L V E Y E R Y V K L L S D Y F P M A R L L D K K E V P I K E R K E N F K K N F R G I I K A V R D L R N F Y T H K E H G E V E I T D E I F G V L D E M L K S T V L T V K K K K I K T D K T K E I L K K S I E K Q L D I L C Q K K L E Y L K D T A R K I E E K R R N Q R E R G E K K L V P R F E Y S D R R D D L I A A I Y N D A F D V Y I D K K K D S L K E S S K T K Y N T E S Y P Q Q E E G D L K I P I S K N G V V F L L S L F L S K Q E V H A F K S K I A G F K A T V I D E A T V S H R K N S I C F M A T H E I F S H L A Y K K L K R K V R T A E I N Y S E A E N A E Q L S I Y A K E T L M M Q M L D E L S K V P D V V Y Q N L S E D V Q K T F I E D W N E Y L K E N N G D V G T M E E E Q V I H P V I R K R Y E D K F N Y F A I R F L D E F A Q F P T L R F Q V H L G N Y L H D S R P K E H L I S D R R I K E K I T V F G R L S E L E H K K A L F I K N T

		E T N E D R K H Y W E V F P N P N Y D F P K E N I S V N D K D F P I A G S I L D R E K Q P T A G K I G I K V N L L N Q K Y I S E V D K A V K A H Q L K Q R N N K P S I Q N I I E E I V P I N G S N P K E I I V F G G Q P T A Y L S M N D I H S I L Y E F F D K W E K K K E K L E K K G E K E L R K E I G K E L E E K I V G K I Q T Q I Q Q I I D K D I N A K I L K P Y Q D D D S T A I D K E K L I K D L K Q E Q K I L Q K L K N E Q T A R E K E Y Q E C I A Y Q E E S R K I K R S D K S R Q K Y L R N Q L K R K Y P E V P T R K E I L Y Y Q E K G K V A V W L A N D I K R F M P T D F K N E W K G E Q H S L L Q K S L A Y Y E Q C K E E L K N L L P Q Q K V F K H L P F E L G G H F Q Q K Y L Y Q F Y T R Y L D K R L E H I S G L V Q Q A E N F K N E N K V F K K V E N E C F K F L K K Q N Y T H K G L D A Q A Q S V L G Y P I F L E R G F M D E K P T I I K G K T F K G N E S L F T D W F R Y Y K E Y Q N F Q T F Y D T E N Y P L V E L E K K Q A D R K R E T K I Y Q Q K K N D V F T L L M A K H I F K S V F K Q D S I D R F S L E D L Y Q S R E E R L E N Q E K A K Q T G E R N T N Y I W N K T V D L N L C D G K V T V E N V K L K N V G N F I K Y E Y D Q R V Q T F L K Y E E N I K W Q A F L I K E S K E E E N Y P Y I V E R E I E Q Y E K V R R E E L L K E V H L I E E Y I L E K V K D K E I L K K G D N Q N F K Y Y I L N G L L K Q L K N E D V E S Y K V F N L N T K P E D V N I N Q L K Q E A T D L E Q K A F V L T Y I R N K F A H N Q L P K K E F W D Y C Q E K Y G K I E K E K T Y A E Y F A E V F K R E K E A L M K
P r e v o t e l l a s p . P 5 − 1 1 9 （配列番号 1 3 7）	W P _ 0 4 2 5 1 8 1 6 9	M N I P A L V E N Q K K Y F G T Y S V M A M L N A Q T V L D H I Q K V A D I E G E Q N E N N E N L W F H P V M S H L Y N A K N G Y D K Q P E K T M F I I E R L Q S Y F P F L K I M A E N Q R E Y S N G K Y K Q N R V E V N S N D I F E V L K R A F G V L K M Y R D L T N H Y K T Y E E K L I D G C E F L T S T E Q P L S G M I S K Y Y T V A L R N T K E R Y G Y K T E D L A F I Q D N I K K I T K D A Y G K R K S Q V N T G F F L S L Q D Y N G D T Q K K L H L S G V G I A L L I C L F L D K Q Y I N I F L S R L P I F S S Y N A Q S E E R R I

		I I R S F G I N S I K L P K D R I H S E K S N K S V A M D M L N E V K R C P D E L F T T L S A E K Q S R F R I I S D D H N E V L M K R S T D R F V P L L L Q Y I D Y G K L F D H I R F H V N M G K L R Y L L K A D K T C I D G Q T R V R V I E Q P L N G F G R L E E A E T M R K Q E N G T F G N S G I R I R D F E N V K R D D A N P A N Y P Y I V D T Y T H Y I L E N N K V E M F I S D K G S S A P L L P L I E D D R Y V V K T I P S C R M S T L E I P A M A F H M F L F G S K K T E K L I V D V H N R Y K R L F Q A M Q K E E V T A E N I A S F G I A E S D L P Q K I L D L I S G N A H G K D V D A F I R L T V D D M L T D T E R R I K R F K D D R K S I R S A D N K M G K R G F K Q I S T G K L A D F L A K D I V L F Q P S V N D G E N K I T G L N Y R I M Q S A I A V Y D S G D D Y E A K Q Q F K L M F E K A R L I G K G T T E P H P F L Y K V F A R S I P A N A V D F Y E R Y L I E R K F Y L T G L C N E I K R G N R V D V P F I R R D Q N K W K T P A M K T L G R I Y S E D L P V E L P R Q M F D N E I K S H L K S L P Q M E G I D F N N A N V T Y L I A E Y M K R V L N D D F Q T F Y Q W K R N Y H Y M D M L K G E Y D R K G S L Q H C F T S V E E R E G L W K E R A S R T E R Y R K L A S N K I R S N R Q M R N A S S E E I E T I L D K R L S N C R N E Y Q K S E K V I R R Y R V Q D A L L F L L A K K T L T E L A D F D G E R F K L K E I M P D A E K G I L S E I M P M S F T F E K G G K K Y T I T S E G M K L K N Y G D F F V L A S D K R I G N L L E L V G S D I V S K E D I M E E F N K Y D Q C R P E I S S I V F N L E K W A F D T Y P E L S A R V D R E E K V D F K S I L K I L L N N K N I N K E Q S D I L R K I R N A F D H N N Y P D K G I V E I K A L P E I A M S I K K A F G E Y A I M K
Prevotella sp. P4-76（配列番号13）	WP_044072147	M N I P A L V E N Q K K Y F G T Y S V M A M L N A Q T V L D H I Q K V A D I E G E Q N E N N E N L W F H P V M S H L Y N A K N G Y D K Q P E K T M F I I E R L Q S Y F P F L K I M A E N Q R E Y S N G K Y K Q N R V E V N S N D I F E V L K R A F G V L K M Y R D Q A S H Y K T Y D E K L I D G C E F L T S T E Q P L S G M I N N Y Y T V A L R

8)		NMNERYGYKTEDLAFIQDKRFKFV KDAYGKKKSQVNTGFFLSLQDYNG DTQKKLHLSGVGIALLICLFLDKQ YINIFLSRLPIFSSYNAQSEERRI IIRSFGINSIKQPKDRIHSEKSNK SVAMDMLNEIKRCPNELFETLSAE KQSRFRIISNDHNEVLMKRSSDRF VPLLLQYIDYGKLFDHIRFHVNMG KLRYLLKADKTCIDGQTRVRVIEQ PLNGFGRLEEVETMRKQENGTFGN SGIRIRDFENMKRDDANPANYPYI VDTYTHYILENNKVEMFISDEETP APLLPVIEDDRYVVKTIPSCRMST LEIPAMAFHMFLFGSKKTEKLIVD VHNRYKRLFKAMQKEEVTAENIAS FGIAESDLPQKIIDLISGNAHGKD VDAFIRLTVDDMLADTERRIKRFK DDRKSIRSADNKMGKRGFKQISTG KLADFLAKDIVLFQPSVNDGENKI TGLNYRIMQSAIAVYNSGDDYEAK QQFKLMFEKARLIGKGTTEPHPFL YKVFVRSIPANAVDFYERYLIERK FYLIGLSNEIKKGNRVDVPFIRRD QNKWKTPAMKTLGRIYDEDLPVEL PRQMFDNEIKSHLKSLPQMEGIDF NNANVTYLIAEYMKRVLNDDFQTF YQWKRNYRYMDMLRGEYDRKGSLQ SCFTSVEERERGLWKERASRTERYR KLASNKIRSNRQMRNASSEEIETI LDKRLSNSRNEYQKSEKVIRRYRV QDALLFLLAKKTLTELADFDGERF KLKEIMPDAEKGILSEIMPMSFTF EKGGKKYTITSEGMKLKNYGDFFV LASDKRIGNLLELVGSDTVSKEDI MEEFKKYDQCRPEISSIVFNLEKW AFDTYPELSARVDREEKVDFKSIL KILLNNKNINKEQSDILRKIRNAF DHNNYPDKGVVEIRALPEIAMSIK KAFGEYAIMK
Prevotellas	W_44	MNIPALVENQKKYFGTYSVMAMLN AQTVLDHIQKVADIEGEQNENNEN LWFHPVMSHLYNAKNGYDKQPEKT

p．P5－60（配列番号139）	0747 80	MFIIERLQSYFPFLKIMAENQREY SNGKYKQNRVEVNSNDIFEVLKRA FGVLKMYRDLTNHYKTYEEKLIDG CEFLTSTEQPFSGMISKYYTVALR NTKERYGYKAEDLAFIQDNRYKFT KDAYGKRKSQVNTGSFLSLQDYNG DTTKKLHLSGVGIALLICLFLDKQ YINLFLSRLPIFSSYNAQSEERRI IIRSFGINSIKQPKDRIHSEKSNK SVAMDMLNEVKRCPDELFTTLSAE KQSRFRIISDDHNEVLMKRSSDRF VPLLLQYIDYGKLFDHIRFHVNMG KLRYLLKADKTCIDGQTRVRVIEQ PLNGFGRLEEVETMRKQENGTFGN SGIRIRDFENMKRDDANPANYPYI VETYTHYILENNKVEMFISDEENP TPLLPVIEDDRYVVKTIPSCRMST LEIPAMAFHMFLFGSEKTEKLIID VHDRYKRLFQAMQKEEVTAENIAS FGIAESDLPQKIMDLISGNAHGKD VDAFIRLTVDDMLTDTERRIKRFK DDRKSIRSADNKMGKRGFKQISTG KLADFLAKDIVLFQPSVNDGENKI TGLNYRIMQSAIAVYDSGDDYEAK QQFKLMFEKARLIGKGTTEPHPFL YKVFVRSIPANAVDFYERYLIERK FYLIGLSNEIKKGNRVDVPFIRRD QNKWKTPAMKTLGRIYSEDLPVEL PRQMFDNEIKSHLKSLPQMEGIDF NNANVTYLIAEYMKRVLNDDFQTF YQWKRNYRYMDMLRGEYDRKGSLQ HCFTSIEERFGLWKERASRTERYR KLASNKIRSNRQMRNASSEEIETI LDKRLSNCRNEYQKSEKIIRRYRV QDALLFLLAKKTLTELADFDGERF KLKEIMPDAEKGILSEIMPMSFTF EKGGKIYTITSGGMKLKNYGDFFV LASDKRIGNLLELVGSNTVSKEDI MEEFKKYDQCRPEISSIVFNLEKW AFDTYPELPARVDRKEKVDFWSIL DVLSNNKDINNEQSYILRKIRNAF DHNNYPDKGIVEIKALPEIAMSIK

10 20 30 40

		KAFGEYAIMK
Phaeodactylibacter xiamenensis（配列番号140）	WP_042182139	MTNTPKRRTLHRHPSYFGAFLNIA RHNAFMIMEHLSTKYDMEDKNTLD EAQLPNAKLFGCLKKRYGKPDVTE GVSRDLRRYFPFLNYPLFLHLEKQ QNAEQAATYDINPEDIEFTLKGFF RLLNQMRNNYSHYISNTDYGKFDK LPVQDIYEAAIFRLLDRGKHTKRF DVFESKHTRHLESNNSEYRPRSLA NSPDHENTVAFVTCLFLERKYAFP FLSRLDCFRSTNDAAEGDPLIRKA SHECYTMFCCRLPQPKLESSSDILL DMVNELGRCPSALYNLLSEEDQAR FHIKREEITGFEEDPDEELEQEIV LKRHSDRFPYFALRYFDDTEAFQT LRFDVYLGRWRTKPVYKKRIYGQE RDRVLTQSIRTFTRLSRLLPIYEN VKHDAVRQNEEDGKLVNPDVTSQF HKSWIQIESDDRAFLSDRIEHFSP HYNFGDQVIGLKFINPDRYAAIQN VFPKLPGEEKKDKDAKLVNETADA IISTHEIRSLFLYHYLSKKPISAG DERRFIQVDTETFIKQYIDTIKLF FEDIKSGELQPIADPPNYQKNEPL PYVRGDKEKTQEERAQYRERQKEI KERRKELNTLLQNRYGLSIQYIPS RLREYLLGYKKVPYEKLALQKLRA QRKEVKKRIKDIEKMRTPRVGEQA TWLAEDIVFLTPPKMHTPERKTTK HPQKLNNDQFRIMQSSLAYFSVNK KAIKKFFQKETGIGLSNRETSHPF LYRIDVGRCRGILDFYTGYLKYKM DWLDDAIKKVDNRKHGKKEAKKYE KYLPSSIQHKTPLELDYTRLPVYL PRGLFKKAIVKALAAHADFQVEPE EDNVIFCLDQLLDGDTQDFYNWQR YYRSALTEKETDNQLVLAHPYAEQ ILGTIKTLEGKQKNNKLGNKAKQK IKDELIDLKRAKRRLLDREQYLRA VQAEDRALWLMIQERQKQKAEHEE IAFDQLDLKNITKILTESIDARLR IPDTKVDITDKLPLRRYGDLRRVA

10

20

30

40

		K D R R L V N L A S Y Y H V A G L S E I P Y D L V K K E L E E Y D R R R V A F F E H V Y Q F E K E V Y D R Y A A E L R N E N P K G E S T Y F S H W E Y V A V A V K H S A D T H F N E L F K E K V M Q L R N K F H H N E F P Y F D W L L P E V E K A S A A L Y A D R V F D V A E G Y Y Q K M R K L M R Q
F l a v o b a c t e r i u m s p . 3 1 6 （配列番号１４１）	W P _ 0 4 5 9 6 8 3 7 7	M D N N I T V E K T E L G L G I T Y N H D K V E D K H Y F G G F F N L A Q N N I D L V A Q E F K K R L L I Q G K D S I N I F A N Y F S D Q C S I T N L E R G I K I L A E Y F P V V S Y I D L D E K N K S K S I R E H L I L L L E T I N N L R N Y Y T H Y Y H K K I I I D G S L F P L L D T I L L K V V L E I K K K K L K E D K T K Q L L K K G L E K E M T I L F N L M K A E Q K E K K I K G W N I D E N I K G A V L N R A F S H L L Y N D E L S D Y R K S K Y N T E D E T L K D T L T E S G I L F L L S F F L N K K E Q E Q L K A N I K G Y K G K I A S I P D E E I T L K N N S L R N M A T H W T Y S H L T Y K G L K H R I K T D H E K E T L L V N M V D Y L S K V P H E I Y Q N L S E Q N K S L F L E D I N E Y M R D N E E N H D S S E A S R V I H P V I R K R Y E N K F A Y F A I R F L D E F A E F P T L R F M V N V G N Y I H D N R K K D I G G T S L I T N R T I K Q Q I N V F G N L T E I H K K K N D Y F E K E E N K E K T L E W E L F P N P S Y H F Q K E N I P I F I D L E K S K E T N D L A K E Y A K E K K K I F G S S R K K Q Q N T A K K N R E T I I N L V F D K Y K T S D R K T V T F E Q P T A L L S F N E L N S F L Y A F L V E N K T G K E L E K I I I E K I A N Q Y Q I L K N C S S T V D K T N D N I P K S I K K I V N T T T D S F Y F E G K K I D I E K L E K D I T I E I E K T N E K L E T I K E N E E S A Q N Y K R N E R N T Q K R K L Y R K Y V F F T N E I G I E A T W I T N D I L R F L D N K E N W K G Y Q H S E L Q K F I S Q Y D N Y K K E A L G L L E S E W N L E S D A F F G Q N L K R M F Q S N S T F E T F Y K K Y L D N R K N T L E T Y L S A I E N L K T M T D V R P K V L K K K W T E L F R F F D K K I Y L L S T I E T K I N E L I T K P I N L S R G I F E E K P T F I N G K N P N K E N N Q H L F A N W

		F I Y A K K Q T I L Q D F Y N L P L E Q P K A I T N L K K H K Y K L E R S I N N L K I E D I Y I K Q M V D F L Y Q K L F E Q S F I G S L Q D L Y T S K E K R E I E K G K A K N E Q T P D E S F I W K K Q V E I N T H N G R I I A K T K I K D I G K F K N L L T D N K I A H L I S Y D D R I W D F S L N N D G D I T K K L Y S I N T E L E S Y E T I R R E K L L K Q I Q Q F E Q F L L E Q E T E Y S A E R K H P E K F E K D C N P N F K K Y I I E G V L N K I I P N H E I E E I E I L K S K E D V F K I N F S D I L I L N N D N I K K G Y L L I M I R N K F A H N Q L I D K N L F N F S L Q L Y S K N E N E N F S E Y L N K V C Q N I I Q E F K E K L K
Porphyromonas gulae（配列番号142）	WP_046201018	M T E Q S E R P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F L N L A R H N A Y I T L T H I D R Q L A Y S K A D I T N D Q D V L S F K A L W K N F D N D L E R K S R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S K S S G N K S S K N K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H S E S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V D P H R H F N H L V R K G K K D R Y G H N D N P S F K H H F V D S E G M V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E T Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K P L Y D R L R E K D R A R F R V P V D I L P D E D D T D G G G E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K M I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I S Q T T P H Y H I E K G K I G L R F M P E G Q H L W P S P E V G T T R T G R S K Y A Q D K R L T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E V S A E K V Q G R I K R V I E D V Y A I Y D A F A R D E I N T L K E L D A C L A D K G I R R G H L P K Q M I A I L S Q E H K D M E E K I R K K L Q E M I A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K K R L T P

		Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L R A R K A F L E R I G R S D R M E N R P F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K S E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G Y D E V G S Y R E V G F M A K A V P L Y F E R A C E D R V Q P F Y D S P F N V G N S L K P K K G R F L S K E E R A E E W E R G K E R F R D L E A W S H S A A R R I E D A F A G I E Y A S P G N K K K I E Q L L R D L S L W E A F E S K L K V R A D K I N L A K L K K E I L E A Q E H P Y H D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R P N V Q E Q G S L N V L N R V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E E A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G G L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C V F E L T L R L E E S L L T R Y P H L P D E S F R K M L E S W S D P L L A K W P E L H G K V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E A V F S S I R K Y D P S S P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E T V E R I I Q V
WP__04743796（配列番号143）	Chrysobacterium sp. YR477	M E T Q T I G H G I A Y D H S K I Q D K H F F G G F L N L A E N N I K A V L K A F S E K F N V G N V D V K Q F A D V S L K D N L P D N D F Q K R V S F L K M Y F P V V D F I N I P N N R A K F R S D L T T L F K S V D Q L R N F Y T H Y Y H K P L D F D A S L F I L L D D I F A R T A K E V R D Q K M K D D K T R Q L L S K S L S E E L Q K G Y E L Q L E R L K E L N R L G K K V N I H D Q L G I K N G V L N N A F N H L I Y K D G E S F K T K L T Y S S A L T S F E S A E N G I E I S Q S G L L F L L S M F L K R K E I E D L K N R N K G F K A K V V I D E D G K V N G L K F M A T H W V F S Y L C F K G L K S K L S T E F H E E T L L I Q I I D E L S K V P D E L Y C A F D K E T R D K F I E D I N E Y V K E G H Q D F S L E D A K V I H P V I R K R Y E N K F N Y F A I R F L D E F V K F P S L R F Q V H V G N Y V H D R R I K N I D G T T F E T E R V V K D R I K V F G R L S E I S S Y K A Q Y L S S V S D K H D E T G W E I F P N P S Y V F I N N N N I P I H I S V D T S F K K E I A D F K K L R R A Q V P D E L K I R G A E K K R K F

		E I T Q M I G S K S V L N Q E E P I A L L S L N E I P A L L Y E I L I N G K E P A E I E R I I K D K L N E R Q D V I K N Y N P E N W L P A S Q I S R R L R S N K G E R I I N T D K L L Q L V T K E L L V T E Q K L K I I S D N R E A L K Q K K E G K Y I R K F I F T N S E L G R E A I W L A D D I K R F M P A D V R K E W K G Y Q H S Q L Q Q S L A F Y N S R P K E A L A I L E S S W N L K D E K I I W N E W I L K S F T Q N K F F D A F Y N E Y L K G R K K Y F A F L S E H I V Q Y T S N A K N L Q K F I K Q Q M P K D L F E K R H Y I I E D L Q T E K N K I L S K P F I F P R G I F D K K P T F I K G V K V E D S P E S F A N W Y Q Y G Y Q K D H Q F Q K F Y D W K R D Y S D V F L E H L G K P F I N N G D R R T L G M E E L K E R I I I K Q D L K I K K I K I Q D L F L R L I A E N L F Q K V F K Y S A K L P L S D F Y L T Q E E R M E K E N M A A L Q N V R E E G D K S P N I I K D N F I W S K M I P Y K K G Q I I E N A V K L K D I G K L N V L S L D D K V Q T L L S Y D D A K P W S K I A L E N E F S I G E N S Y E V I R R E K L F K E I Q Q F E S E I L F R S G W D G I N H P A Q L E D N R N P K F K M Y I V N G I L R K S A G L Y S Q G E D I W F E Y N A D F N N L D A D V L E T K S E L V Q L A F L V T A I R N K F A H N Q L P A K E F Y F Y I R A K Y G F A D E P S V A L V Y L N F T K Y A I N E F K K V M I
Riem erel la a nati pest ifer（配列番号１４４）	WP_049354263	M F F S F H N A Q R V I F K H L Y K A F D A S L R M V K E D Y K A H F T V N L T R D F A H L N R K G K N K Q D N P D F N R Y R F E K D G F F T E S G L L F F T N L F L D K R D A Y W M L K K V S G F K A S H K Q R E K M T T E V F C R S R I L L P K L R L E S R Y D H N Q M L L D M L S E L S R C P K L L Y E K L S E E N K K H F Q V E A D G F L D E I E E E Q N P F K D T L I R H Q D R F P Y F A L R Y L D L N E S F K S I R F Q V D L G T Y H Y C I Y D K K I G D E Q E K R H L T R T L L S F G R L Q D F T E I N R P Q E W K A L T K D L D Y K E T S N Q P F I S K T T P H Y H I T D N K I G F R L G T S K E L Y P S L E I K D G A N R I A K Y P Y N S G F V A H A F I S V H E L L P L M F Y Q H L T G K S E D L L K E T V R H I Q R I Y K

		D F E E E R I N T I E D L E K A N Q G R L P L G A F P K Q M L G L L Q N K Q P D L S E K A K I K I E K L I A E T K L L S H R L N T K L K S S P K L G K R R E K L I K T G V L A D W L V K D F M R F Q P V A Y D A Q N Q P I K S S K A N S T E F W F I R R A L A L Y G G E K N R L E G Y F K Q T N L I G N T N P H P F L N K F N W K A C R N L V D F Y Q Q Y L E Q R E K F L E A I K N Q P W E P Y Q Y C L L L K I P K E N R K N L V K G W E Q G G I S L P R G L F T E A I R E T L S E D L M L S K P I R K E I K K H G R V G F I S R A I T L Y F K E K Y Q D K H Q S F Y N L S Y K L E A K A P L L K R E E H Y E Y W Q Q N K P Q S P T E S Q R L E L H T S D R W K D Y L L Y K R W Q H L E K K L R L Y R N Q D V M L W L M T L E L T K N H F K E L N L N Y H Q L K L E N L A V N V Q E A D A K L N P L N Q T L P M V L P V K V Y P A T A F G E V Q Y H K T P I R T V Y I R E E H T K A L K M G N F K A L V K D R R L N G L F S F I K E E N D T Q K H P I S Q L R L R R E L E I Y Q S L R V D A F K E T L S L E E K L L N K H T S L S S L E N E F R A L L E E W K K E Y A A S S M V T D E H I A F I A S V R N A F C H N Q Y P F Y K E A L H A P I P L F T V A Q P T T E E K D G L G I A E A L L K V L R E Y C E I V K S Q I
Porphyromonas gingivalis（配列番号145）	WP_052912312	M T E Q N E K P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F F N L A R H N A Y I T L A H I D R Q L A Y S K A D I T N D E D I L F F K G Q W K N L D N D L E R K A R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S Q S S G N K S S K K K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H P E S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V D P H R H F N H L V R K G K K D K Y G N N D N P F F K H H F V D R E E K V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E A Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K L L Y D R L R E E D R A R F R V P V D I L S D E D D T D G T E E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K N I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D

		F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I T Q T T P H Y H I E K G K I G L R F V P E G Q L L W P S P E V G A T R T G R S K Y A Q D K R F T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E A S A E K V Q G R I K R V I E D V Y A V Y D A F A R D E I N T R D E L D A C L A D K G I R R G H L P R Q M I A I L S Q E H K D M E E K V R K K L Q E M I A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L K A R K A F L Q S I G R S D R E E N H R F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K S E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G Y D E V G S Y K E V G F M A K A V P L Y F E R A C K D R V Q P F Y D Y P F N V G N S L K P K K G R F L S K E K R A E E W E S G K E R F R D L E A W S H S A A R R I E D A F V G I E Y A S W E N K K K I E Q L L Q D L S L W E T F E S K L K V K A D K I N I A K L K K E I L E A K E H P Y H D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R T D V Q E Q G S L N V L N H V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E E A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G A L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C A F E Q T L E L E E S L L T R Y P H L P D E S F R E M L E S W S D P L L D K W P D L Q R E V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E T I F S S I R K Y D P S S L D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K L A K E M V E R I I Q A
Porphyromonas gingivalis（配列番号146）	WP_058019250	M T E Q N E K P Y N G T Y Y T L K D K H F W A A F F N L A R H N A Y I T L T H I D R Q L A Y S K A D I T N D E D I L F F K G Q W K N L D N D L E R K A R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E S Q S S G N K S S K K K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H P E S S E L P M F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V D P H R H F N H L V R K G K K D R C G N N D N P F F K H H F V D R E G K V T E A G L L F F V S L

		F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E T Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K S L Y D R L R E E D R A C F R V P V D I L S D E D D T D G A E E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K N I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D C F E T G D K P Y I T Q T T P H Y H I E K G K I G L R F V P E G Q H L W P S P E V G A T R T G R S K Y A Q D K R F T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E V S A E R V Q G R I K R V I E D V Y A V Y D A F A R D E I N T R D E L D A C L A D K G I R R G H L P R Q M I A I L S Q K H K D M E E K V R K K L Q E M I A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L K A R K A F L Q S I G R S D R V E N H R F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K G E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G L D E V G S Y K E V G F M A K A V P L Y F E R A C K D R V Q P F Y D Y P F N V G N S L K P K K G R F L S K E K R A E E W E S G K E R F R D L E A W S H S A A R R I E D A F A G I E N A S R E N K K K I E Q L L Q D L S L W E T F E S K L K V K A D K I N I A K L K K E I L E A K E H P Y L D F K S W Q K F E R E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R T D V Q E Q G S L N V L N H V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E Q A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G A L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C A F E Q T L E L E E S L L T R Y P H L P D E N F R K M L E S W S D P L L D K W P D L H R K V R L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E A V F S S I R K Y D P S S P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E M A E R I I Q A
F l a v o b a c t e r i	W P __ 0 6 0	M S S K N E S Y N K Q K T F N H Y K Q E D K Y F F G G F L N N A D D N L R Q V G K E F K T R I N F N H N N N E L A S V F K D Y F N K E K S V A K

um c olum nare （配列番号１４７）	3 8 1 8 5 5	R E H A L N L L S N Y F P V L E R I Q K H T N H N F E Q T R E I F E L L L D T I K K L R D Y Y T H H Y H K P I T I N P K V Y D F L D D T L L D V L I T I K K K K V K N D T S R E L L K E K F R P E L T Q L K N Q K R E E L I K K G K K L L E E N L E N A V F N H C L R P F L E E N K T D D K Q N K T V S L R K Y R K S K P N E E T S I T L T Q S G L V F L I S F F L H R K E F Q V F T S G L E G F K A K V N T I K E E E I S L N K N N I V Y M I T H W S Y S Y Y N F K G L K H R I K T D Q G V S T L E Q N N T T H S L T N T N T K E A L L T Q I V D Y L S K V P N E I Y E T L S E K Q Q K E F E E D I N E Y M R E N P E N E D S T F S S I V S H K V I R K R Y E N K F N Y F A M R F L D E Y A E L P T L R F M V N F G D Y I K D R Q K K I L E S I Q F D S E R I I K K E I H L F E K L G L V T E Y K K N V Y L K E T S N I D L S R F P L F P S P S Y V M A N N N I P F Y I D S R S N N L D E Y L N Q K K K A Q S Q N R K R N L T F E K Y N K E Q S K D A I I A M L Q K E I G V K D L Q Q R S T I G L L S C N E L P S M L Y E V I V K D I K G A E L E N K I A Q K I R E Q Y Q S I R D F T L D S P Q K D N I P T T L T K T I S T D T S V T F E N Q P I D I P R L K N A L Q K E L T L T Q E K L L N V K Q H E I E V D N Y N R N K N T Y K F K N Q P K D K V D D N K L Q R K Y V F Y R N E I G Q E A N W L A S D L I H F M K N K S L W K G Y M H N E L Q S F L A F F E D K K N D C I A L L E T V F N L K E D C I L T K D L K N L F L K H G N F I D F Y K E Y L K L K E D F L N T E S T F L E N G F I G L P P K I L K K E L S K R L N Y I F I V F Q K R Q F I I K E L E E K K N N L Y A D A I N L S R G I F D E K P T M I P F K K P N P D E F A S W F V A S Y Q Y N N Y Q S F Y E L T P D K I E N D K K K K Y K N L R A I N K V K I Q D Y Y L K L M V D T L Y Q D L F N Q P L D K S L S D F Y V S K T D R E K I K A D A K A Y Q K R N D S F L W N K V I H L S L Q N N R I T A N P K L K D I G K Y K R A L Q D E K I A T L L T Y D D R T W T Y A L Q K P E K E N E N D Y K E L H Y T A L N M E L Q E Y E K V R S K K L L K Q V Q E L E K Q I L D K F Y D F S N N A T H P E D L E I E D K K G K R H P N

		F K L Y I T K A L L K N E S E I I N L E N I D I E I L I K Y Y D Y N T E K L K E K I K N M D E D E K A K I V N T K E N Y N K I T N V L I K K A L V L I I I R N K M A H N Q Y P P K F I Y D L A T R F V P K K E E E Y F A C Y F N R V F E T I T T E L W E N K K K A K E I V
Porphyromonas gingivalis（配列番号１４８）	WP_061564704.1	M T E Q N E R P Y N G T Y Y T L E D K H F W A A F F N L A R H N A Y I T L T H I D R Q L A Y S K A D I T N D E D I L F F K G Q W K N L D N D L E R K A R L R S L I L K H F S F L E G A A Y G K K L F E N K S S G N K S S K K K E L T K K E K E E L Q A N A L S L D N L K S I L F D F L Q K L K D F R N Y Y S H Y R H P E S S E L P L F D G N M L Q R L Y N V F D V S V Q R V K R D H E H N D K V D P H R H F N H L V R K G K K D R C G N N D N P F F K H H F V D R E G K V T E A G L L F F V S L F L E K R D A I W M Q K K I R G F K G G T E A Y Q Q M T N E V F C R S R I S L P K L K L E S L R T D D W M L L D M L N E L V R C P K S L Y D R L R E E D R A R F R V P V D I L S D E D D T D G T E E D P F K N T L V R H Q D R F P Y F A L R Y F D L K K V F T S L R F H I D L G T Y H F A I Y K K N I G E Q P E D R H L T R N L Y G F G R I Q D F A E E H R P E E W K R L V R D L D Y F E T G D K P Y I T Q T T P H Y H I E K G K I G L R F V P E G Q H L W P S P E V G A T R T G R S K Y A Q D K R L T A E A F L S V H E L M P M M F Y Y F L L R E K Y S E E V S A E K V Q G R I K R V I E D V Y A V Y D A F A R G E I D T L D R L D A C L A D K G I R R G H L P R Q M I A I L S Q E H K D M E E K V R K K L Q E M I A D T D H R L D M L D R Q T D R K I R I G R K N A G L P K S G V I A D W L V R D M M R F Q P V A K D T S G K P L N N S K A N S T E Y R M L Q R A L A L F G G E K E R L T P Y F R Q M N L T G G N N P H P F L H E T R W E S H T N I L S F Y R S Y L K A R K A F L Q S I G R S D R E E N H R F L L L K E P K T D R Q T L V A G W K S E F H L P R G I F T E A V R D C L I E M G Y D E V G S Y K E V G F M A K A V P L Y F E R A C K D R V Q P F Y D Y P F N V G N S L K P K K G R F L S K E K R A E E W E S G K E R F R L A K L K K E I L E A K E H P Y L D F K S W Q K F E R

		E L R L V K N Q D I I T W M M C R D L M E E N K V E G L D T G T L Y L K D I R T E V Q E Q G S L N V L N R V K P M R L P V V V Y R A D S R G H V H K E Q A P L A T V Y I E E R D T K L L K Q G N F K S F V K D R R L N G L F S F V D T G G L A M E Q Y P I S K L R V E Y E L A K Y Q T A R V C A F E Q T L E L E E S L L T R C P H L P D K N F R K M L E S W S D P L L D K W P D L Q R E V W L L I A V R N A F S H N Q Y P M Y D E A V F S S I R K Y D P S S P D A I E E R M G L N I A H R L S E E V K Q A K E M A E R I I Q A
P o r p h y r o m o n a s g i n g i v a l i s （配列番号１４９）	W P _ 0 6 1 1 5 6 6 3 7	M N T V P A S E N K G Q S R T V E D D P Q Y F G L Y L N L A R E N L I E V E S H V R I K F G K K K L N E E S L K Q S L L C D H L L S V D R W T K V Y G H S R R Y L P F L H Y F D P D S Q I E K D H D S K T G V D P D S A Q R L I R E L Y S L L D F L R N D F S H N R L D G T T F E H L E V S P D I S S F I T G T Y S L A C G R A Q S R F A D F F K P D D F V L A K N R K E Q L I S V A D G K E C L T V S G L A F F I C L F L D R E Q A S G M L S R I R G F K R T D E N W A R A V H E T F C D L C I R H P H D R L E S S N T K E A L L L D M L N E L N R C P R I L Y D M L P E E E R A Q F L P A L D E N S M N N L S E N S L N E E S R L L W D G S S D W A E A L T K R I R H Q D R F P Y L M L R F I E E M D L L K G I R F R V D L G E I E L D S Y S K K V G R N G E Y D R T I T D H A L A F G K L S D F Q N E E E V S R M I S G E A S Y P V R F S L F A P R Y A I Y D N K I G Y C H T S D P V Y P K S K T G E K R A L S N P Q S M G F I S V H D L R K L L L M E L L C E G S F S R M Q S G F L R K A N R I L D E T A E G K L Q F S A L F P E M R H R F I P P Q N P K S K D R R E K A E T T L E K Y K Q E I K G R K D K L N S Q L L S A F D M N Q R Q L P S R L L D E W M N I R P A S H S V K L R T Y V K Q L N E D C R L R L R K F R K D G D G K A R A I P L V G E M A T F L S Q D I V R M I I S E E T K K L I T S A Y Y N E M Q R S L A Q Y A G E E N R R Q F R A I V A E L H L L D P S S G H P F L S A T M E T A H R Y T E D F Y K C Y L E K K R E W L A K T F Y R P E Q D E N T K R R I S V F F V P D G E A R K L L P L L I R R R M K E Q N D L

		Q D W I R N K Q A H P I D L P S H L F D S K I M E L L K V K D G K K K W N E A F K D W W S T K Y P D G M Q P F Y G L R R E L N I H G K S V S Y I P S D G K K F A D C Y T H L M E K T V Q D K K R E L R T A G K P V P P D L A A D I K R S F H R A V N E R E F M L R L V Q E D D R L M L M A I N K M M T D R E E D I L P G L K N I D S I L D K E N Q F S L A V H A K V L E K E G E G G D N S L S L V P A T I E I K S K R K D W S K Y I R Y R Y D R R V P G L M S H F P E H K A T L D E V K T L L G E Y D R C R I K I F D W A F A L E G A I M S D R D L K P Y L H E S S S R E G K S G E H S T L V K M L V E K K G C L T P D E S Q Y L I L I R N K A A H N Q F P C A A E M P L I Y R D V S A K V G S I E G S S A K D L P E G S S L V D S L W K K Y E M I I R K I L P I L D P E N R F F G K L L N N M S Q P I N D L
R i e m e r e l l a a n a t i p e s t i f e r （配列番号１５０）	W P _ _ 0 6 1 7 1 0 1 3 8	M F F S F H N A Q R V I F K H L Y K A F D A S L R M V K E D Y K A H F T V N L T R D F A H L N R K G K N K Q D N P D F N R Y R F E K D G F F T E S G L L F F T N L F L D K R D A Y W M L K K V S G F K A S H K Q S E K M T T E V F C R S R I L L P K L R L E S R Y D H N Q M L L D M L S E L S R C P K L L Y E K L S E K D K K C F Q V E A D G F L D E I E E E Q N P F K D T L I R H Q D R F P Y F A L R Y L D L N E S F K S I R F Q V D L G T Y H Y C I Y D K K I G Y E Q E K R H L T R T L L N F G R L Q D F T E I N R P Q E W K A L T K D L D Y N E T S N Q P F I S K T T P H Y H I T D N K I G F R L R T S K E L Y P S L E V K D G A N R I A K Y P Y N S D F V A H A F I S I S V H E L L P L M F Y Q H L T G K S E D L L K E T V R H I Q R I Y K D F E E E R I N T I E D L E K A N Q G R L P L G A F P K Q M L G L L Q N K Q P D L S E K A K I K I E K L I A E T K L L S H R L N T K L K S S P K L G K R R E K L I K T G V L A D W L V K D F M R F Q P V V Y D A Q N Q P I K S S K A N S T E S R L I R R A L A L Y G G E K N R L E G Y F K Q T N L I G N T N P H P F L N K F N W K A C R N L V D F Y Q Q Y L E Q R E K F L E A I K H Q P W E P Y Q Y C L L L K V P K E N R K N L V K G W E Q G G I S L P R G L F T E A I R E T L S K D L T L

		S K P I R K E I K K H G R V G F I S R A I T L Y F K E K Y Q D K H Q S F Y N L S Y K L E A K A P L L K K E E H Y E Y W Q Q N K P Q S P T E S Q R L E L H T S D R W K D Y L L Y K R W Q H L E K K L R L Y R N Q D I M L W L M T L E L T K N H F K E L N L N Y H Q L K L E N L A V N V Q E A D A K L N P L N Q T L P M V L P V K V Y P T T A F G E V Q Y H E T P I R T V Y I R E E Q T K A L K M G N F K A L V K D R H L N G L F S F I K E E N D T Q K H P I S Q L R L R R E L E I Y Q S L R V D A F K E T L S L E E K L L N K H A S L S S L E N E F R T L L E E W K K K Y A A S S M V T D K H I A F I A S V R N A F C H N Q Y P F Y K E T L H A P I L L F T V A Q P T T E E K D G L G I A E A L L R V L R E Y C E I V K S Q I
Flavobacterium columnare（配列番号151）	WP_063744070	M S S K N E S Y N K Q K T F N H Y K Q E D K Y F F G G F L N N A D D N L R Q V G K E F K T R I N F N H N N N E L A S V F K D Y F N K E K S V A K R E H A L N L L S N Y F P V L E R I Q K H T N H N F E Q T R E I F E L L L D T I K K L R D Y Y T H H Y H K P I T I N P K I Y D F L D D T L L D V L I T I K K K K V K N D T S R E L L K E K L R P E L T Q L K N Q K R E E L I K K G K K L L E E N L E N A V F N H C L R P F L E E N K T D D K Q N K T V S L R K Y R K S K P N E E T S I T L T Q S G L V F L M S F F L H R K E F Q V F T S G L E G F K A K V N T I K E E K I S L N K N N I V Y M I T H W S Y S Y Y N F K G L K H R I K T D Q G V S T L E Q N N T T H S L T N T N T K E A L L T Q I V D Y L S K V P N E I Y E T L S E K Q Q K E F E E D I N E Y M R E N P E N E D S T F S S I V S H K V I R K R Y E N K F N Y F A M R F L D E Y A E L P T L R F M V N F G D Y I K D R Q K K I L E S I Q F D S E R I I K K E I H L F E K L G L V T E Y K K N V Y L K E T S N I D L S R F P L F P S P S Y V M A N N N I P F Y I D S R S N N L D E Y L N Q K K K A Q S Q N R K R N L T F E K Y N K E Q S K D A I I A M L Q K E I G V K D L Q Q R S T I G L L S C N E L P S M L Y E V I V K D I K G A E L E N K I A Q K I R E Q Y Q S I R D F T L N S P Q K D N I P T T L I K T I S T D T S V T F E N Q P I D I P R L K N A I Q K E L A L T Q E K L L N

		V K Q H E I E V N N Y N R N K N T Y K F K N Q P K D K V D D N K L Q R K Y V F Y R N E I G Q E A N W L A S D L I H F M K N K S L W K G Y M H N E L Q S F L A F F E D K K N D C I A L L E T V F N L K E D C I L T K D L K N L F L K H G N F I D F Y K E Y L K L K E D F L N T E S T F L E N G F I G L P P K I L K K E L S K R L N Y I F I V F Q K R Q F I I K E L E E K K N N L Y A D A I N L S R G I F D E K P T M I P F K K P N P D E F A S W F V A S Y Q Y N N Y Q S F Y E L T P D K I E N D K K K K Y K N L R A I N K V K I Q D Y Y L K L M V D T L Y Q D L F N Q P L D K S L S D F Y V S K T D R E K I K A D A K A Y Q K R N D S F L W N K V I H L S L Q N N R I T A N P K L K D I G K Y K R A L Q D E K I A T L L T Y D D R T W T Y A L Q K P E K E N E N D Y K E L H Y T A L N M E L Q E Y E K V R S K K L L K Q V Q E L E K Q I L D K F Y D F S N N A T H P E D L E I E D K K G K R H P N F K L Y I T K A L L K N E S E I I N L E N I D I E I L I K Y Y D Y N T E K L K E K I K N M D E D E K A K I V N T K E N Y N K I T N V L I K K A L V L I I I R N K M A H N Q Y P P K F I Y D L A T R F V P K K E E E Y F A C Y F N R V F E T I T T E L W E N K K K A K E I V
Riemerella anatipestifer（配列番号１５２）	WP_064970887	M E K P L P P N V Y T L K H K F F W G A F L N I A R H N A F I T I C H I N E Q L G L T T P P N D D K I A D V V C G T W N N I L N N D H D L L K K S Q L T E L I L K H F P F L A A M C Y H P P K K E G K K K G S Q K E Q Q K E K E N E A Q S Q A E A L N P S E L I K V L K T L V K Q L R T L R N Y Y S H H S H K K P D A E K D I F K H L Y K A F D A S L R M V K E D Y K A H F T V N L T Q D F A H L N R K G K N K Q D N P D F D R Y R F E K D G F F T E S G L L F F T N L F L D K R D A Y W M L K K V S G F K A S H K Q S E K M T T E V F C R S R I L L P K L R L E S R Y D H N Q M L L D M L S E L S R Y P K L L Y E K L S E E D K K R F Q V E A D G F L D E I E E E Q N P F K D T L I R H Q D R F P Y F A L R Y L D L N E S F K S I R F Q V D L G T Y H Y C I Y D K K I G D E Q E K R H L T R T L L S F G R L Q D F T E I N R P Q E W K A L T K D L D Y K E T S K Q P F I S K T T P H Y H I T D

		NKIGFRLGTSKELYPSLEVKDGAN RIAQYPYNSDFVAHAFISVHELLP LMFYQHLTGKSEDLLKETVRHIQR IYKDFEEERINTIEDLEKANQGRL PLGAFPKQMLGLLQNKQPDLSEKA KIKIEKLIAETKLLSHRLNTKLKS SPKLGKRREKLIKTGVLADWLVKD FMRFQPVAYDAQNQPIESSKANST EFQLIQRALALYGGEKNRLEGYFK QTNLIGNTNPHPFLNKFNWKACRN LVDFYQQYLEQREKFLEAIKNQPW EPYQYCLLLKIPKENRKNLVKGWE QGGISLPRGLFTEAIRETLSKDLT LSKPIRKEIKKHGRVGFISRAITL YFREKYQDDHQSFYDLPYKLEAKA SPLPKKEHYEYWQQNKPQSPTELQ RLELHTSDRWKDYLLYKRWQHLEK KLRLYRNQDVMLWLMTLELTKNHF KELNLNYHQLKLENLAVNVQEADA KLNPLNQTLPMVLPVKVYPATAFG EVQYQETPIRTVYIREEQTKALKM GNFKALVKDRRLNGLFSFIKEENT TQKHPISQLRLRRELEIYQSLRVD AFKETLNLEEKLLKKHTSLSSVEN KFRILLEEWKKEYAASSMVTDEHI AFIASVRNAFCHNQYPFYEEALHA PIPLFTVAQQTTEEKDGLGIAEAL LRVLREYCEIVKSQI
Sinomicrobium oceani（配列番号153）	WP_072319476.1	MESTTTLGLHLKYQHDLFEDKHYF GGGVNLAVQNIESIFQAFAERYGI QNPLRKNGVPAINNIFHDNISISN YKEYLKFLKQYLPVVGFLEKSNEI NIFEFREDFEILINAIYKLRHFYT HYYHSPIKLEDRFYTCLNELFVAV AIQVKKHKMKSDKTRQLLNKNLHQ LLQQLIEQKREKLKDKKAEGEKVS LDTKSIENAVLNDAFVHLLDKDEN IRLNYSSRLSEDIITKNGITLSISI GLLFLLSLFLQRKEAEDLRSRIEG FKGKGNELRFMATHWVFSYLNVKR IKHRLNTDFQKETLLIQIADELSK VPDEVYKTLDHENRSKFLEDINEY

10 20 30 40

		I R E G N E D A S L N E S T V V H G V I R K R Y E N K F H Y L V L R Y L D E F V D F P S L R F Q V H L G N Y I H D R R D K V I D G T N F I T N R V I K E P I K V F G K L S H V S K L K S D Y M E S L S R E H K N G W D V F P N P S Y N F V G H N I P I F I N L R S A S S K G K E L Y R D L M K I K S E K K K K S R E E G I P M E R R D G K P T K I E I S N Q I D R N I K D N N F K D I Y P G E P L A M L S L N E L P A L L F E L L R R P S I T P Q D I E D R M V E K L Y E R F Q I I R D Y K P G D G L S T S K I S K K L R K A D N S T R L D G K K L L R A I Q T E T R N A R E K L H T L E E N K A L Q K N R K R R T V Y T T R E Q G R E A S W L A Q D L K R F M P I A S R K E W R G Y H H S Q L Q Q I L A F Y D Q N P K Q P L E L L E Q F W D L K E D T Y V W N S W I H K S L S Q H N G F V P M Y E G Y L K G R L G Y Y K K L E S D I I G F L E E H K V L K R Y Y T Q Q H L N V I F R E R L Y F I K T E T K Q K L E L L A R P L V F P R G I F D D K P T F V Q D K K V V D H P E L F A D W Y V Y S Y K D D H S F Q E F Y H Y K R D Y N E I F E T E L S W D I D F K D N K R Q L N P S E Q M D L F R M K W D L K I K K I K I Q D I F L K I V A E D I Y L K I F G H K I P L S L S D F Y I S R Q E R L T L D E Q A V A Q S M R L P G D T S E N Q I K E S N L W Q T T V P Y E K E Q I R E P K I K L K D I G K F K Y F L Q Q Q K V L N L L K Y D P Q H V W T K A E L E E E L Y I G K H S Y E V V R R E M L L Q K C H Q L E K H I L E Q F R F D G S N H P R E L E Q G N H P N F K M Y I V N G I L T K R G E L E I E A E N W W L E L G N S K N S L D K V E V E L L T M K T I P E Q K A F L L I L I R N K F A H N Q L P A D N Y F H Y A S N L M N L K K S D T Y S L F W F T V A D T I V Q E F M S L
Reichenbachiella agariperforans（配	WP_073124441.1	M K T N P L I A S S G E K P N Y K K F N T E S D K S F K K I F Q N K G S I A P I A E K A C K N F E I K S K S P V N R D G R L H Y F S V G H A F K N I D S K N V F R Y E L D E S Q M D M K P T Q F L A L Q K E F F D F Q G A L N G L L K H I R N V N S H Y V H T F E K L E I Q S I N Q K L I T F L I E A F E L A V I H S Y L N E E E L S Y E A Y K D D P Q S G Q K L V Q F L C D K F Y P N K E H E

列番号１５４）		VEERKTILAKNKRQALEHLLFIEV TSDIDWKLFEKHKVFTISNGKYLS FHACLFLLSLFLYKSEANQLISKI KGFKRNDDNQYRSKRQIFTFFSKK FTSQDVNSEEQHLVKFRDVIQYLN HYPSAWNKHLELKSGYPQMTDKLM RYIVEAEIYRSFPDQTDNHRFLLF AIREFFGQSCLDTWTGNTPINFSN QEQKGFSYEINTSAEIKDIETKLK ALVLKGPLNFKEKKEQNRLEKDLR REKKEQPTNRVKEKLLTRIQHNML YVSYGRNQDRFMDFAARFLAETDY FGKDAKFKMYQFYTSDEQRDHLKE QKKELPKKEFEKLKYHQSKLVDYF TYAEQQARYPDWDTPFVVENNAIQ IKVTLFNGAKKIVSVQRNLMLYLL EDALYSEKRENAGKGLISGYFVHH QKELKDQLDILEKETEISREQKRE FKKLLPKRLLHRYSPAQINDTTEW NPMEVILEEAKAQEQRYQLLLEKA ILHQTEEDFLKRNKGKQFKLRFVR KAWHLMYLKELYMNKVAEHGHHKS FHITKEEFNDFCRWMFAFDEVPKY KEYLCDYFSQKGFFNNAEFKDLIE SSTSLNDLYEKTKQRFEGWSKDLT KQSDENKYLLANYESMLKDDDMLYV NISHFISYLESKGKINRNAHGHIA YKALNNVPHLIEEYYYKDRLAPEE YKSHGKLYNKLKTVKLEDALLYEM AMHYLSLEPALVPKVKTKVKDILS SNIAFDIKDAAGHHLYHLLIPFHK IDSFVALINHQSQQEKDPDKTSFL AKIQPYLEKVKNSKDLKAVYHYYK DTPHTLRYEDLNMIHSHIVSQSVQ FTKVALKLEEYFIAKKSITLQIAR QISYSEIADLSNYFTDEVRNTAFH FDVPETAYSMILQGIESEFLDREI KPQKPKSLSELSTQQVSVCTAFLE TLHNNLFDRKDDKKERLSKARERY FEQIN

【０３８７】

ある特定の例示的実施形態では、ＲＮＡ標的化エフェクタータンパク質は、２０１７年６月２６日に出願された米国仮特許出願第６２／５２５，１６５号、及び２０１７年８月

１６日に出願されたＰＣＴ出願第ＵＳ　２０１７／０４７１９３号に開示されるＣａｓ１３ｃエフェクタータンパク質である。Ｃａｓ１３ｃの例示的な野生型オーソログ配列は、以下の表４Ｂに提供されるある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲエフェクタータンパク質は、表４ａまたは４ｂからのＣａｓ１３ｃタンパク質である。

【表４ａ】

表４ａ

Fusobacterium necrophorum subsp.funduliforme ATCC 51357 contig00003（配列番号１５５）		MEKFRRQNRNSIIKIIISNYDTKG IKELKVRYRKQAQLDTFIIKTEIV NNDIFIKSIIEKAREKYRYSFLFD GEEKYHFKNKSSVEIVKKDIFSQT PDNMIRNYKITLKISEKNPRVVEA EIEDLMNSTILKDGRRSARREKSM TERKLIEEKVAKNYSLLANCPMEE VDSIKIYKIKRFLTYRSNMLLYFA SINSFLCEGIKGKDNETEEIWHLK DNDVRKEKVRENFKNKLIQSTENY NSSLKNQIEEKEKLLRKEFKKGAF YRTIIKKLQQERIKELSEKSLTED CEKIIKLYSKLRHSLMHYDYQYFE NLFENKKNDDLMKDLNLDLFKSLP LIRKMKLNNKVNYLEDGDTLFVLQ KTKKAKTLYQIYDALCEQKNGFNK FINDFFVSDGEENTVFKQIINEKF QSEMEFLEKRISESEKKNEKLKKK LDSMKAHFRNINSEDTKEAYFWDI HSSRNYKTKYNERKNLVNEYTELL GSSKEKKLLREEITKINRQLLKLK QEMEEITKKNSLFRLEYKMKIAFG FLFCEFDGNISKFKDEFDASNQEK IIQYHKNGEKYLTSFLKEEEKEKF NLEKMQKIIQKTEEEDWLLPETKN NLFKFYLLTYLLLPYELKGDFLGF VKKHYYDIKNVDFIDENQNNIQVS QTVEKQEDYFYHKIRLFEKNTKKY EIVKYSIVPNEKLKQYFEDLGIDI KYLTVEQKSEVSEEKNKKVSLKNN GMFNKTILLFVFKYYQIAFKLFND IELYSLFFLREKSGKPLEIFRKEL ESKMKDGYLNFGQLLYVVYEVLVK NKDLDKILSKKIDYRKDKSFSPEI AYLRNFLSHLNYSKFLDNFMKINT

		NKSDENKEVLIPSIKIQKMIQFIE KCNLQNQIDFDFNFVNDFYMRKEK MFFIQLKQIFPDINSTEKQKMNEK EEILRNRYHLTDKKNEQIKDEHEA QSQLYEKILSLQKIYSSDKNNFYG RLKEEKLLFLEKQGKKKLSMEEIK DKIAGDISDLLGILKKEITRDIKD KLTEKFRYCEEKLLNLSFYNHQDK KKEESIRVFLIRDKNSDNFKFESI LDDGSNKIFISKNGKEITIQCCDK VLETLIIEKNTLKISSNGKIISLI PHYSYSIDVKY
Fusobacterium necrophorum DJ－2 contig0065、全ゲノムショットガンシークエンス（配列番号156）		MEKFRRQNRSSIIKIIISNYDTKG IKELKVRYRKQAQLDTFIIKTEIV NNDIFIKSIIEKAREKYRYSFLFD GEEKYHFKNKSSVEIVKKDIFSQT PDNMIRNYKITLKISEKNPRVVEA EIEDLMNSTILKDGRRSARREKSM TERKLIEEEKVAENYSLLANCPMEE VDSIKIYKIKRFLTYRSNMLLYFA SINSFLCEGIKGKDNETEEIWHLK DNDVRKEKVKENFKNKLIQSTENY NSSLKNQIEEKEKLLRKESKKGAF YRTIIKKLQQERIKELSEKSLTED CEKIIKLYSELRHPLMHYDYQYFE NLFENKENSELTKNLNLDIFKSLP LVRKMKLNNKVNYLEDNDTLFVLQ KTKKAKTLYQIYDALCEQKNGFNK FINDFFVSDGEENTVFKQIINEKF QSEIEFLEKRISESEKKNEKLKKK LDSMKAHFRNINSEDTKEAYFWDI HSSRNYKTKYNERKNLVNEYTELL GSSKEKKLLREEITKINRQLLKLK QEMEEITKKNSLFRLEYKMKMAFG FLFCEFDGNISRFKDEFDASNQEK IIQYHKNGEKYLTYFLKEEEKEKF NLKKLQETIQKTGEENWLLPQNKN NLFKFYLLTYLLLPYELKGDFLGF VKKHYYDIKNVDFMDENQSSKIIE SKEDDFYHKIRLFEKNTKKYEIVK YSIVPDKKLKQYFKDLGIDTKYLI LDQKSEVSGEKNKKVSLKNNGMFN

		KTILLFVFKYYQIAFKLFNDIELY SLFFLREKSGKPFEVFLKELKDKM IGKQLNFGQLLYVVYEVLVKNKDL SEILSERIDYRKDMCFSAEIADLR NFLSHLNYSKFLDNFMKINTNKSD ENKEVLIPSIKIQKMIKFIEECNL QSQIDFDFNFVNDFYMRKEKMFFI QLKQIFPDINSTEKQKMNEKEEIL RNRYHLTDKKNEQIKDEHEAQSQL YEKILSLQKIYSSDKNNFYGRLKE EKLLFLEKQEKKKLSMEEIKDKIA GDISDLLGILKKEITRDIKDKLTE KFRYCEEKLLNLSFYNHQDKKKEE SIRVFLIRDKNSDNFKFESILDDG SNKIFISKNGKEITIQCCDKVLET LIIEKNTLKISSNGKIISLIPHYS YSIDVKY
Fusobacterium necrophorum BFTR-1 contig0068（配列番号157）		MKVRYRKQAQLDTFIIKTEIVNND IFIKSIIEKAREKYRYSFLFDGEE KYHFKNKSSVEIVKNDIFSQTPDN MIRNYKITLKISEKNPRVVEAEIE DLMNSTILKDGRRSARREKSMTER KLIEEKVAENYSLLANCPIEEVDS IKIYKIKRFLTYRSNMLLYFASIN SFLCEGIKGKDNETEEIWHLKDND VRKEKVKENFKNKLIQSTENYNSS LKNQIEEKEKLSSKEFKKGAFYRT IIKKLQQERIKELSEKSLTEDCEK IIKLYSELRHPLMHYDYQYFENLF ENKENSELTKNLNLDIFKSLPLVR KMKLNNKVNYLEDNDTLFVLQKTK KAKTLYQIYDALCEQKNGFNKFIN DFFVSDGEENTVFKQIINEKFQSE MEFLEKRISESEKKNEKLKKKLDS MKAHFRNINSEDTKEAYFWDIHSS RNYKTKYNERKNLVNEYTKLLGSS KEKKLLREEITKINRQLLKLKQEM EEITKKNSLFRLEYKMKIAFGFLF CEFDGNISKFKDEFDASNQEKIIQ YHKNGEKYLTSFLKEEEKEKFNLE KMQKIIQKTEEEDWLLPETKNNLF KFYLLTYLLLPYELKGDFLGFVKK

		HYYDIKNVDFMDENQNNIQVSQTV EKQEDYFYHKIRLFEKNTKKYEIV KYSIVPNEKLKQYFEDLGIDIKYL TGSVESGEKWLGENLGIDIKYLTV EQKSEVSEEKNKKVSLKNNGMFNK TILLFVFKYYQIAFKLFNDIELYS LFFLREKSEKPFEVFLEELKDKMI GKQLNFGQLLYVVYEVLVKNKDLD KILSKKIDYRKDKSFSPEIAYLRN FLSHLNYSKFLDNFMKINTNKSDE NKEVLIPSIKIQKMIQFIEKCNLQ NQIDFDFNFVNDFYMRKEKMFFIQ LKQIFPDINSTEKQKKSEKEEILR KRYHLINKKNEQIKDEHEAQSQLY EKILSLQKIFSCDKNNFYRRLKEE KLLFLEKQGKKKISMKEIKDKIAS DISDLLGILKKEITRDIKDKLTEK FRYCEEKLLNISFYNHQDKKKEEG IRVFLIRDKNSDNFKFESILDDGS NKIFISKNGKEITIQCCDKVLETL MIEKNTLKISSNGKIISLIPHYSY SIDVKY
Fusobacterium necrophorum subsp.funduliforme 1__1__36 Sont1.14（配列番号158）		MTEKKSIIFKNKSSVEIVKKDIFS QTPDNMIRNYKITLKISEKNPRVV EAEIEDLMNSTILKDGRRSARREK SMTERKLIEEKVAENYSLLANCPM EEVDSIKIYKIKRFLTYRSNMLLY FASINSFLCEGIKGKDNETEEIWH LKDNDVRKEKVKENFKNKLIQSTE NYNSSLKNQIEEKEKLLRKESKKG AFYRTIIKKLQQERIKELSEKSLT EDCEKIIKLYSELRHPLMHYDYQY FENLFENKENSELTKNLNLDIFKS LPLVRKMKLNNKVNYLEDNDTLFV LQKTKKAKTLYQIYDALCEQKNGF NKFINDFFVSDGEENTVFKQIINE KFQSEMEFLEKRISESEKKNEKLK KKFDSMKAHFHNINSEDTKEAYFW DIHSSSNYKTKYNERKNLVNEYTE LLGSSKEKKLLREEITQINRKLLK LKQEMEEITKKNSLFRLEYKMKIA FGFLFCEFDGNISKFKDEFDASNQ

10 20 30 40

		EKIIQYHKNGEKYLTYFLKEEEKE KFNLEKMQKIIQKTEEEDWLLPET KNNLFKFYLLTYLLLPYELKGDFL GFVKKHYYDIKNVDFMDENQNNIQ VSQTVEKQEDYFYHKIRLFEKNTK KYEIVKYSIVPNEKLKQYFEDLGI DIKYLTGSVESGEKWLGENLGIDI KYLTVEQKSEVSEEKIKKFL
Fusobacterium perfoetens ATCC 29250 T364 DRAFT__scaffold00009.9__C（配列番号159）		MGKPNRSSIIKIIISNYDNKGIKE VKVRYNKQAQLDTFLIKSELKDGK FILYSIVDKAREKYRYSFEIDKTN INKNEILIIKKDIYSNKEDKVIRK YILSFEVSEKNDRTIVTKIKDCLE TQKKEKFERENTRRLISETERKLL SEETQKTYSKIACCSPEDIDSVKI YKIKRYLAYRSNMLLFFSLINDIF VKGVVKDNGEEVGEIWRIIDSKEI DEKKTYDLLVENFKKRMSQEFINY KQSIENKIEKNTNKIKEIEQKLKK EKYKKEINRLKKQLIELNRENDLL EKDKIELSDEEIREDIEKILKIYS DLRHKLMHYNYQYFENLFENKKIS KEKNEDVNLTELLDLNLFRYLPLV RQLKLENKTNYLEKEDKITVLGVS DSAIKYYSYYNFLCEQKNGFNNFI NSFFSNDGEENKSFKEKINLSLEK EIEIMEKETNEKIKEINKNELQLM KEQKELGTAYVLDIHSLNDYKISH NERNKNVKLQNDIMNGNRDKNALD KINKKLVELKIKMDKITKRNSILR LKYKLQVAYGFLMEEYKGNIKKFK DEFDISKEKIKSYKSKGEKYLEVK SEKKYITKILNSIEDIHNITWLKN QEENNLFKFYVLTYILLPFEFRGD FLGFVKKHYYDIKNVEFLDENNDR LTPEQLEKMKNDSFFNKIRLFEKN SKKYDILKESILTSERIGKYFSLL NTGAKYFEYGGEENRGIFNKNIII PIFKYYQIVLKLYNDVELAMLLTL SESDEKDINKIKELVTLKEKVSPK KIDYEKKYKFSVLLDCFNRIINLG KKDFLASEEVKEVAKTFTNLAYLR

		NKICHLNYSKFIDDLLTIDTNKST TDSEGKLLINDRIRKLIKFIRENN QKMNISIDYNYINDYYMKKEKFIF GQRKQAKTIIDSGKKANKRNKAEE LLKMYRVKKENINLIYELSKKLNE LTKSELFLLDKKLLKDIDFTDVKI KNKSFFELKNDVKEVANIKQALQK HSSELIGIYKKEVIMAIKRSIVSK LIYDEEKVLSIIIYDKTNKKYEDF LLEIRRERDINKFQFLIDEKKEKL GYEKIIETKEKKKVVVKIQNNSEL VSEPRIIKNKDKKKAKTPEEISKL GILDLTNHYCFNLKITL
Fusobacterium ulcerans ATCC 49185 cont2.38（配列番号160）		MENKGNNKKIDFDENYNILVAQIK EYFTKEIENYNNRIDNIIDKKELL KYSEKKEESEKNKKLEELNKLKSQ KLKILTDEEIKADVIKIIKIFSDL RHSLMHYEYKYFENLFENKKNEEL AELLNLNLNLFKNLTLLRQMKIENKT NYLEGREEFNIIGKNIKAKEVLGH YNLLAEQKNGFNNFINSFFVQDGT ENLEFKKLIDEHFVNAKKRLERNI KKSKKLEKELEKMEQHYQRLNCAY VWDIHTSTTYKKLYNKRKSLIEEY NKQINEIKDKEVITAINVELLRIK KEMEEITKSNSLFRLKYKMQIAYA FLEIEFGGNIAKFKDEFDCSKMEE VQKYLKKGVKYLKYYKDKEAQKNY EFPFEEIFENKDTHNEEWLENTSE NNLFKFYILTYLLLPMEFKGDFLG VVKKHYYDIKNVDFTDESEKELSQ VQLDKMIGDSFFHKIRLFEKNTKR YEIIKYSILTSDEIKRYFRLLELD VPYFEYEKGTDEIGIFNKNIILTI FKYYQIIFRLYNDLEIHGLFNISS DLDKILRDLKSYGNKNINFREFLY VIKQNNNSSTEEEYRKIWENLEAK YLRLHLLTPEKEEIKTKTKEELEK LNEISNLRNGICHLNYKEIIEEIL KTEISEKNKEATLNEKIRKVINFI KENELDKVELGFNFINDFFMKKEQ FMFGQIKQVKEGNSDSITTERERK

		EKNNKKLKETYELNCDNLSEFYET SNNLRERANSSSLLEDSAFLKKIG LYKVKNNKVNSKVKDEEKRIENIK RKLLKDSSDIMGMYKAEVVKKLKE KLILIFKHDEEKRIYVTVYDTSKA VPENISKEILVKRNNSKEEYFFED NNKKYVTEYYTLEITETNELKVIP AKKLEGKEFKTEKNKENKLMLNNH YCFNVKIIY
Anaerosalibacter sp.ND1ゲノムアセンブリAnaerosalibacter massiliensis ND1（配列番号１６１）		MKSGRREKAKSNKSSIVRVIISNF DDKQVKEIKVLYTKQGGIDVIKFK STEKDEKGRMKFNFDCAYNRLEEE EFNSFGGKGKQSFFVTTNEDLTEL HVTKRHKTTGEIIKDYTIQGKYTP IKQDRTKVTVSITDNKDHFDSNDL GDKIRLSRSLTQYTNRILLDADVM KNYREIVCSDSEKVDETINIDSQE IYKINRFLSYRSNMIIYYQMINNF LLHYDGEEDKGGNDSINLINEIWK YENKKNDEKEKIIERSYKSIEKSI NQYILNHNTEVESGDKEKKIDISE ERIKEDLKKTFILFSRLRHYMVHY NYKFYENLYSGKNFIIYNKDKSKS RRFSELLDLNIFKELSKIKLVKNR AVSNYLDKKTTIHVLNKNINAIKL LDIYRDICETKNGFNNFINNNMMTI SGEEDKEYKEMVTKHFNENMNKLS IYLENFKKHSDFKTNNKKKETYNL LKQELDEQKKLRLWFNAPYVYDIH SSKKYKELYVERKKYVDIHSKLIE AGINNDNKKKLNEINVKLCELNTE MKEMTKLNSKYRLQYKLQLAFGFI LEEFNLDIDKFVSAFDKDNNLTIS KFMEKRETYLSKSLDRRDNRFKKL IKDYKFRDTEDIFCSDRENNLVKL YILMYILLPVEIRGDFLGFVKKNY YDLKHVDFIDKRNNDNKDTFFHDL RLFEKNVKRLEVTSYSLSDGFLGK KSREKFGKELEKFIYKNVSIALPT NIDIKEFNKSLVLPMMKNYQIIFK LLNDIEISALFLIAKKEGNEGSIT FKKVIDKVRKEDMNGNINFSQVMK

10 20 30 40

		M A L N E K V N C Q I R N S I A H I N M K Q L Y I E P L N I Y I N N N Q N K K T I S E Q M E E I I D I C I T K G L T G K E L N K N I I N D Y Y M K K E K L V F N L K L R K R N N L V S I D A Q Q K N M K E K S I L N K Y D L N Y K D E N L N I K E I I L K V N D L N N K Q K L L K E T T E G E S N Y K N A L S K D I L L L N G I I R K N I N F K I K E M I L G I I Q Q N E Y R Y V N I N I Y D K I R K E D H N I D L K I N N K Y I E I S C Y E N K S N E S T D E R I N F K I K Y M D L K V K N E L L V P S C Y E D I Y I K K K I D L E I R Y I E N C K V V Y I D I Y Y K K Y N I N L E F D G K T L F V K F N K D V K K N N Q K V N L E S N Y I Q N I K F I V S

【表４Ｂ】

表４Ｂ

名前	配列
E H O 1 9 0 8 1	M T E K K S I I F K N K S S V E I V K K D I F S Q T P D N M I R N Y K I T L K I S E K N P R V V E Λ E I E D L M N S T I L K D G R R S A R R E K S M T E R K L I E E K V A E N Y S L L A N C P M E E V D S I K I Y K I K R F L T Y R S N M L L Y F A S I N S F L C E G I K G K D N E T E E I W H L K D N D V R K E K V K E N F K N K L I Q S T E N Y N S S L K N Q I E E K E K L L R K E S K K G A F Y R T I I K K L Q Q E R I K E L S E K S L T E D C E K I I K L Y S E L R H P L M H Y D Y Q Y F E N L F E N K E N S E L T K N L N L D I F K S L P L V R K M K L N N K V N Y L E D N D T L F V L Q K T K K A K T L Y Q I Y D A L C E Q K N G F N K F I N D F F V S D G E E N T V F K Q I I N E K F Q S E M E F L E K R I S E S E K K N E K L K K K F D S M K A H F H N I N S E D T K E A Y F W D I H S S S N Y K T K Y N E R K N L V N E Y T E L L G S S K E K K L L R E E I T Q I N R K L L K L K Q E M E E I T K K N S L F R L E Y K M K I A F G F L F C E F D G N I S K F K D E F D A S N Q E K I I Q Y H K N G E K Y L T Y F L K E E E K E K F N L E K M Q K I I Q K T E E E D W L L P E T K N N L F K F Y L L T Y L L L P Y E L K G D F L G F V K K H Y Y D I K N V D F M D E N Q N N I Q V S Q T V E K Q E D Y F Y H K I R L F E K N T K K Y E I V K Y S I V P N E K L K Q Y F E D L G I D I K Y L T G S V E S G E K W L G E N L G I D I K Y L T V E Q K S E V S E E K I K K F L
W P — 0 9 4 8 9 9 3	M E K D K K G E K I D I S Q E M I E E D L R K I L I L F S R L R H S M V H Y D Y E F Y Q A L Y S G K D F V I S D K N N L E N R M I S Q L L D L N I F K E L S K V K L I K D K A I S N Y L D K N T T I H V L G Q D I K A I R L L D I Y R D I C G S K N G F N K F I N T M I T I S G E E D R E Y K E K V I E H F N K K M E N L S T Y

3 6	L E K L E K Q D N A K R N N K R V Y N L L K Q K L I E Q Q K L K E W F G G P Y V Y D I H S S K R Y K E L Y I E R K K L V D R H S K L F E E G L D E K N K K E L T K I N D E L S K L N S E M K E M T K L N S K Y R L Q Y K L Q L A F G F I L E E F D L N I D T F I N N F D K D K D L I I S N F M K K R D I Y L N R V L D R G D N R L K N I I K E Y K F R D T E D I F C N D R D N N L V K L Y I L M Y I L L P V E I R G D F L G F V K K N Y Y D M K H V D F I D K K D K E D K D T F F H D L R L F E K N I R K L E I T D Y S L S S G F L S K E H K V D I E K K I N D F I N R N G A M K L P E D I T I E E F N K S L I L P I M K N Y Q I N F K L L N D I E I S A L F K I A K D R S I T F K Q A I D E I K N E D I K K N S K K N D K N N H K D K N I N F T Q L M K R A L H E K I P Y K A G M Y Q I R N N I S H I D M E Q L Y I D P L N S Y M N S N K N N I T I S E Q I E K I I D V C V T G G V T G K E L N N N I I N D Y Y M K K E K L V F N L K L R K Q N D I V S I E S Q E K N K R E E F V F K K Y G L D Y K D G E I N I I E V I Q K V N S L Q E E L R N I K E T S K E K L K N K E T L F R D I S L I N G T I R K N I N F K I K E M V L D I V R M D E I R H I N I H I Y Y K G E N Y T R S N I I K F K Y A I D G E N K K Y Y L K Q H E I N D I N L E L K D K F V T L I C N M D K H P N K N K Q T I N L E S N Y I Q N V K F I I P
W P _ 0 4 0 4 9 0 8 7 6	M E N K G N N K K I D F D E N Y N I L V A Q I K E Y F T K E I E N Y N N R I D N I I D K K E L L K Y S E K K E E S E K N K K L E E L N K L K S Q K L K I L T D E E I K A D V I K I I K I F S D L R H S L M H Y E Y K Y F E N L F E N K K N E E L A E L L N L N L F K N L T L L R Q M K I E N K T N Y L E G R E E F N I I G K N I K A K E V L G H Y N L L A E Q K N G F N N F I N S F F V Q D G T E N L E F K K L I D E H F V N A K K R L E R N I K K S K K L E K E L E K M E Q H Y Q R L N C A Y V W D I H T S T T Y K K L Y N K R K S L I E E Y N K Q I N E I K D K E V I T A I N V E L L R I K K E M E E I T K S N S L F R L K Y K M Q I A Y A F L E I E F G G N I A K F K D E F D C S K M E E V Q K Y L K K G V K Y L K Y Y K D K E A Q K N Y E F P F E E I F E N K D T H N E E W L E N T S E N N L F K F Y I L T Y L L L P M E F K G D F L G V V K K H Y Y D I K N V D F T D E S E K E L S Q V Q L D K M I G D S F F H K I R L F E K N T K R Y E I I K Y S I L T S D E I K R Y F R L L E L D V P Y F E Y E K G T D E I G I F N K N I I L T I F K Y Y Q I I F R L Y N D L E I H G L F N I S S D L D K I L R D L K S Y G N K N I N F R E F L Y V I K Q N N N S S T E E E Y R K I W E N L E A K Y L R L H L L T P E K E E I K T K T K E E L E K L N E I S N L R N G I C H L N Y K E I I E E I L K T E I S E K N K E A T L N E K I R K V I N F I K E N E L D K V E L G F N F I N D F F M K K E Q F M F G Q I K Q V K E G N S D S I T T E R E R K E K N N K K L K

	ETYELNCDNLSEFYETSNNLRERANSSSLLED SAFLKKIGLYKVKNNKVNSKVKDEEKRIENIK RKLLKDSSDIMGMYKAEVVKKLKEKLILIFKH DEEKRIYVTVYDTSKAVPENISKEILVKRNNS KEEYFFEDNNKKYVTEYYTLEITETNELKVIP AKKLEGKEFKTEKNKENKLMLNNHYCFNVKII Y
W P __ 0 4 7 3 9 6 6 0 7	MEEIKHKKNKSSIIRVIVSNYDMTGIKEIKVL YQKQGGVDTFNLKTIINLESGNLEIISCKPKE REKYRYEFNCKTEINTISITKKDKVLKKEIRK YSLELYFKNEKKDTVVAKVTDLLKAPDKIEGE RNHLRKLSSSTERKLLSKTLCKNYSEISKTPI EEIDSIKIYKIKRFLNYRSNFLIYFALINDFL CAGVKEDDINEVWLIQDKEHTAFLENRIEKIT DYIFDKLSKDIENKKNQFEKRIKKYKTSLEEL KTETLEKNKTFYIDSIKTKITNLENKITELSL YNSKESLKEDLIKIISIFTNLRHSLMHYDYKS FENLFENIENEELKNLLDLNLFKSIRMSDEFK TKNRTNYLDGTESFTIVKKHQNLKKLYTYYNN LCDKKNGFNTFINSFFVTDGIENTDFKNLIIL HFEKEMEEYKKSIEYYKIKISNEKNKSKKEKL KEKIDLLQSELINMREHKNLLKQIYFFDIHNS IKYKELYSERKNLIEQYNLQINGVKDVTAINH INTKLLSLKNKMDKITKQNSLYRLKYKLKIAY SFLMIEFDGDVSKFKNNFDPTNLEKRVEYLDK KEEYLNYTAPKNKFNFAKLEEELQKIQSTSEM GADYLNVSPENNLFKFYILTYIMLPVEFKGDF LGFVKNHYYNIKNVDFMDESLLDENEVDSNKL NEKIENLKDSSFFNKIRLFEKNIKKYEIVKYS VSTQENMKEYFKQLNLDIPYLDYKSTDEIGIF NKNMILPIFKYYQNVFKLCNDIEIHALLALAN KKQQNLEYAIYCCSKKNSLNYNELLKTFNRKT YQNLSFIRNKIAHLNYKELFSDLFNNELDLNT KVRCLIEFSQNNKFDQIDLGMNFINDYYMKKT RFIFNQRRLRDLNVPSKEKIIDGKRKQQNDSN NELLKKYGLSRTNIKDIFNKAWY
W P __ 0 3 5 9 3 5 6 7 1	MKVRYRKQAQLDTFIIKTEIVNNDIFIKSIIE KAREKYRYSFLFDGEEKYHFKNKSSVEIVKND IFSQTPDNMIRNYKITLKISEKNPRVVEAEIE DLMNSTILKDGRRSARREKSMTERKLIEEKVA ENYSLLANCPIEEVDSIKIYKIKRFLTYRSNM LLYFASINSFLCEGIKGKDNETEEIWHLKDND

10 20 30 40

	VRKEKVKENFKNKLIQSTENYNSSLKNQIEEK EKLSSKEFKKGAFYRTIIKKLQQERIKELSEK SLTEDCEKIIKLYSELRHPLMHYDYQYFENLF ENKENSELTKNLNLDIFKSLPLVRKMKLNNKV NYLEDNDTLFVLQKTKKAKTLYQIYDALCEQK NGFNKFINDFFVSDGEENTVFKQIINEKFQSE MEFLEKRISESEKKNEKLKKKLDSMKAHFRNI NSEDTKEAYFWDIHSSRNYKTKYNERKNLVNE YTKLLGSSKEKKLLREEITKINRQLLKLKQEM EEITKKNSLFRLEYKMKIAFGFLFCEFDGNIS KFKDEFDASNQEKIIQYHKNGEKYLTSFLKEE EKEKFNLEKMQKIIQKTEEEDWLLPETKNNLF KFYLLTYLLLPYELKGDFLGFVKKHYYDIKNV DFMDENQNNIQVSQTVEKQEDYFYHKIRLFEK NTKKYEIVKYSIVPNEKLKQYFEDLGIDIKYL TGSVESGEKWLGENLGIDIKYLTVEQKSEVSE EKNKKVSLKNNGMFNKTILLFVFKYYQIAFKL FNDIELYSLFFLREKSEKPFEVFLEELKDKMI GKQLNFGQLLYVVYEVLVKNKDLDKILSKKID YRKDKSFSPEIAYLRNFLSHLNYSKFLDNFMK INTNKSDENKEVLIPSIKIQKMIQFIEKCNLQ NQIDFDFNFVNDFYMRKEKMFFIQLKQIFPDI NSTEKQKKSEKEEILRKRYHLINKKNEQIKDE HEAQSQLYEKILSLQKIFSCDKNNFYRRLKEE KLLFLEKQGKKKISMKEIKDKIASDISDLLGI LKKEITRDIKDKLTEKFRYCEEKLLNISFYNH QDKKKEEGIRVFLIRDKNSDNFKFESILDDGS NKIFISKNGKEITIQCCDKVLETLMIEKNTLK ISSNGKIISLIPHYSYSIDVKY
W P __ 0 3 5 9 0 6 5 6 3	MEKFRRQNRSSIIKIIISNYDTKGIKELKVRY RKQAQLDTFIIKTEIVNNDIFIKSIIEKAREK YRYSFLFDGEEKYHFKNKSSVEIVKKDIFSQT PDNMIRNYKITLKISEKNPRVVEAEIEDLMNS TILKDGRRSARREKSMTERKLIEEKVAENYSL LANCPMEEVDSIKIYKIKRFLTYRSNMLLYFA SINSFLCEGIKGKDNETEEIWHLKDNDVRKEK VKENFKNKLIQSTENYNSSLKNQIEEKEKLLR KESKKGAFYRTIIKKLQQERIKELSEKSLTED CEKIIKLYSELRHPLMHYDYQYFENLFENKEN SELTKNLNLDIFKSLPLVRKMKLNNKVNYLED NDTLFVLQKTKKAKTLYQIYDALCEQKNGFNK FINDFFVSDGEENTVFKQIINEKFQSEIEFLE

	KRISESEKKNEKLKKKLDSMKAHFRNINSEDT
	KEAYFWDIHSSRNYKTKYNERKNLVNEYTELL
	GSSKEKKLLREEITKINRQLLKLKQEMEEITK
	KNSLFRLEYKMKMAFGFLFCEFDGNISRFKDE
	FDASNQEKIIQYHKNGEKYLTYFLKEEEKEKF
	NLKKLQETIQKTGEENWLLPQNKNNLFKFYLL
	TYLLLPYELKGDFLGFVKKHYYDIKNVDFMDE
	NQSSKIIESKEDDFYHKIRLFEKNTKKYEIVK
	YSIVPDKKLKQYFKDLGIDTKYLILDQKSEVS
	GEKNKKVSLKNNGMFNKTILLFVFKYYQIAFK
	LFNDIELYSLFFLREKSGKPFEVFLKELKDKM
	IGKQLNFGQLLYVVYEVLVKNKDLSEILSERI
	DYRKDMCFSAEIADLRNFLSHNYSKFLDNFMK
	INTNKSDENKEVLIPSIKIQKMIKFIEECNLQ
	SQIDFDFNFVNDFYMRKEKMFFIQLKQIFPDI
	NSTEKQKMNEKEEILRNRYHLTDKKNEQIKDE
	HEAQSQLYEKILSLQKIYSSDKNNFYGRLKEE
	KLLFLEKQEKKKLSMEEIKDKIAGDISDLLGI
	LKKEITRDIKDKLTEKFRYCEEKLLNLSFYNH
	QDKKKEESIRVFLIRDKNSDNFKFESILDDGS
	NKIFISKNGKEITIQCCDKVLETLIIEKNTLK
	ISSNGKIISLIPHYSYSIDVKY
WP	MKSGRREKAKSNKSSIVRVIISNFDDKQVKEI
__0	KVLYTKQGGIDVIKFKSTEKDEKGRMKFNFDC
42	AYNRLEEEEFNSFGGKGKQSFFVTTNEDLTEL
67	HVTKRHKTTGEIIKDYTIQGKYTPIKQDRTKV
89	TVSITDNKDHFDSNDLGDKIRLSRSLTQYTNR
31	ILLDADVMKNYREIVCSDSEKVDETINIDSQE
	IYKINRFLSYRSNMIIYYQMINNFLLHYDGEE
	DKGGNDSINLINEIWKYENKKNDEKEKIIERS
	YKSIEKSINQYILNHNTEVESGDKEKKIDISE
	ERIKEDLKKTFILFSRLRHYMVHYNYKFYENL
	YSGKNFIIYNKDKSKSRRFSELLDLNIFKELS
	KIKLVKNRAVSNYLDKKTTIHVLNKNINAIKL
	LDIYRDICETKNGFNNFINNNMMTISGEEDKEY
	KEMVTKHFNENMNKLSIYLENFKKHSDFKTNN
	KKKETYNLLKQELDEQKKLRLWFNAPYVYDIH
	SSKKYKELYVERKKYVDIHSKLIEAGINNDNK
	KKLNEINVKLCELNTEMKEMTKLNSKYRLQYK
	LQLAFGFILEEFNLDIDKFVSAFDKDNNLTIS
	KFMEKRETYLSKSLDRRDNRFKKLIKDYKFRD
	TEDIFCSDRENNLVKLYILMYILLPVEIRGDF

	LGFVKKNYYDLKHVDFIDKRNNDNKDTFFHDL RLFEKNVKRLEVTSYSLSDGFLGKKSREKFGK ELEKFIYKNVSIALPTNIDIKEFNKSLVLPMM KNYQIIFKLLNDIEISALFLIAKKEGNEGSIT FKKVIDKVRKEDMNGNINFSQVMKMALNEKVN CQIRNSIAHINMKQLYIEPLNIYINNNQNKKT ISEQMEEIIDICITKGLTGKELNKNIIINDYYM KKEKLVFNLKLRKRNNLVSIDAQQKNMKEKSI LNKYDLNYKDENLNIKEIILKVNDLNNKQKLL KETTEGESNYKNALSKDILLLNGIIRKNINFK IKEMILGIIQQNEYRYVNINIYDKIRKEDHNI DLKINNKYIEISCYENKSNESTDERINFKIKY MDLKVKNELLVPSCYEDIYIKKKIDLEIRYIE NCKVVYIDIYYKKYNINLEFDGKTLFVKFNKD VKKNNQKVNLESNYIQNIKFIVS
W P _ 0 6 2 6 2 7 8 4 6	MEKFRRQNRNSIIKIIISNYDTKGIKELKVRY RKQAQLDTFIIKTEIVNNDIFIKSIIEKAREK YRYSFLFDGEEKYHFKNKSSVEIVKKDIFSQT PDNMIRNYKITLKISEKNPRVVEAEIEDLMNS TILKDGRRSΛRREKSVTERKLIEEKVΛENYSL LANCPMEEVDSIKIYKIKRFLTYRSNMLLYFA SINSFLCEGIKGKENETEEIWHLKDNDVRKEK VKENFKNKLIQSTENYNSSLKNQIEEKEKLLR KESKKGAFYRTIIKKLQQERIKELSEKSLTED CEKIIKLYSKLRHSLMHYDYQYFENLFENKET PELKDKLDLHLFKSLPLIRKMKLNNKVNYLED GDTLFVLQKTKKAKTLYQIYDALCEQKNGFNK FINDFFVSDGEENTVFKQIINEKFQSEMEFLG KRISESEEKNPKLKKKFDSMKAHFHNINSEDT KEAYFWDIHSSSNYKTKYNERKNLVNEYTELL GSSKEKKLLREEITQINRKLLKLKQEMEEITK KNSLFRLEYKMKMAFGFLFCEFDGNISRFKDE FDASNQEKIIQYHKNGEKYLTYFLKEEEKEKF NLKKLQETIQKTGKENWLLPQNKNNLFKFYLL TYLLLPYELKGDFLGFVKKHYYDIKNVDFMDE NQSSKIIESKEDDFYHKIRLFEKNTKKYEIVK YSIVPDEKLKQYFKDLGIDTKYLILEQKSEVS GEKNKKVSLKNNGMFNKTILLFVFKYYQIAFK LFNDIELYSLFFLREKSGKPFEVFLKELKDKM IGKQLNFGQLLYVIYEVLVKNKDLSEILSERI DYRKDMCFSAEIADLRNFLSHLNYSKFLDNFM KINTNKSDENKEVLIPSIKIQKMIKFIEECNL

	QSQIDFDFNFVNDFYMRKEKMFFIQLKQIFPD
	INSTEKQKMNEKEEILRNRYHLTDKKNEQIKD
	EHEAQSQLYEKILSLQKIYSSDKNNFYGRLKE
	EKLLFLGKQGKKKLSMEEIKDKIAGDISDLLG
	ILKKEITRDIKDKLTEKFRYCEEKLLNLSFYN
	HQDKKKEESIRVFLIRDKNSDNFKFESILDDG
	SNKIFISKNGKEITIQCCDKVLETLMIEKNTL
	KISSNGKIISLVPHYSYSIDVKY
WP	MEKFRRQNRNSIIKIIISNYDTKGIKELKVRY
__0	RKQAQLDTFIIKTEIVNNDIFIKSIIEKAREK
05	YRYSFLFDGEEKYHFKNKSSVEIVKKDIFSQT
95	PDNMIRNYKITLKISEKNPRVVEAEIEDLMNS
92	TILKDGRRSARREKSMTERKLIEEKVAKNYSL
31	LANCPMEEVDSIKIYKIKRFLTYRSNMLLYFA
	SINSFLCEGIKGKDNETEEIWHLKDNDVRKEK
	VRENFKNKLIQSTENYNSSLKNQIEEKEKLLR
	KEFKKGAFYRTIIKKLQQERIKELSEKSLTED
	CEKIIKLYSKLRHSLMHYDYQYFENLFENKKN
	DDLMKDLNLDLFKSLPLIRKMKLNNKVNYLED
	GDTLFVLQKTKKAKTLYQIYDALCEQKNGFNK
	FINDFFVSDGEENTVFKQIINEKFQSEMEFLE
	KRISESEKKNEKLKKKLDSMKAHFRNINSEDT
	KEAYFWDIHSSRNYKTKYNERKNLVNEYTELL
	GSSKEKKLLREEITKINRQLLKLKQEMEEITK
	KNSLFRLEYKMKIAFGFLFCEFDGNISKFKDE
	FDASNQEKIIQYHKNGEKYLTSFLKEEEKEKF
	NLEKMQKIIQKTEEEDWLLPETKNNLFKFYLL
	TYLLLPYELKGDFLGFVKKHYYDIKNVDFIDE
	NQNNIQVSQTVEKQEDYFYHKIRLFEKNTKKY
	EIVKYSIVPNEKLKQYFEDLGIDIKYLTVEQK
	SEVSEEKNKKVSLKNNGMFNKTILLFVFKYYQ
	IAFKLFNDIELYSLFFLREKSGKPLEIFRKEL
	ESKMKDGYLNFGQLLYVVYEVLVKNKDLDKIL
	SKKIDYRKDKSFSPEIAYLRNFLSHLNYSKFL
	DNFMKINTNKSDENKEVLIPSIKIQKMIQFIE
	KCNLQNQIDFDFNFVNDFYMRKEKMFFIQLKQ
	IFPDINSTEKQKMNEKEEILRNRYHLTDKKNE
	QIKDEHEAQSQLYEKILSLQKIYSSDKNNFYG
	RLKEEKLLFLEKQGKKKLSMEEIKDKIAGDIS
	DLLGILKKEITRDIKDKLTEKFRYCEEKLLNL
	SFYNHQDKKKEESIRVFLIRDKNSDNFKFESI
	LDDGSNKIFISKNGKEITIQCCDKVLETLIIE

	KNTLKISSNGKIISLIPHYSYSIDVKY
W P	MGKPNRSSIIKIIISNYDNKGIKEVKVRYNKQ
__ 0	AQLDTFLIKSELKDGKFILYSIVDKAREKYRY
2 7	SFEIDKTNINKNEILIIKKDIYSNKEDKVIRK
1 2	YILSFEVSEKNDRTIVTKIKDCLETQKKEKFE
8 6	RENTRRLISETERKLLSEETQKTYSKIACCSP
1 6	EDIDSVKIYKIKRYLAYRSNMLLFFSLINDIF
	VKGVVKDNGEEVGEIWRIIDSKEIDEKKTYDL
	LVENFKKRMSQEFINYKQSIENKIEKNTNKIK
	EIEQKLKKEKYKKEINRLKKQLIELNRENDLL
	EKDKIELSDEEIREDIEKILKIYSDLRHKLMH
	YNYQYFENLFENKKISKEKNEDVNLTELLDLN
	LFRYLPLVRQLKLENKTNYLEKEDKITVLGVS
	DSAIKYYSYYNFLCEQKNGFNNFINSFFSNDG
	EENKSFKEKINLSLEKEIEIMEKETNEKIKEI
	NKNELQLMKEQKELGTAYVLDIHSLNDYKISH
	NERNKNVKLQNDIMNGNRDKNALDKINKKLVE
	LKIKMDKITKRNSILRLKYKLQVAYGFLMEEY
	KGNIKKFKDEFDISKEKIKSYKSKGEKYLEVK
	SEKKYITKILNSIEDIHNITWLKNQEENNLFK
	FYVLTYILLPFEFRGDFLGFVKKHYYDIKNVE
	FLDENNDRLTPEQLEKMKNDSFFNKIRLFEKN
	SKKYDILKESILTSERIGKYFSLLNTGAKYFE
	YGGEENRGIFNKNIIIPIFKYYQIVLKLYNDV
	ELAMLLTLSESDEKDINKIKELVTLKEKVSPK
	KIDYEKKYKFSVLLDCFNRIINLGKKDFLASE
	EVKEVAKTFTNLAYLRNKICHLNYSKFIDDLL
	TIDTNKSTTDSEGKLLINDRIRKLIKFIRENN
	QKMNISIDYNYINDYYMKKEKFIFGQRKQAKT
	IIDSGKKANKRNKAEELLKMYRVKKENINLIY
	ELSKKLNELTKSELFLLDKKLLKDIDFTDVKI
	KNKSFFELKNDVKEVANIKQALQKHSSELIGI
	YKKEVIMAIKRSIVSKLIYDEEKVLSIIIYDK
	TNKKYEDFLLEIRRERDINKFQFLIDEKKEKL
	GYEKIIETKEKKKVVVKIQNNSELVSEPRIIK
	NKDKKKAKTPEEISKLGILDLTNHYCFNLKIT
	L
W P	MEKFRRQNRNSIIKIIISNYDTKGIKELKVRY
__ 0	RKQAQLDTFIIKTEIVNNDIFIKSIIEKAREK
6 2	YRYSFLFDGEEKYHFKNKSSVEIVKKDIFSQT
6 2	PDNMIRNYKITLKISEKNPRVVEAEIEDLMNS
4 7	TILKDGRRSARREKSMTERKLIEEKVAKNYSL

40	LANCPMEEVDSIKIYKIKRFLTYRSNMLLYFA SINSFLCEGIKGKDNETEEIWHLKDNDVRKEK VRENFKNKLIQSTENYNSSLKNQIEEKEKLLR KEFKKGAFYRTIIKKLQQERIKELSEKSLTED CEKIIKLYSKLRHSLMHYDYQYFENLFENKKN DDLMKDLNLDLFKSLPLIRKMKLNNKVNYLED GDTLFVLQKTKKAKTLYQIYDALCEQKNGFNK FINDFFVSDGEENTVFKQIINEKFQSEMEFLE KRISESEKKNEKLKKKLDSMKAHFRNINSEDT KEAYFWDIHSSRNYKTKYNERKNLVNEYTELL GSSKEKKLLREEITKINRQLLKLKQEMEEITK KNSLFRLEYKMKIAFGFLFCEFDGNISKFKDE FDASNQEKIIQYHKNGEKYLTSFLKEEEKEKF NLEKMQKIIQKTEEEDWLLPETKNNLFKFYLL TYLLLPYELKGDFLGFVKKHYYDIKNVDFIDE NQNNIQVSQTVEKQEDYFYHKIRLFEKNTKKY EIVKYSIVPNEKLKQYFEDLGIDIKYLTGSVE SGEKWLGENLGIDIKYLTVEQKSEVSEEKNKK VSLKNNGMFNKTILLFVFKYYQIAFKLFNDIE LYSLFFLREKSGKPLEIFRKELESKMKDGYLN FGQLLYVVYEVLVKNKDLDKILSKKIDYRKDK SFSPEIAYLRNFLSHLNYSKFLDNFMKINTNK SDENKEVLIPSIKIQKMIQFIEKCNLQNQIDF DFNFVNDFYMRKEKMFFIQLKQIFPDINSTEK QKMNEKEEILRNRYHLTDKKNEQIKDEHEAQS QLYEKILSLQKIYSSDKNNFYGRLKEEKLLFL EKQGKKKLSMEEIKDKIAGDISDLLGILKKEI TRDIKDKLTEKFRYCEEKLLNLSFYNHQDKKK EESIRVFLIRDKNSDNFKFESILDDGSNKIFI SKNGKEITIQCCDKVLETLIIEKNTLKISSNG KIISLIPHYSYSIDVKY
W P _ 0 9 6 4 0 2 0 5 0	MENKNKPNRGSIVRIIISNYDMKGIKELKVRY RKQAQLDTFILQTTLDKSNNSILINDFRVKAR EKYRYSFTYDGKEKFSVPSNSIIVTKIDNAAP EKSKEIRKYKITLGIDEKCKTGSMITAAIEDL LEDDRVREGIRNPRRKASKTERKLITESICHN YAQITQCPVEEIDAVKIYKVKRFLSYRSNMLL FFALINDFLCKNLKNEKGEKINEIWEMENKGN NKKIDFDENYNILVAQIKEYFTKEIENYNNRI DNIIDKKELLKYSEEKEESEKNKKLEELNKLE SQKLKILTDEEIKADVIKIIKIFSDLRHSLMH YEYKYFENLFENKKNEELAELLNLNLFKNLTL

10 20 30 40

	LRQMKIENKTNYLEGDEKFNILGKDVRAKNAL GHYDLLVEQKNGFNNFINSFFVQDGTENLEFK KFIDENFIKAQKELEEDIKNCKESVKKLEKKL KENPKKSEDLEKKLEKKQKKLKELKKELEKMK QHYKRLNCAYVWDIHSSTVYKKLYNERKNLIE KYNKQLNGLQDKNAITGINAQLLRIKKEMEEI TKSNSLFRLKYKMQIAYAFLEMEYEGNIAKFK NEFDCSKTEKIQEWLEKSEEYLNYCMEKEEDG KNYKFHFKEISEIKDTHNEEWLENTSENNLFK FYILTYLLLPMEFKGDFLGVVKKHYYDIKNVD FTDESEKELSQEQIDKMIGDSFFHKIRLFEKN TKRYEIIKYSILTSDEIKKYFELLELKVPYLE YKGIDEIGIFNKNIILPIFKYYQIIFRLYNDL EIHGLFNVSFDINKILSDLKSYGNENINFREF LYVIKQNNNSSTEEEYQKIWEKLESKYLKEPL LTPEKKEINKKTEKELKKLDGISFLRNKISHL EYEKIIEGVLKTAVNGENKKTSETNADKVFLN EKIKKIINFIKENELDKIELGFNFINDFFMKK EQFMFGQIKQVKEGNSDSITTERKRKEENNKR LKITYGLNYNNLSKIYEFSNTLREIVNSPLFL KDSTLLKKVDLSKVMLKEKPICSLQYENNTKL EDDIKRILLKDSSDIMGIYKAEVVKKLKEKLV LIFKYDEEKKIYVTVYDTSKAVPENISKEILV KRNNSKEEYFFEDNKKKYTTQYYTLEITKENE LKVIPAKKLEGKEFKTEKKEENKLMLNNHYCF NVKIIY

【０３８８】

いくつかの実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの成分は、ＤＮＡ／ＲＮＡまたはＲＮＡ／ＲＮＡ、あるいはタンパク質ＲＮＡのような組み合わせのように、様々な形態で送達され得る。例えば、Ｃａｓ１３タンパク質は、ＤＮＡコードポリヌクレオチドもしくはＲＮＡコードポリヌクレオチドとしてまたはタンパク質として送達され得る。ガイドは、ＤＮＡコードポリヌクレオチドまたはＲＮＡとして送達され得る。送達の混合形態を含む、全ての可能な組み合わせが想定される。

【０３８９】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載の１つ以上のベクター、その１つ以上の転写産物、及び／またはそこから転写される１つ以上のタンパク質のような、１つ以上のポリヌクレオチドを宿主細胞に送達することを含む方法を提供する。

【０３９０】

ベクター

一般に、用語「ベクター」は、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。ベクターは、別のＤＮＡが挿入されたセグメントの複製をもたらすように挿入され得るプラスミド、ファージ、またはコスミドのようなレプリコンである。一般に、ベクターは、適切な制御エレメントと関連する時に複製することができるベクターには、一本鎖、二本鎖、または部分的に二本鎖である核酸分子、１つ以上の遊離末端を含む核酸分子、遊離末端を含まない核酸分子（例えば、環状）、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはその両方を含む核酸分子、及び当該技術分野で既知の他の種類のポリヌクレオチドが含むが、

これらに限定されない。ベクターの１つの型は「プラスミド」であり、追加的ＤＮＡセグメントが標準分子クローニング技術によるように挿入され得る環状二本鎖ＤＮＡループを指す。ベクターの別の型はウイルスベクターであり、ウイルス由来のＤＮＡまたはＲＮＡ配列は、ウイルス（例えば、レトロウイルス、複製欠陥レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠陥アデノウイルス、及びアデノ関連ウイルス）にパッケージングするためのベクターにおいて存在する。ウイルスベクターは、宿主細胞へのトランスフェクションのためのウイルスによって担持されるポリヌクレオチドも含む。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞（例えば、細菌複製起源を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター）において自律複製することができる。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに統合され、それによって宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある特定のベクターは、それらが動作可能に連結された遺伝子の発現を導くことができる。かかるベクターは、本明細書では「発現ベクター」と称される。真核細胞についてのベクター及び真核細胞における発現をもたらすベクターは、本明細書において「真核細胞発現ベクター」と称され得る。組換えＤＮＡ技術における有用性の一般的な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。

【０３９１】

組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適した形態における本発明の核酸を含むことができ、このことは、組換え発現ベクターが、発現される核酸配列に動作可能に連結された、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択され得る１つ以上の調節エレメントを含むことを意味する。組換え発現ベクター内では、「動作可能に連結された」は、目的のヌクレオチド配列がヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で（例えば、インビトロ転写／翻訳システムにおいて、またはベクターが宿主細胞に導入された場合の宿主細胞において）調節エレメントに連結されることを意味するよう意図される。有利なベクターは、レンチウイルス及びアデノ関連ウイルスを含み、かかるベクターの型はまた、特定の種類の細胞を標的化するために選択され得る。

【０３９２】

組換え及びクローニング方法に関して、言及は、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、２００４年９月２日に第ＵＳ２００４－０１７１１５６Ａ１号として公開された米国特許出願第１０／８１５，７３０号についてなされる。

【０３９３】

用語「調節エレメント」は、プロモーター、エンハンサー、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、及び他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル及びポリＵ配列のような転写終結シグナル）を含むことが意図される。かかる制御エレメントが説明されるのは、例えば、Ｇｏｅｄｄｅｌ，ＧＥＮＥ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）である。調節エレメントは、宿主細胞の多くの型におけるヌクレオチド配列の構成的発現を導くものと、ある特定の宿主細胞（例えば、組織特異的調節配列）におけるヌクレオチド配列のみの発現を導くものと、を含む。組織特異的プロモーターは、主に筋肉、ニューロン、骨、皮膚、血液、特定の器官（例えば、肝臓、膵臓）、または特定の細胞型（例えば、リンパ球）のような目的の所望の組織において発現を誘導することができる。調節エレメントはまた、組織または細胞型特異的であり得るか、またはあり得ない、細胞周期依存的または発生段階依存的であるような、時間的に依存する様式で発現を誘導することもできる。いくつかの実施形態では、ベクターは、１つ以上のｐｏｌ ＩＩＩプロモーター（例えば、１、２、３、４、５、またはそれ以上のｐｏｌ ＩＩＩプロモーター）、１つ以上のｐｏｌ ＩＩプロモーター（例えば、１、２、３、４、５、またはそれ以上のｐｏｌ ＩＩプロモーター）、１つ以上のｐｏｌ Ｉプロモーター（例えば、１、２、３、４、５、またはそれ以上のｐｏｌ Ｉプロモーター）、またはこれらの組み合わせを含む。Ｐｏｌ ＩＩＩプロモーターの例は、Ｕ６及びＨ１プロモーターを含むが、これらに限定されない。Ｐｏｌ ＩＩプロモーターの例は、レトロウイルス Ｒｏｕｓ肉腫ウイルス（ＲＳＶ）ＬＴＲプロモータ

ー（任意選択でＲＳＶエンハンサーを伴う）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター（任意選択でＣＭＶエンハンサーを伴う）［例えば、Ｂｏｓｈａｒｔ　ｅｔ　ａｌ，Ｃｅｌｌ，４１：５２１－５３０（１９８５）を参照されたい］、ＳＶ４０プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、βアクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、及びＥＦ１αプロモーターを含むが、これらに限定されない。ＷＰＲＥのようなエンハンサー配列は、用語「調節エレメント」によっても包含される。ＣＭＶエンハンサー、ｔｈｅ　Ｒ－Ｕ５’ｓｅｇｍｅｎｔ　ｉｎ　ＬＴＲ　ｏｆ　ＨＴＬＶ－Ｉ（Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，Ｖｏｌ．８（１），ｐ．４６６－４７２，１９８８）、ＳＶ４０　ｅｎｈａｎｃｅｒ、及びウサギβグロブリンのエクソン２と３との間のイントロン配列（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，Ｖｏｌ．７８（３），ｐ．１５２７－３１，１９８１）。発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望の発現のレベルなどのような因子に依存することができることが当業者によって理解されるであろう。ベクターは、宿主細胞に導入され得、それによって本明細書に記載の核酸によってコードされる融合タンパク質またはペプチドを含む転写産物、タンパク質、またはペプチドを産生することができる（例えば、クラスター化等間隔短鎖回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）転写産物、タンパク質、酵素、それらの変異体、それらの融合タンパク質など）。調節配列に関して、言及は、米国特許出願第１０／４９１，０２６号についてなされ、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。プロモーターに関して、言及は、ＰＣＴ公開ＷＯ　２０１１／０２８９２９及び米国特許出願第１２／５１１，９４０号についてなされ、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。

【０３９４】

有利なベクターはレンチウイルス及びアデノ関連ウイルスを含み、かかるベクターの型は細胞の特定の型を標的化するために選択され得る。

【０３９５】

特定の実施形態では、使用は、ガイドＲＮＡ及び（任意選択で修飾または変異された）アデノシンデアミナーゼに融合したＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質のためのバイシストロン性ベクターについてなされる。アデノシンデアミナーゼに融合したガイドＲＮＡ及び（任意選択で修飾または変異された）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質のビシストロン発現ベクターが好ましい。一般にかつ具体的にこの実施形態では、アデノシンデアミナーゼに融合した（任意選択で修飾または変異された）ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、好ましくはＣＢｈプロモーターによって駆動される。ＲＮＡは、好ましくはＵ６プロモーターのようなＰｏｌ　ＩＩＩプロモーターによって駆動され得る。理想的には両者は組み合わされる。

【０３９６】

ベクターは、原核細胞または真核細胞におけるＣＲＩＳＰＲ転写産物（例えば、核酸転写産物、タンパク質、または酵素）の発現のために設計され得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ転写産物は、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用する）、酵母細胞、または哺乳動物細胞のような細菌細胞において発現され得る。好適な宿主細胞がさらに論じられるのは、ＧｏｅｄｄｅｌのＧＥＮＥ　ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ　ＩＮ　ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ　１８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）である。代替的に、組換え発現ベクターは、例えばＴ７プロモーター調節配列及びＴ７ポリメラーゼを使用して、インビトロで転写及び翻訳され得る。

【０３９７】

ベクターは、原核生物または原核細胞において導入及び増殖され得る。いくつかの実施形態では、原核生物は、真核細胞に導入されるベクターのコピーを増幅するために、または真核細胞に導入されるベクターの産生における中間ベクターとして（例えば、ウイルスベクターパッケージングシステムの一部としてプラスミドを増幅する）使用される。いくつかの実施形態では、原核生物は、宿主細胞または宿主生物に送達するための１つ以上の

タンパク質の供給源を提供するためのような、ベクターのコピーを増幅し１つ以上の核酸を発現するために使用される。原核生物におけるタンパク質の発現は、融合タンパク質または非融合タンパク質いずれかの発現を導く構成的または誘導性プロモーターを含有するベクターを有するＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉにおいて行われることが最も多い。融合ベクターは、組換えタンパク質のアミノ末端のような、その中にコードされるタンパク質にいくつかのアミノ酸を添加する。かかる融合ベクターは、（ｉ）組換えタンパク質の発現を増加させること、（ｉｉ）組換えタンパク質の溶解度を増加させること、（ｉｉｉ）親和性精製におけるリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製を補助すること、のような１つ以上の目的に役立つことができる。しばしば、融合発現ベクターでは、タンパク質分解切断部位が、融合タンパク質の精製後に組換えタンパク質を融合部分から分離することを可能にするために融合部分と組換えタンパク質との接合部に導入される。かかる酵素、及びそれらの同族認識配列は、第Ｘａ因子、トロンビン及びエンテロキナーゼを含む。例示的な融合発現ベクターは、グルタチオンＳトランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトースＥ結合タンパク質、またはタンパク質Ａをそれぞれ標的組換えタンパク質に融合するｐＧＥＸ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ｉｎｃ；Ｓｍｉｔｈ ａｎｄ Ｊｏｈｎｓｏｎ，１９８８．Ｇｅｎｅ ６７：３１－４０）、ｐＭＡＬ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，Ｍａｓｓ．）及びｐＲＩＴ５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）を含む。好適な誘導性非融合Ｅ．ｃｏｌｉ発現ベクターの例は、ｐＴｒｃ（Ａｍｒａｎｎ ｅｔ ａｌ．，（１９８８）Ｇｅｎｅ ６９：３０１－３１５）及びｐＥＴ １１ｄ（Ｓｔｕｄｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＧＥＮＥ ＥＸＰＲＥＳＳＩＯＮ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ：ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ １８５，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９９０）６０－８９）を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは酵母発現ベクターである。Ｅｘａｍｐｌｅｓ ｏｆ ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ｙｅａｓｔ酵母Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｉｖｉｓａｅにおける発現のためのベクターの例は、ｐＹｅｐＳｅｃ１（Ｂａｌｄａｒｉ，ｅｔ ａｌ．，１９８７．ＥＭＢＯＪ．６：２２９－２３４）、ｐＭＦａ（Ｋｕｉｊａｎ ａｎｄ Ｈｅｒｓｋｏｗｉｔｚ，１９８２．Ｃｅｌｌ ３０：９３３－９４３）、ｐＪＲＹ８８（Ｓｃｈｕｌｔｚ ｅｔ ａｌ．，１９８７．Ｇｅｎｅ ５４：１１３－１２３）、ｐＹＥＳ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）、及びｐｉｃＺ（ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、バキュロウイルス発現ベクターを使用する昆虫細胞においてタンパク質発現を駆動する。培養された昆虫細胞（例えば、ＳＦ９細胞）におけるタンパク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターは、ｐＡｃシリーズ（Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ ａｌ．，１９８３．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３：２１５６－２１６５）及びｐＶＬシリーズ（Ｌｕｃｋｌｏｗ ａｎｄ Ｓｕｍｍｅｒｓ，１９８９．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １７０：３１－３９）を含む。

【０３９８】

いくつかの実施形態では、ベクターは、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞における１つ以上の配列の発現を駆動することができる。哺乳動物発現ベクターの例は、ｐＣＤＭ８（Ｓｅｅｄ，１９８７．Ｎａｔｕｒｅ ３２９：８４０）及びｐＭＴ２ＰＣ（Ｋａｕｆｍａｎ，ｅｔ ａｌ．，１９８７．ＥＭＢＯＪ．６：１８７－１９５）を含む。哺乳動物細胞において使用される場合、発現ベクターの制御機能は、典型的には、１つ以上の調節エレメントによって提供される。例えば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス２、サイトメガロウイルス、サルウイルス４０、及び本明細書に開示され、当該技術分野で既知である他のものに由来する。原核細胞及び真核細胞の両方に対する他の好適な発現システムについては、例えば、Ｃｈａｐｔｅｒｓ １６ ａｎｄ １７ ｏｆ Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ．２ｎｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ

Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９を参照されたい。

【０３９９】

いくつかの実施形態では、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型において核酸の発現を優先的に導くことができる（例えば、組織特異的調節エレメントが核酸を発現するために使用される）。組織特異的調節エレメントは、当該技術分野において既知である。好適な組織特異的プロモーターの非限定的な例は、アルブミンプロモーター（肝臓特異的、Ｐｉｎｋｅｒｔ，ｅｔ ａｌ．，１９８７．Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．１：２６８－２７７）、リンパ特異的プロモーター（Ｃａｌａｍｅ ａｎｄ Ｅａｔｏｎ，１９８８．Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：２３５－２７５）、Ｔ細胞受容体の特定のプロモーター（Ｗｉｎｏｔｏ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８９．ＥＭＢＯＪ．８：７２９－７３３）及び免疫グロブリン（Ｂａｎｅｉｊｉ，ｅｔ ａｌ．，１９８３．Ｃｅｌｌ ３３：７２９－７４０、Ｑｕｅｅｎ ａｎｄ Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，１９８３．Ｃｅｌｌ ３３：７４１－７４８）、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター、Ｂｙｒｎｅ ａｎｄ Ｒｕｄｄｌｅ，１９８９．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：５４７３－５４７７）、膵臓特異的プロモーター（Ｅｄｌｕｎｄ，ｅｔ ａｌ．，１９８５．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３０：９１２－９１６）、乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター、米国特許第４，８７３，３１６号及び欧州出願公開第２６４，１６６号）を含む。発生調節プロモーターは、例えば、マウスｈｏｘプロモーター（Ｋｅｓｓｅｌ ａｎｄ Ｇｒｕｓｓ，１９９０．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３７４－３７９）及びαフェトタンパク質プロモーター（Ｃａｍｐｅｓ ａｎｄ Ｔｉｌｇｈｍａｎ，１９８９．Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．３：５３７－５４６）も包含される。これらの原核生物及び真核生物ベクターに関して、言及は、米国特許第６，７５０，０５９号についてなされ、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。本発明の他の実施形態は、言及が米国特許出願１３／０９２，０８５についてなされるウイルスベクターの使用に関することができ、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。組織特異的調節エレメントは当該技術分野において既知であり、この点において、言及は米国特許第７，７７６，３２１号についてなされ、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。いくつかの実施形態では、調節エレメントは、ＣＲＩＳＰＲシステムの１つ以上のエレメントの発現を駆動するようにＣＲＩＳＰＲシステムの１つ以上のエレメントに動作可能に連結される。

【０４００】

いくつかの実施形態では、核酸標的化システムの１つ以上のエレメントの発現を駆動する１つ以上のベクターは、核酸標的化システムのエレメントの発現が１つ以上の標的部位での核酸標的化複合体の形成を導くように宿主細胞に導入される。例えば、核酸標的化エフェクター酵素及び核酸標的化ガイドＲＮＡは、各々、別個のベクター上の別個の調節エレメントに動作可能に連結され得る。核酸標的化システムのＲＮＡ（複数可）は、トランスジェニック核酸標的化エフェクタータンパク質動物もしくは哺乳動物、例えば、構成的もしくは誘導的もしくは条件付きで核酸標的化エフェクタータンパク質を発現する動物もしくは哺乳動物、またはそれ以外の方法で核酸標的化エフェクタータンパク質を発現している、または核酸標的化エフェクタータンパク質を含有する細胞を有する動物もしくは哺乳動物に、インビボ核酸標的化エフェクタータンパク質をコードし発現するベクターの事前投与によるように送達され得る。代替的に、同じまたは異なる調節エレメントから発現された２つ以上のエレメントは、第１のベクターに含まれない核酸標的化システムの任意の成分を提供する１つ以上の追加的なベクターを有する単一のベクターに組み合わされ得る。単一のベクターに組み合わされる核酸標的化システムは、第２のエレメントに関して５’（その「上流」）または３’（その「下流」）に位置する１つのエレメントのような、任意の好適な配向に配置され得る。１つのエレメントのコード配列は、第２のエレメントのコード配列の同じまたは反対の鎖上に位置され、同じまたは反対の方向に配向され得る。いくつかの実施形態では、単一のプロモーターは、核酸標的化エフェクタータンパク

質及び核酸標的化ガイドＲＮＡをコードする転写産物の発現を駆動し、１つ以上のイントロン配列内に埋め込まれる（例えば、各々が異なるイントロン内、２つ以上が少なくとも１つのイントロン内、または全てが単一のイントロン内）。いくつかの実施形態では、核酸標的化エフェクタータンパク質及び核酸標的化ガイドＲＮＡは、同じプロモーターに動作可能に連結され、かつ同じプロモーターから発現され得る。核酸標的化システムの１つ以上のエレメントの発現のための送達ビヒクル、ベクター、粒子、ナノ粒子、製剤、及びこれらの成分は、ＷＯ２０１４／０９３６２２（ＰＣＴ／ＵＳ２０１３／０７４６６７）のような前述の文献において使用される通りである。いくつかの実施形態では、ベクターは、制限エンドヌクレアーゼ認識配列（「クローニング部位」とも称される）のような１つ以上の挿入部位を含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の挿入部位（例えば、約または約１超、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上の挿入部位）は、１つ以上のベクターの１つ以上の配列エレメントの上流及び／または下流に位置する。複数の異なるガイド配列が使用される場合、単一の発現構築物は、細胞内の複数の異なる対応する標的配列に核酸標的化活性を標的化するために使用され得る。例えば、単一のベクターは、約または約１超、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、またはそれ以上のガイド配列を含むことができる。いくつかの実施形態では、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれ以上のかかるガイド配列含有ベクターは、細胞に提供、及び任意選択で送達され得る。いくつかの実施形態では、ベクターは、核酸標的化エフェクタータンパク質をコードする酵素コード配列に動作可能に連結された調節エレメントを含む。核酸標的化エフェクタータンパク質または核酸標的化ガイドＲＮＡまたはＲＮＡ（複数可）は別個に送達され得、有利にはこれらのうちの少なくとも１つは粒子複合体を介して送達される。核酸標的化エフェクタータンパク質ｍＲＮＡは、核酸標的化エフェクタータンパク質が発現される時間を与えるために、核酸標的化ガイドＲＮＡの前に送達され得る。核酸標的化エフェクタータンパク質ｍＲＮＡは、核酸標的化ガイドＲＮＡの投与前１～１２時間（好ましくは２～６時間ごろ）に投与され得る。代替的に、核酸標的化エフェクタータンパク質ｍＲＮＡ及び核酸標的化ガイドＲＮＡは、一緒に投与され得る。有利には、ガイドＲＮＡの第２のブースター用量は、核酸標的化エフェクタータンパク質ｍＲＮＡ＋ガイドＲＮＡの初回投与後１～１２時間（好ましくはおよそ２～６時間ごろ）に投与され得る。核酸標的化エフェクタータンパク質ｍＲＮＡ及び／またはガイドＲＮＡの追加的投与は、最も効率的なレベルのゲノム修飾を達成するのに有用であり得る。

【０４０１】

従来のウイルスベース及び非ウイルスベースの遺伝子導入方法は、哺乳動物細胞または標的組織に核酸を導入するために使用され得る。かかる方法は、核酸標的化システムの成分をコードする核酸を培養物または宿主生物中の細胞に投与するために使用され得る。非ウイルスベクター送達システムは、ＤＮＡプラスミド、ＲＮＡ（例えば、本明細書に記載のベクターの転写産物）、裸の核酸、及びリポソームのような送達ビヒクルと組み合わされた核酸を含む。ウイルスベクター送達システムは、細胞への送達後にエピソームまたは統合ゲノムのいずれかを有するＤＮＡ及びＲＮＡウイルスを含む。遺伝子療法手順のレビューについては、Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５６：８０８－８１３（１９９２）、Ｎａｂｅｌ＆Ｆｅｌｇｎｅｒ，ＴＩＢＴＥＣＨ １１：２１１－２１７（１９９３）、Ｍｉｔａｎｉ＆Ｃａｓｋｅｙ，ＴＩＢＴＥＣＨ １１：１６２－１６６（１９９３）、Ｄｉｌｌｏｎ，ＴＩＢＴＥＣＨ １１：１６７－１７５（１９９３）、Ｍｉｌｌｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ ３５７：４５５－４６０（１９９２）、Ｖａｎ Ｂｒｕｎｔ，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６（１０）：１１４９－１１５４（１９８８）、Ｖｉｇｎｅ，Ｒｅｓｔｏｒａｔｉｖｅ Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ ８：３５－３６（１９９５）、Ｋｒｅｍｅｒ＆Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔ，Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｂｕｌｌｅｔｉｎ ５１（１）：３１－４４（１９９５）、Ｈａｄｄａｄａ ｅｔ ａｌ．，ｉｎ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｄｏｅｒｆｌｅｒ ａｎｄ Ｂｏｈｍ（ｅｄｓ）（１９９５）、及びＹｕ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ １：１３－２６（１９

９４）を参照されたい。

【０４０２】

核酸の非ウイルス送達の方法は、リポフェクション、ヌクレオフェクション（ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｉｏｎ）、マイクロインジェクション、バイオリスティック、ビロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、裸のＤＮＡ、人工ビリオン、及びＤＮＡの薬剤増強取り込みを含む。リポフェクションは、例えば、米国特許第５，０４９，３８６号、第４，９４６，７８７号、及び第４，８９７，３５５号に記載され、リポフェクション試薬は市販されている（例えば、Ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍ（商標）及びＬｉｐｏｆｅｃｔｉｎ（商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに適したカチオン性及び中性脂質は、Ｆｅｌｇｎｅｒのそれら、ＷＯ　９１／１７４２４、ＷＯ　９１／１６０２４を含む。送達は、細胞（例えば、インビトロもしくはエクスビボ投与）または標的組織（例えば、インビボ投与）に対するものであり得る。

【０４０３】

プラスミド送達は、プラスミドを発現するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質へのガイドＲＮＡのクローニング及び細胞培養におけるＤＮＡのトランスフェクトを伴う。プラスミド骨格は市販されており、特定の機器は必要とされない。それらは、モジュール式であり、選択マーカーと同様に異なるサイズのＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓコード配列（より大きなサイズのタンパク質をコードするものを含む）を担持することができるという利点を有する。いずれもプラスミドの利点は、プラスミドが一過性でありながら持続的な発現を確実にすることができることである。しかしながら、インビボ効率がしばしば低いように、プラスミドの送達は簡単ではない。持続的な発現は、オフターゲット編集を増加することができるという点でも不利であり得る。加えて、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の過剰な蓄積は、細胞に対する毒性であり得る。最後に、プラスミドは、宿主ゲノムにおけるｄｓＤＮＡのランダム統合のリスクを常に保持しており、より具体的には、（オン及びオフターゲットの）二本鎖切断が生成されていることを考慮している。

【０４０４】

免疫脂質（ｉｍｍｕｎｏｌｉｐｉｄ）のような標的化されたリポソームを含む脂質：核酸複合体の調製は、当業者に周知である（例えば、Ｃｒｙｓｔａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４０４－４１０（１９９５）、Ｂｌａｅｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２：２９１－２９７（１９９５）、Ｂｅｈｒ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅＣｈｅｍ．５：３８２－３８９（１９９４）、Ｒｅｍｙ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅＣｈｅｍ．５：６４７－６５４（１９９４）、Ｇａｏ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ２：７１０－７２２（１９９５）、Ａｈｍａｄ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５２：４８１７－４８２０（１９９２）、米国特許第４，１８６，１８３号、第４，２１７，３４４号、第４，２３５，８７１号、第４，２６１，９７５号、第４，４８５，０５４号、第４，５０１，７２８号、第４，７７４，０８５号、第４，８３７，０２８号、及び第４，９４６，７８７号）。このことは以下でより詳細に論じられる。

【０４０５】

核酸の送達のためのＲＮＡまたはＤＮＡウイルスベースのシステムの使用は、体内の特定の細胞にウイルスを標的化し、ウイルスのペイロードを核に輸送するための高度に進化したプロセスを利用する。ウイルスベクターは患者に直接投与され得る（インビボ）か、またはそれらはインビトロで細胞を処理するために使用され得、修飾された細胞は任意選択で患者に投与され得る（エクスビボ）。従来のウイルスベースのシステムは、遺伝子導入のためのレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ関連及び単純ヘルペスウイルスベクターを含むことができる。宿主ゲノムにおける統合は、レトロウイルス、レンチウイルス、及びアデノ関連ウイルス遺伝子導入方法で可能であり、しばしば挿入された導入遺伝子の長期的発現をもたらす。追加的に、高い形質導入効率は、多くの異なる細胞型及び標的組織において観察されている。

【０４０６】
レトロウイルスの指向性は、外来のエンベロープタンパク質を組み込み、標的細胞の潜在的な標的集団を拡大することによって改変され得る。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞を形質導入または感染させ、典型的には高ウイルス力価を生成することができるレトロウイルスベクターである。したがって、レトロウイルス遺伝子導入システムの選択は、標的組織に依存する。レトロウイルスベクターは、最大６～１０ｋｂの外来配列のパッケージング容量を有するシス作用長い末端反復からなる。最小のシス作用ＬＴＲは、ベクターの複製及びパッケージングに十分であり、次いで、治療遺伝子を標的細胞に統合し、永続的な導入遺伝子発現を提供するために使用される。幅広く使用されるレトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス（ＭｕＬＶ）、テナガザル白血病ウイルス（ＧａＬＶ）、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、及びこれらの組み合わせに基づくものを含む（例えば、Ｂｕｃｈｓｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：２７３１－２７３９（１９９２）、Ｊｏｈａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：１６３５－１６４０（１９９２）、Ｓｏｍｍｎｅｒｆｅｌｔ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌ．１７６：５８－５９（１９９０）、Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：２３７４－２３７８（１９８９）、Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６５：２２２０－２２２４（１９９１）、ＰＣＴ／ＵＳ９４／０５７００）。

【０４０７】
一過性発現が好ましい用途では、アデノウイルスベースのシステムが使用され得る。アデノウイルスベースのベクターは、多くの細胞型における非常に高い形質導入効率の能力があり、細胞分裂を必要としない。かかるベクターで、高い力価及び発現のレベルが得られている。このベクターは、比較的単純なシステムにおいて大量に生成され得る。アデノ関連ウイルス（「ＡＡＶ」）ベクターは、標的核酸を有する細胞を形質導入するために、例えば、核酸及びペプチドのインビトロ産生において、ならびにインビボ及びエクスビボ遺伝子療法手順のためにも使用され得る（例えば、Ｗｅｓｔ ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １６０：３８－４７（１９８７）、米国特許第４，７９７，３６８号、ＷＯ９３／２４６４１、Ｋｏｔｉｎ，Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ ５：７９３－８０１（１９９４）、Ｍｕｚｙｃｚｋａ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９４：１３５１（１９９４）を参照されたい。組換えＡＡＶベクターの構築は、米国特許第５，１７３，４１４号、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：３２５１－３２６０（１９８５）、Ｔｒａｔｓｃｈｉｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．４：２０７２－２０８１（１９８４）、Ｈｅｒｍｏｎａｔ＆Ｍｕｚｙｃｚｋａ，ＰＮＡＳ ８１：６４６６－６４７０（１９８４）、及びＳａｍｕｌｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：０３８２２－３８２８（１９８９）を含むいくつもの刊行物において説明される。

【０４０８】
本発明は、ＣＲＩＳＰＲシステムをコードする外因性核酸分子を含有するか、または本質的にそれからなるＡＡＶを提供し、例えば、プロモーター、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質（推定ヌクレアーゼまたはヘリカーゼタンパク質）をコードする核酸分子を含むか本質的にそれらからなる第１のカセットを含むか、それからなる複数のカセット、例えば、Ｃａｓ１３及びターミネーター、ならびに１つ以上の、有利にはベクターの最大パッケージングサイズ限界、例えば、プロモーター、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をコードする核酸分子及びターミネーターを含むか本質的にそれらからなる合計（第１のカセットを含む）５つのカセット（例えば、各カセットはプロモーター－ｇＲＮＡ１－ターミネーター、プロモーター－ｇＲＮＡ２－ターミネーター…プロモーター－ｇＲＮＡ（Ｎ）－ターミネーターとして模式的に表され、Ｎは挿入され得ベクターのパッケージングサイズ限界の上限値である数字である）、または２つ以上の個別のｒＡＡＶであり、各々がＣＲＩＳＰＲシステムの１つ以上のカセットを含有する、例えば、第１のｒＡＡＶはプロモーター、Ｃａｓ、例えばＣａｓ（Ｃａｓ１３）をコードする核酸分子、及びターミネーターを

含むか、本質的にそれらからなり、第２のｒＡＡＶはプロモーター、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をコードする核酸分子及びターミネーターを含むか、本質的にそれらからなる（例えば、各カセットはプロモーター－ｇＲＮＡ１－ターミネーター、プロモーター－ｇＲＮＡ２－ターミネーター…プロモーター－ｇＲＮＡ（Ｎ）－ターミネーターとして模式的に表され、Ｎは挿入され得ベクターのパッケージングサイズ限界の上限値である数字である）。代替的に、Ｃａｓ１３は、独自のｃｒＲＮＡ／ｇＲＮＡを処理することができるため、単一のｃｒＲＮＡ／ｇＲＮＡアレイは多重遺伝子編集のために使用され得る。したがって、ｇＲＮＡを送達するために複数のカセットを含む代わりに、ｒＡＡＶは、プロモーター、複数のｃｒＲＮＡ／ｇＲＮＡ、及びターミネーター（例えば、プロモーター－ｇＲＮＡ１－ｇＲＮＡ２…ｇＲＮＡ（Ｎ）ターミネーターとして模式的に表され、Ｎは挿入され得ベクターのパッケージングサイズ限界の上限にある数である）を含むか、または本質的にそれらからなる単一のカセットを含有することができる。参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＺｅｔｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３５，３１－３４（２０１７）を参照されたい。ｒＡＡＶがＤＮＡウイルスであるため、核酸分子は、ＡＡＶまたはｒＡＡＶに関する本明細書の考察において有利にはＤＮＡである。プロモーターは、いくつかの実施形態では、有利にはヒトシナプシンＩプロモーター（ｈＳｙｎ）である。細胞への核酸の送達のための追加的な方法は、当業者に既知である。例えば、本明細書に参照により組み込まれるＵＳ２００３００８７８１７を参照されたい。

【０４０９】

別の実施形態では、Ｃｏｃａｌベシクロウイルスエンベロープ偽型レトロウイルスベクター粒子が企図される（例えば、Ｆｒｅｄ Ｈｕｔｃｈｉｎｓｏｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｅｎｔｅｒに譲渡された米国特許公開第２０１２０１６４１１８号を参照されたい）。Ｃｏｃａｌウイルスは、Ｖｅｓｉｃｕｌｏｖｉｒｕｓ属にあり、哺乳動物における水疱性口内炎の原因物質である。Ｃｏｃａｌウイルスはトリニダードにおいてダニから最初に単離され（Ｊｏｎｋｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｖｅｔ．Ｒｅｓ．２５：２３６－２４２（１９６４））、感染はトリニダード、ブラジル、及びアルゼンチンにおいて昆虫、ウシ、ウマから特定されている。哺乳動物に感染するベシクロウイルスの多くは、天然に感染した関節動物から単離されており、それらが宿主媒介性であることを示唆している。ベシクロウイルスに対する抗体は、ウイルスが風土性であり、臨床検査によって得られる農村部に住む人々に一般的であり、ヒトにおける感染は、通常、インフルエンザ様の症状をもたらす。Ｃｏｃａｌウイルスエンベロープ糖タンパク質はＶＳＶ－Ｇ Ｉｎｄｉａｎａとアミノ酸レベルで７１．５％同一性を共有し、ベシクロウイルスのエンベロープ遺伝子の系統学的比較は、Ｃｏｃａｌウイルスが、ベシクロウイルスの間でＶＳＶ－Ｇ Ｉｎｄｉａｎａ株と血清学的に異なるが、最も密接に関連することを示す。Ｊｏｎｋｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｖｅｔ．Ｒｅｓ．２５：２３６－２４２（１９６４）及びＴｒａｖａｓｓｏｓ ｄａ Ｒｏｓａ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｔｒｏｐｉｃａｌ Ｍｅｄ．＆Ｈｙｇｉｅｎｅ ３３：９９９－１００６（１９８４）。Ｃｏｃａｌベシクロウイルスエンベロープ偽型レトロウイルスベクター粒子は、例えば、レトロウイルスＧａｇ、Ｐｏｌ、及び／または１つ以上の付属タンパク質（複数可）及びＣｏｃａｌベシクロウイルスエンベロープタンパク質を含むことができる、レンチウイルス、アルファレトロウイルス、ベータレトロウイルス、ガンマレトロウイルス、デルタレトロウイルス、及びエプシロンレトロウイルスベクター粒子を含むことができる。これらの実施形態のある特定の態様内では、Ｇａｇ、Ｐｏｌ、及び付属タンパク質はレンチウイルス及び／またはガンマレトロウイルスである。

【０４１０】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、本明細書に記載の１つ以上のベクターで一時的または非一時的にトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、細胞は、任意選択でその中に再導入される対象においてそれが天然に生じるようにトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、トランスフェクトされる細胞は、対象から採取される。いく

つかの実施形態では、細胞は、細胞株のような対象から採取される細胞に由来する。組織培養のための多種多様な細胞株が当該技術分野で既知である。細胞株の例は、Ｃ８１６１、ＣＣＲＦ－ＣＥＭ、ＭＯＬＴ、ｍＩＭＣＤ－３、ＮＨＤＦ、ＨｅＬａ－Ｓ３、Ｈｕｈ１、Ｈｕｈ４、Ｈｕｈ７、ＨＵＶＥＣ、ＨＡＳＭＣ、ＨＥＫｎ、ＨＥＫａ、ＭｉａＰａＣｅｌｌ、Ｐａｎｃ１、ＰＣ－３、ＴＦ１、ＣＴＬＬ－２、Ｃ１Ｒ、Ｒａｔ６、ＣＶ１、ＲＰＴＥ、Ａ１０、Ｔ２４、Ｊ８２、Ａ３７５、ＡＲＨ－７７、Ｃａｌｕ１、ＳＷ４８０、ＳＷ６２０、ＳＫＯＶ３、ＳＫ－ＵＴ、ＣａＣｏ２、Ｐ３８８Ｄ１、ＳＥＭ－Ｋ２、ＷＥＨＩ－２３１、ＨＢ５６、ＴＩＢ５５、Ｊｕｒｋａｔ、Ｊ４５．０１、ＬＲＭＢ、Ｂｃｌ－１、ＢＣ－３、ＩＣ２１、ＤＬＤ２、Ｒａｗ２６４．７、ＮＲＫ、ＮＲＫ－５２Ｅ、ＭＲＣ５、ＭＥＦ、Ｈｅｐ　Ｇ２、ＨｅＬａ　Ｂ、ＨｅＬａ　Ｔ４、ＣＯＳ、ＣＯＳ－１、ＣＯＳ－６、ＣＯＳ－Ｍ６Ａ、ＢＳ－Ｃ－１サル腎臓上皮系、ＢＡＬＢ／３Ｔ３マウス胚繊維芽細胞、３Ｔ３　Ｓｗｉｓｓ、３Ｔ３－Ｌ１、１３２－ｄ５ヒト胎児繊維芽細胞、１０．１マウス繊維芽細胞２９３－Ｔ、３Ｔ３、７２１、９Ｌ、Ａ２７８０、Ａ２７８０ＡＤＲ、Ａ２７８０ｃｉｓ、Ａ１７２、Ａ２０、Ａ２５３、Ａ４３１、Ａ－５４９、ＡＬＣ、Ｂ１６、Ｂ３５、ＢＣＰ－１　ｃｅｌｌｓ、ＢＥＡＳ－２Ｂ、ｂＥｎｄ．３、ＢＨＫ－２１、ＢＲ　２９３、ＢｘＰＣ３、Ｃ３Ｈ－１０Ｔ１／２、Ｃ６／３６、Ｃａｌ－２７、ＣＨＯ、ＣＨＯ－７、ＣＨＯ－ＩＲ、ＣＨＯ－Ｋ１、ＣＨＯ－Ｋ２、ＣＨＯ－Ｔ、ＣＨＯ　Ｄｈｆｒ　－／－、ＣＯＲ－Ｌ２３、ＣＯＲ－Ｌ２３／ＣＰＲ、ＣＯＲ－Ｌ２３／５０１０、ＣＯＲ－Ｌ２３／Ｒ２３、ＣＯＳ－７、ＣＯＶ－４３４、ＣＭＬ　Ｔ１、ＣＭＴ、ＣＴ２６、Ｄ１７、ＤＨ８２、ＤＵ１４５、ＤｕＣａＰ、ＥＬ４、ＥＭ２、ＥＭ３、ＥＭＴ６／ＡＲ１、ＥＭＴ６／ＡＲ１０．０、ＦＭ３、Ｈ１２９９、Ｈ６９、ＨＢ５４、ＨＢ５５、ＨＣＡ２、ＨＥＫ－２９３、ＨｅＬａ、Ｈｅｐａ１ｃ１ｃ７、ＨＬ－６０、ＨＭＥＣ、ＨＴ－２９、Ｊｕｒｋａｔ、ＪＹ細胞、Ｋ５６２細胞、Ｋｕ８１２、ＫＣＬ２２、ＫＧ１、ＫＹＯ１、ＬＮＣａｐ、Ｍａ－Ｍｅｌ　１－４８、ＭＣ－３８、ＭＣＦ－７、ＭＣＦ－１０Ａ、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８、ＭＤＡ－ＭＢ－４３５、ＭＤＣＫ　ＩＩ、ＭＤＣＫ　ＩＩ、ＭＯＲ／０．２Ｒ、ＭＯＮＯ－ＭＡＣ　６、ＭＴＤ－１Ａ、ＭｙＥｎｄ、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＣＰＲ、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ１０、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ２０、ＮＣＩ－Ｈ６９／ＬＸ４、ＮＩＨ－３Ｔ３、ＮＡＬＭ－１、ＮＷ－１４５、ＯＰＣＮ／ＯＰＣＴ細胞株、Ｐｅｅｒ、ＰＮＴ－１Ａ／ＰＮＴ　２、ＲｅｎＣａ、ＲＩＮ－５Ｆ、ＲＭＡ／ＲＭＡＳ、Ｓａｏｓ－２細胞、Ｓｆ－９、ＳｋＢｒ３、Ｔ２、Ｔ－４７Ｄ、Ｔ８４、ＴＨＰ１細胞株、Ｕ３７３、Ｕ８７、Ｕ９３７、ＶＣａＰ、Ｖｅｒｏ細胞、ＷＭ３９、ＷＴ－４９、Ｘ６３、ＹＡＣ－１、ＹＡＲ、及びそのトランスジェニック変種を含むがこれらに限定されない。細胞株は、当該技術分野で既知の様々なソースから利用可能である（例えば、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）（Ｍａｎａｓｓｕｓ，Ｖａ．）を参照されたい）。

【０４１１】

特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの成分のうちの１つ以上の一過性発現及び／または存在は、オフターゲット効果を低減するためのように、興味深い。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の１つ以上のベクターでトランスフェクトされた細胞は、１つ以上のベクター由来配列を含む新しい細胞株を確立するために使用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの成分で一時的にトランスフェクトされ（１つ以上のベクターの一時的トランスフェクション、またはＲＮＡによるトランスフェクションによるような）、ＣＲＩＳＰＲ複合体の活性を通じて修飾された細胞は、修飾を含有するが任意の他の外因性配列を欠く細胞を含む新しい細胞株を確立するために使用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の１つ以上のベクターで一時的または非一時的にトランスフェクトされた細胞、またはかかる細胞に由来する細胞株は、１つ以上の試験化合物を評価する際に使用される。

【０４１２】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ及び／またはタンパク質を宿主細胞に直接導入することが想定される。例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、インビトロ転写ガイドＲ

ＮＡと共にｍＲＮＡをコードするものとして送達され得る。かかる方法は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の効果を確実にするための時間を低減することができ、さらに、ＣＲＩＳＰＲシステム成分の長期的発現を防止することができる。

【０４１３】

いくつかの実施形態では、本発明のＲＮＡ分子は、リポソームまたはリポフェクチン製剤などで送達され、当業者に周知の方法によって調製され得る。かかる方法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第５，５９３，９７２号、第５，５８９，４６６号、及び第５，５８０，８５９号において説明される。ｓｉＲＮＡの哺乳動物細胞への増強かつ向上された送達を特異的に目的とした送達システムが、開発されており、（例えば、Ｓｈｅｎ ｅｔ ａｌ ＦＥＢＳ Ｌｅｔ．２００３，５３９：１１１－１１４、Ｘｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２００２，２０：１００６－１０１０、Ｒｅｉｃｈ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｖｉｓｉｏｎ．２００３，９：２１０－２１６、Ｓｏｒｅｎｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２００３，３２７：７６１－７６６、Ｌｅｗｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｇｅｎ．２００２，３２：１０７－１０８及びＳｉｍｅｏｎｉ ｅｔ ａｌ．，ＮＡＲ ２００３，３１，１１：２７１７－２７２４を参照されたい）本発明に適用され得る。ｓｉＲＮＡは、最近霊長類における遺伝子発現の阻害について使用され成功している（例えば、本発明にも適用され得るＴｏｌｅｎｔｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｔｉｎａ ２４（４）：６６０を参照されたい）。

【０４１４】

確かに、ＲＮＡ送達は、インビボ送達における有用な方法である。Ｃａｓ１３、アデノシンデアミナーゼ、及びガイドＲＮＡをリポソームまたはナノ粒子を使用して細胞に送達することは可能である。したがって、Ｃａｓ１３のようなＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の送達、（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアダプタータンパク質に融合され得る）アデノシンデアミナーゼの送達、及び／または本発明のＲＮＡの送達は、マイクロベシクル、リポソーム、または粒子（ｐａｒｔｉｃｌｅ）もしくは粒子（ｐａｒｔｉｃｌｅｓ）を介するＲＮＡ形態であり得る。例えば、Ｃａｓ１３ ｍＲＮＡ、アデノシンデアミナーゼｍＲＮＡ、及びガイドＲＮＡは、インビボにおける送達のためにリポソーム粒子にパッケージされ得る。Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓからのリポフェクタミンのようなリポソームトランスフェクション試薬及び市場での他の試薬は、ＲＮＡ分子を効果的に肝臓に送達することができる。

【０４１５】

また好まれたＲＮＡの送達の手段は、粒子（Ｃｈｏ，Ｓ．，Ｇｏｌｄｂｅｒｇ，Ｍ．，Ｓｏｎ，Ｓ．，Ｘｕ，Ｑ．，Ｙａｎｇ，Ｆ．，Ｍｅｉ，Ｙ．，Ｂｏｇａｔｙｒｅｖ，Ｓ．，Ｌａｎｇｅｒ，Ｒ．ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｄ．，Ｌｉｐｉｄ－ｌｉｋｅ ｎａｎｏ ｐａｒｔｉｃｌｅｓ ｆｏｒ ｓｍａｌｌ ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ ＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｔｏ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌｓ，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ，１９：３１１２－３１１８，２０１０）またはエクソソーム（Ｓｃｈｒｏｅｄｅｒ，Ａ．，Ｌｅｖｉｎｓ，Ｃ．，Ｃｏｒｔｅｚ，Ｃ．，Ｌａｎｇｅｒ，Ｒ．，ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｄ．，Ｌｉｐｉｄ－ｂａｓｅｄ ｎａｎｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ｆｏｒ ｓｉＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｎａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２６７：９－２１，２０１０，ＰＭＩＤ：２００５９６４１）を含む。確かに、エクソソームは、ＣＲＩＳＰＲシステムにいくつかの類似性を有するシステムである送達ｓｉＲＮＡにおいて特に有用であることが示されている。例えば、Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ Ｓ，ｅｔ ａｌ．（“Ｅｘｏｓｏｍｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｓｉＲＮＡ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ａｎｄ ｉｎ ｖｉｖｏ．”Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１２ Ｄｅｃ；７（１２）：２１１２－２６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｐｒｏｔ．２０１２．１３１．Ｅｐｕｂ ２０１２ Ｎｏｖ １５．）は、どれほどエクソソームが異なる生物学的障害を越える薬物送達のための見込みのあるツールであるか、そしてインビトロ及びインビボでのｓｉＲＮＡの送達のため役立つことができるか説明する。これらのアプローチは、ペプチドリガンドと融合した

エクソソームタンパク質を含む発現ベクターのトランスフェクションを通じて標的化されたエクソソームを生成することである。次いで、エクソソームはトランスフェクトされた細胞上清から精製及び特徴付けられ、次いで、Ｒｎａはエクソソームに負荷される。本発明による送達または投与は、特に脳に限定されないが、エクソソームで実行され得る。ビタミンＥ（α－トコフェロール）は、例えば、短い干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）を脳に送達するためのＵｎｏ　ｅｔ　ａｌ．（ＨＵＭＡＮ　ＧＥＮＥ　ＴＨＥＲＡＰＹ　２２：７１１－７１９（Ｊｕｎｅ　２０１１））によって行われたのと同様の方法で、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓでコンジュゲートされ、高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）に沿って脳に送達され得る。マウスを、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）または遊離ＴｏｃｓｉＢＡＣＥもしくはＴｏｃ－ｓｉＢＡＣＥ／ＨＤＬで充填され、Ｂｒａｉｎ　Ｉｎｆｕｓｉｏｎ　Ｋｉｔ　３（Ａｌｚｅｔ）と接続されたＯｓｍｏｔｉｃミニポンプ（モデル１００７Ｄ；Ａｌｚｅｔ，Ｃｕｐｅｒｔｉｎｏ，ＣＡ）を介して注入した。脳注入カニューレを、背側第３脳室への注入のために、正中線でブレグマの約０．５ｍｍ後方に配置した。Ｕｎｏ　ｅｔ　ａｌ．は、ＨＤＬを有するＴｏｃ－ｓｉＲＮＡのわずか３ｎｍｏｌが、同じＩＣＶ注入法によるのと同程度の標的低減を誘導することができることを発見した。α－トコフェロールにコンジュゲートされ、脳を標的化するＨＤＬと共投与される同様の用量のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓが、本発明においてヒトに対して企図され得、例えば、脳を標的とする約３ｎｍｏｌ～約３μｍｏｌのＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓが企図され得る。Ｚｏｕ　ｅｔ　ａｌ．（（ＨＵＭＡＮ　ＧＥＮＥ　ＴＨＥＲＡＰＹ　２２：４６５－４７５（Ａｐｒｉｌ　２０１１））は、ラットの脊髄におけるインビボ遺伝子サイレンシングのためのＰＫＣγを標的化する短いヘアピンＲＮＡのレンチウイルス媒介送達の方法を説明する。Ｚｏｕ　ｅｔ　ａｌ．は、くも膜下腔カテーテルによって１×１０９形質導入単位（ＴＵ）／ｍｌの力価を有する約１０μｌの組換えレンチウイルスを投与した。本発明において、脳を標的化するレンチウイルスベクターにおいて発現されるＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの同様の用量は、ヒトに対して企図され得、例えば、1×10^{9}の形質導入単位（ＴＵ）／ｍｌの力価を有するレンチウイルスにおいて脳を標的とする約１０～５０ｍｌのＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓが企図され得る。

【０４１６】

ベクターの投薬

いくつかの実施形態では、ベクター、例えば、プラスミドまたはウイルスベクターは、例えば筋肉内注射によって目的の組織に送達されるが、他の時間では、送達は、静脈内、経皮、鼻腔内、経口、粘膜、または他の送達方法を介する。かかる送達は、単回用量、または複数回用量のいずれかを介すことができる。当業者は、本明細書で送達される実際の投薬が、ベクター選択、標的細胞、生物、または組織、治療される対象の一般的な状態、求められる形質転換／修飾の程度、投与経路、投与モード、求められる形質転換／修飾の型などのような様々な因子に応じて大きく変化し得ることを理解する。

【０４１７】

かかる投薬は、例えば、担体（水、生理食塩水、エタノール、グリセロール、ラクトース、ショ糖、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、ピーナッツ油、ゴマ油など）、希釈剤、薬学的に許容可能な担体（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、薬学的に許容可能な賦形剤、及び／または当業者に既知の他の化合物をさらに含有することができる。投薬は、例えば、塩酸塩、集荷水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などのような無機酸塩、及び酢酸塩、プロピオン酸塩、安息香酸塩などのような１つ以上の薬学的に許容可能な塩をさらに含有することができる。追加的に、湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝物質、ゲルまたはゲル化剤、香料、着色剤、微粒子、ポリマー、懸濁剤などのような補助剤は、本明細書にも存在し得る。加えて、保存料、保湿剤、懸濁剤、界面活性剤、抗酸化剤、固結防止剤、充填剤、キレート剤、コーティング剤、化学安定剤などのような、１つ以上の従来の薬学的成分はまた、特に剤形が再構成可能な形態である場合、存在し得る。好適な例示的な成分は、微結晶性セルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリソルベート８０、フェニルエチルアルコール、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム

、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルバニリン、グリセリン、フェノール、パラクロロフェノール、ゼラチン、アルブミン、及びこれらの組み合わせを含む。薬学的に許容可能な賦形剤の徹底した考察は、参照により本明細書に組み込まれるＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ（Ｍａｃｋ　Ｐｕｂ．Ｃｏ．，Ｎ．Ｊ．１９９１）において利用可能である。

【０４１８】

本明細書の実施形態では、送達は、アデノウイルスベクターの少なくとも１×１０５の粒子（粒子単位、ｐｕとも称される）を含有する単一のブースター用量であり得るアデノウイルスを介する。本明細書の実施形態では、用量は、アデノウイルスベクターの好ましくは少なくとも１ｘ１０６粒子（例えば、約１ｘ１０６～１ｘ１０１２粒子）、より好ましくは少なくとも約１ｘ１０７粒子、より好ましくは少なくとも約１ｘ１０８粒子（例えば、約１ｘ１０８～１ｘ１０１１粒子または約１ｘ１０８～１ｘ１０１２粒子）、及び最も好ましくは少なくとも約１ｘ１００粒子（例えば、約１ｘ１０９～１ｘ１０１０粒子または約１ｘ１０９～１ｘ１０１２粒子）、または少なくとも約１ｘ１０１０粒子（例えば、約１ｘ１０１０～１ｘ１０１２粒子）でもある代替的に、用量は、約１ｘ１０１４以下の粒子、好ましくは約１ｘ１０１３以下の粒子、さらにより好ましくは約１ｘ１０１２以下の粒子、さらにより好ましくは約１ｘ１０１１以下の粒子、及び最も好ましくは約１ｘ１０１０以下の粒子を含む（例えば約１ｘ１０９以下の粒子）。したがって、用量は、例えば、アデノウイルスベクターの約１ｘ１０６粒子単位（ｐｕ），約２ｘ１０６ｐｕ、約４ｘ１０６ｐｕ、約１ｘ１０７ｐｕ、約２ｘ１０７ｐｕ、約４ｘ１０７ｐｕ、約１ｘ１０８ｐｕ、約２ｘ１０８ｐｕ、約４ｘ１０８ｐｕ、約１ｘ１０９ｐｕ、約２ｘ１０９ｐｕ、約４ｘ１０９ｐｕ、約１ｘ１０１０ｐｕ、約２ｘ１０１０ｐｕ、約４ｘ１０１０ｐｕ、約１ｘ１０１１ｐｕ、約２ｘ１０１１ｐｕ、約４ｘ１０１１ｐｕ、約１ｘ１０１２ｐｕ、約２ｘ１０１２ｐｕ、または約４ｘ１０１２ｐｕを有するアデノウイルスベクターの単回用量を含有することができる。例えば、本明細書に参照により組み込まれる、２０１３年６月４日にＮａｂｅｌ，ｅｔ．ａｌ．に対して認可された米国特許第８，４５４，９７２Ｂ２号におけるアデノウイルスベクター、及びその２９段、３６～５８行での投薬を参照されたい。本明細書の実施形態では、アデノウイルスは、複数の用量を介して送達される。

【０４１９】

本明細書の実施形態では、送達は、ＡＡＶを介する。ヒトへのＡＡＶのインビボ送達のための治療有効用量は、約１×１０１０～約１×１０１０機能的ＡＡＶ／ｍｌ溶液を含有する約２０～約５０ｍｌの生理食塩水溶液の範囲内であると考えられる。投薬は、治療利益と任意の副作用とのバランスを取るように調整され得る。本明細書の実施形態では、ＡＡＶ用量は、一般に、約１ｘ１０５～１ｘ１０５０ゲノムＡＡＶ、約１ｘ１０８～１ｘ１０２０ゲノムＡＡＶ、約１ｘ１０１０～約１ｘ１０１６ゲノム、または約１ｘ１０１１～約１ｘ１０１６ゲノムＡＡＶの濃度の範囲にある。ヒト用量は、約１×１０１３ゲノムＡＡＶであり得る。かかる濃度は、約０．００１ｍｌ～約１００ｍｌ、約０．０５～約５０ｍｌ、または約１０～約２５ｍｌの担体溶液において送達され得る。他の有効用量は、用量応答曲線を確立するルーチン試験を通じて当業者によって容易に確立され得る。例えば、２０１３年3月２６日にＨａｊｊａｒ，ｅｔ　ａｌ．に対して認可された米国特許第８，４０４，６５８Ｂ２号の２７段、４５～６０行を参照されたい。

【０４２０】

本明細書の実施形態では、送達は、プラスミドを介する。かかるプラスミド組成物では、投薬は、応答を誘発するのに十分な量のプラスミドであるべきである。例えば、プラスミド組成物におけるプラスミドＤＮＡの好適な量は、７０ｋｇ個体当たり約０．１～約２ｍｇ、または約１μｇ～約１０μｇであり得る。本発明のプラスミドは、一般に、（ｉ）プロモーター、（ｉｉ）該プロモーターに動作可能に連結されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質をコードする配列、（ｉｉｉ）選択可能なマーカー、（ｉｖ）複製の起点、及び（ｖ）（ｉｉ）の下流にあり、かつ動作可能に連結された転写ターミネーターを含む。プラスミドはＣＲＩＳＰＲ複合体のＲＮＡ成分をコードすることもできるが、これらのうち

の１つ以上は代わりに異なるベクター上でコードされ得る。
【０４２１】
本明細書における用量は、平均７０ｋｇ個体に基づく。投与の頻度は、医学または獣医学の開業医（例えば、医師、獣医師）、または当該技術の科学者の範囲内である。また、実験で使用されるマウスは典型的には約２０ｇであり、マウス実験からは７０ｋｇ個体まで拡大することができることに留意されたい。
【０４２２】
本明細書に提供される組成物に使用される投薬は、繰り返し投与または反復投与のための投薬を含む。特定の実施形態では、投与は、数週間、数ヶ月、または数年の期間内に繰り返される。好適なアッセイは、最適な投与レジメンを得るために実行され得る。繰り返し投与は、より低い投薬の使用を可能にすることができ、オフターゲット修飾に正に影響することができる。
【０４２３】
ＲＮＡ送達
特定の実施形態では、ＲＮＡベースの送達が使用される。これらの実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質のｍＲＮＡ、（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアダプターに融合され得る）アデノシンデアミナーゼのｍＲＮＡは、インビトロ転写ガイドＲＮＡと共に送達される。Ｌｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．は、ＲＮＡベースの送達を使用した効率的なゲノム編集を説明する（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｅｌｌ．２０１５ Ｍａｙ；６（５）：３６３－３７２）。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ１３及び／またはアデノシンデアミナーゼをコードするｍＲＮＡ（複数可）は化学的に修飾され得、プラスミドコードＣａｓ１３及び／またはアデノシンデアミナーゼと比較して向上した活性を引き起こすことができる。例えば、ｍＲＮＡ（複数可）におけるウリジンは、シュードウリジン（Ψ）、Ｎ１－メチルシュードウリジン（ｍｅ１Ψ）、５－メトキシウリジン（５ｍｏＵ）で部分的または完全に置換され得る。参照によりその全体が本明細書に組み込まれるＬｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ １，００６６ ＤＯＩ：１０．１０３８／ｓ４１５５１－０１７－００６６（２０１７）を参照されたい。
【０４２４】
ＲＮＰ送達
特定の実施形態では、プレ複合ガイドＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、及び（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアダプターに融合され得る）アデノシンデアミナーゼは、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）として送達される。ＲＮＰは、このプロセスが転写の必要性を回避するため、ＲＮＡ法よりも速やかな編集効果を引き起こすという利点を有する。重要な利点は、両方のＲＮＰ送達が一過性であり、オフターゲット効果及び毒性問題を低減することである。異なる細胞型における異なるゲノム編集は、Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．（２０１４，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．２４（６）：１０１２－９）、Ｐａｉｘ ｅｔ ａｌ．（２０１５，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ２０４（１）：４７－５４）、Ｃｈｕ ｅｔ ａｌ．（２０１６，ＢＭＣ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１６：４）、及びＷａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１３，Ｃｅｌｌ．９；１５３（４）：９１０－８）によって観察されている。
【０４２５】
特定の実施形態では、リボ核タンパク質は、ＷＯ２０１６１６１５１６に記載のポリペプチドベースのシャトル剤の方法によって送達される。ＷＯ２０１６１６１５１６は、細胞透過性ドメイン（ＣＰＤ）に動作可能に連結されたエンドソーム漏出ドメイン（ＥＬＤ）を含む合成ペプチドを使用する、ヒスチジンリッチなドメイン及びＣＰＤに対するポリペプチドカーゴの効率的な形質導入を説明する。同様に、これらのポリペプチドは、真核細胞におけるＣＲＩＳＰＲ－エフェクターベースのＲＮＰの送達のために使用され得る。
【０４２６】
粒子

いくつかの態様または実施形態では、送達粒子製剤を含む組成物が使用され得る。いくつかの態様または実施形態では、製剤は、ＣＲＩＳＰＲ複合体を含み、複合体はＣＲＩＳＰＲタンパク質と、ＣＲＩＳＰＲ複合体の標的配列への配列特異的結合を導くガイドとを含む。いくつかの実施形態では、送達粒子は、脂質ベースの粒子、任意選択で脂質ナノ粒子、またはカチオン性脂質及び任意選択で生分解性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）を含む。いくつかの実施形態では、親水性ポリマーは、エチレングリコールまたはポリエチレングリコールを含む。いくつかの実施形態では、送達粒子は、リポタンパク質、好ましくはコレステロールをさらに含む。いくつかの実施形態では、送達粒子は、直径５００ｎｍ未満、任意選択で直径２５０ｎｍ未満、任意選択で直径１００ｎｍ未満、任意選択で直径約３５ｎｍ～約６０ｎｍである。

【０４２７】

例示的な粒子送達複合体は、２０１７年４月１４日に出願され、第６２／４８５，６２５号で出願された「Ｎｏｖｅ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｏｆ　Ｌａｒｇｅ　Ｐａｙｌｏａｄｓ」と題される米国仮特許出願においてさらに開示される。

【０４２８】

いくつかの型の粒子送達システム及び／または製剤は、多様なスペクトルの生物医学的用途において有用であることが既知である。一般に、粒子は、その輸送及び特性に関して単位全体として振る舞う小さな物体として定義される。粒子はさらに直径に応じて分類される。粗い粒子は２，５００～１０，０００ナノメートルの間の範囲に及ぶ。微粒子は、１００～２，５００ナノメートルの間のサイズである。超微粒子、またはナノ粒子は、一般に１～１００ナノメートル間のサイズにある。１００ｎｍ限界の根拠は、粒子をバルク材料と区別する新規な特性が、典型的には１００ｎｍ未満の臨界長さ規模で発生するという事実である。

【０４２９】

本明細書で使用される場合、粒子送達システム／製剤は、本発明に従う粒子を含む任意の生物学的送達システム／製剤として定義される。本発明に従う粒子は、１００ミクロン（μｍ）未満の最大寸法（例えば直径）を有する任意の実体である。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、１０μｍ未満の最大寸法を有する。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、２０００ナノメートル（ｎｍ）未満の最大寸法を有する。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、１０００ナノメートル（ｎｍ）未満の最大寸法を有する。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、９００ｎｍ、８００ｎｍ、７００ｎｍ、６００ｎｍ、５００ｎｍ、４００ｎｍ、３００ｎｍ、２００ｎｍ、または１００ｎｍ未満の最大寸法を有する。典型的には、本発明の粒子は、５００ｎｍ以下の最大寸法（例えば、直径）を有する。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、２５０ｎｍ以下の最大寸法（例えば、直径）を有する。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、２００ｎｍ以下の最大寸法（例えば、直径）を有する。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、１５０ｎｍ以下の最大寸法（例えば、直径）を有する。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、１００ｎｍ以下の最大寸法（例えば、直径）を有する。例えば、５０ｎｍ以下の最大寸法を有するより小さな粒子が、本発明のいくつかの実施形態において使用される。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、２５ｎｍ～２００ｎｍの範囲の最大寸法を有する。

【０４３０】

本発明の点では、ＣＲＩＳＰＲ複合体、例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質もしくはｍＲＮＡ、またはアデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質もしくはアダプターに融合され得る）またはｍＲＮＡ、またはナノ粒子もしくは脂質エンベロープを使用して送達されるガイドＲＮＡのうちの１つ以上の成分を有することが好ましい。他の送達システムまたはベクターは、本発明のナノ粒子態様と併せて使用され得る。

【０４３１】

一般に、「ナノ粒子」は、１０００ｎｍ未満の直径を有する任意の粒子を指す。ある特定の好ましい実施形態では、本発明のナノ粒子は、５００ｎｍ以下の最大寸法（例えば、

直径）を有する。他の好ましい実施形態では、本発明のナノ粒子は、２５ｎｍ～２００ｎｍの範囲の最大寸法を有する。他の好ましい実施形態では、本発明のナノ粒子は、１００ｎｍ以下の最大寸法を有する。他の好ましい実施形態では、本発明のナノ粒子は、３５ｎｍ～６０ｎｍの範囲の最大寸法を有する。本明細書でなされる粒子またはナノ粒子への参照は、適切な場合、互換的であり得ることを理解されたい。

【０４３２】

粒子のサイズが負荷の前または後に測定されるかどうかによって異なることは理解されるであろう。したがって、特定の実施形態では、用語「ナノ粒子」は、前負荷の粒子にのみ適用することができる。

【０４３３】

本発明に包含されるナノ粒子は、例えば、固体ナノ粒子（例えば、銀、金、鉄、チタンのような金属）、非金属、脂質ベースの固体、ポリマー）、ナノ粒子の懸濁液、またはこれらの組み合わせとして、異なる形態で提供され得る。金属、誘電体、及び半導体ナノ粒子は、ハイブリッド構造（例えば、コアシェルナノ粒子）と同様に調製され得る。半導体材料で作られたナノ粒子は、電子エネルギーレベルの量子化が起こるほど十分に小さい（典型的には１０ｎｍ未満）場合、標識された量子ドットでもあり得る。かかるナノスケール粒子は、薬物担体または撮像剤として生物医学的用途で使用され、本発明において同様の目的に適合され得る。

【０４３４】

半固形及び軟質ナノ粒子は、製造されており、本発明の範囲内である。半固形性の原型ナノ粒子は、リポソームである。様々な型のリポソームナノ粒子は、現在抗がん剤及びワクチンのための送達システムとして臨床的に使用される。片方が親水性で他方が疎水性であるナノ粒子は、Ｊａｎｕｓ粒子と呼ばれ、特に乳剤の安定化に有効である。これらは水／油界面で自己組織化し、固体界面活性剤として作用することができる。

【０４３５】

粒子特徴付け（例えば、形態、寸法などの特徴付けを含む）は、様々な異なる技術を使用して行われる。一般的な技術は、電子顕微鏡（ＴＥＭ、ＳＥＭ）、原子間力顕微鏡（ＡＦＭ）、動的光散乱（ＤＬＳ）、Ｘ線光電子分光法（ＸＰＳ）、粉末Ｘ線回折（ＸＲＤ）、フーリエ変換赤外分光法（ＦＴＩＲ）、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化飛行時間型質量分析（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）、紫外線可視分光法、二面偏波干渉法及び核磁気共鳴（ＮＭＲ）である。特徴付け（寸法測定）は、本発明の任意のインビトロ、エクスビボ及び／またはインビボ用途のための送達についての最適サイズの粒子を提供するため、固有粒子（すなわち、前負荷）に関して、またはカーゴの負荷後（本明細書でカーゴは例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの１つ以上の成分、例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはｍＲＮＡ、または（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアダプターに融合され得る）アデノシンデアミナーゼまたはｍＲＮＡ、またはガイドＲＮＡ、またはそれらの任意の組み合わせを指し、追加的な担体及び／または賦形剤を含むことができる）になされる。ある特定の好ましい実施形態では、粒子寸法（例えば、直径）特徴付けは、動的光散乱（ＤＬＳ）を使用する測定に基づく。言及は、米国特許第８，７０９，８４３号、米国特許第６，００７，８４５号、米国特許第５，８５５，９１３号、米国特許第５，９８５，３０９号、米国特許第５，５４３，１５８号、ならびに粒子、それらの作製及び使用及びそれらの測定に関するＪａｍｅｓ Ｅ．Ｄａｈｌｍａｎ ａｎｄ Ｃａｒｍｅｎ Ｂａｒｎｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２０１４）ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｏｎｌｉｎｅ １１ Ｍａｙ ２０１４，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｎａｎｏ．２０１４．８４による刊行物についてなされる。

【０４３６】

本発明の範囲内の粒子送達システムは、固体、半固体、エマルション、またはコロイド粒子を含むがこれらに限定されない任意の形態で提供され得る。そこで例えば、脂質ベースのシステム、リポソーム、ミセル、マイクロベシクル、エクソソーム、または遺伝子銃を含むがこれらに限定されない、本明細書に記載の送達システムいずれか自体は、本発明

の範囲内で粒子送達システムとして提供され得る。

【０４３７】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質ｍＲＮＡ、アデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアダプターに融合され得る）またはｍＲＮＡ、及びガイドＲＮＡは、粒子または脂質エンベロープを使用して同時に送達され得、例えば、本発明のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及びＲＮＡは、例えば、複合体として、Ｄａｈｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．、ＷＯ２０１５０８９４１９Ａ２及び７Ｃ１（例えば、２０１４年５月１１日にオンライン公開されたＪａｍｅｓ　Ｅ．Ｄａｈｌｍａｎ　ａｎｄ　Ｃａｒｍｅｎ　Ｂａｒｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２０１４）、ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｎａｎｏ．２０１４．８４を参照されたい）のような、本明細書に引用された文献におけるような粒子を介して送達され得、例えば、脂質またはリピドイド（ｌｉｐｉｄｏｉｄ）及び親水性ポリマーを含む送達粒子、例えば、カチオン性脂質及び親水性ポリマー、例えば、カチオン性脂質は、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）または１，２－ジテトラドカノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＭＰＣ）を含み、及び／または親水性ポリマーは、エチレングリコールまたはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含み、及び／または粒子は、コレステロール（例えば、製剤１＝ＤＯＴＡＰ　１００、ＤＭＰＣ　０、ＰＥＧ　０、コレステロール０；製剤番号２＝ＤＯＴＡＰ　９０、ＤＭＰＣ　０、ＰＥＧ　１０、コレステロール０；製剤番号３＝ＤＯＴＡＰ　９０、ＤＭＰＣ　０、ＰＥＧ　５、コレステロール５）をさらに含み、粒子は効率的な多段階のプロセスを使用して形成され、第１のエフェクタータンパク質及びＲＮＡは、例えば、１：１モル比で、例えば、室温で、例えば、３０分間、例えば、滅菌ヌクレアーゼフリー１Ｘ　ＰＢＳにおいて共に混合され、別個に、製剤に適用可能なＤＯＴＡＰ、ＤＭＰＣ、ＰＥＧ、及びコレステロールは、アルコール、例えば、１００％エタノールに溶解され、２つの溶液は共に混合されて複合体を含有する粒子を形成する）。

【０４３８】

核酸標的化エフェクタータンパク質（例えば、Ｃａｓ１３のようなＶ型タンパク質）ｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡは、粒子または脂質エンベロープを使用して同時に送達され得る。好適な粒子の例は、米国第９，３０１，９２３号に記載されるものを含むが、これらに限定されない。

【０４３９】

例えば、Ｓｕ　Ｘ，Ｆｒｉｃｋｅ　Ｊ，Ｋａｖａｎａｇｈ　ＤＧ，Ｉｒｖｉｎｅ　ＤＪ（“Ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ａｎｄ　ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｍＲＮＡ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ　ｕｓｉｎｇ　ｌｉｐｉｄ－ｅｎｖｅｌｏｐｅｄ　ｐＨ－ｒｅｓｐｏｎｓｉｖｅ　ｐｏｌｙｍｅｒ　ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ”Ｍｏｌ　Ｐｈａｒｍ．２０１１　Ｊｕｎ　６；８（３）：７７４－８７．ｄｏｉ：１０．１０２１／ｍｐ１００３９０ｗ．Ｅｐｕｂ　２０１１　Ａｐｒ　１）は、リン脂質二層シェルによって包み込まれたポリ（β－アミノエステル）（ＰＢＡＥ）コアを有する生分解性コアシェル構造ナノ粒子を説明する。これらは、インビボでのｍＲＮＡ送達のために開発された。ｐＨ応答性ＰＢＡＥ成分を選択してエンドソーム破壊を促進し、脂質表面層を選択してポリカチオンコアの毒性を最小化した。したがって、これらは、本発明のＲＮＡを送達するために好ましい。

【０４４０】

一実施形態では、自己組織化生体接着性（ｂｉｏａｄｈｅｓｉｖｅ）ポリマーに基づく粒子／ナノ粒子が企図され、これらは全て脳へのペプチドの経口送達、ペプチドの静脈内送達及びペプチドの鼻腔送達に適用され得る。疎水性薬物の経口吸収及び点眼送達のような他の実施形態も企図される。分子エンベロープ技術は、保護され、疾患の部位に送達される操作されたポリマーエンベロープに関与する（例えば、Ｍａｚｚａ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．ＡＣＳＮａｎｏ，２０１３．７（２）：１０１６－１０２６、Ｓｉｅｗ，Ａ．，ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ　Ｐｈａｒｍ，２０１２．９（１）：１４－２８、Ｌａｌａｔｓａ，Ａ．，ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｃｏｎｔｒ　Ｒｅｌ，２０１２．１６１（２）：５２３－３６、Ｌａｌ

atsa, A., et al., Mol Pharm, 2012. 9(6):1665-80、Lalatsa, A., et al. Mol Pharm, 2012. 9(6):1764-74、Garrett, N. L., et al. J Biophotonics, 2012. 5(5-6):458-68、Garrett, N. L., et al. J Raman Spect, 2012. 43(5):681-688、Ahmad, S., et al. J Royal Soc Interface 2010. 7:S423-33、Uchegbu, I. F. Expert Opin Drug Deliv, 2006. 3(5):629-40、Qu, X., et al. Biomacromolecules, 2006. 7(12):3452-9及びUchegbu, I. F., et al. Int J Pharm, 2001. 224:185-199を参照されたい)。標的組織に応じて、約5mg/kgの用量が単回または複数回用量で企図される。

【0441】

一実施形態では、Dan Andersonのラボによって開発された腫瘍成長をMITで阻止するためにRNAをがん細胞に送達することができる粒子/ナノ粒子は、本発明のAD官能化CRISPR-Casシステムに使用され得る/または適応され得る。特に、Anderson研究所は、新しい生物材料及びナノ製剤の合成、精製、特徴付け、及び製剤のための完全自動化された組み合わせシステムを開発した。Alabi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Aug 6;110(32):12881-6、Zhang et al., Adv Mater. 2013 Sep 6;25(33):4641-5、Jiang et al., Nano Lett. 2013 Mar 13;13(3):1059-64、Karagiannis et al., ACS Nano. 2012 Oct 23;6(10):8484-7、Whitehead et al., ACS Nano. 2012 Aug 28;6(8):6922-9及びLee et al., Nat Nanotechnol. 2012 Jun 3;7(6):389-93を参照されたい。

【0442】

米国特許出願第20110293703号は、リピドイド化合物に関し本発明のAD官能化CRISPR-Casシステムを送達するために適用され得るポリヌクレオチドの投与においても特に有用である。一態様では、アミノアルコールリピドイド化合物は、細胞または対象に送達される薬剤と組み合わされて、微粒子、ナノ粒子、リポソーム、またはミセルを形成する。粒子、リポソーム、またはミセルによって送達される薬剤は、ガス、液体、または固体の形態であり得、薬剤は、ポリヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、または小分子であり得る。アミノアルコールリピドイド化合物は、他のアミノアルコール脂質化合物、ポリマー(合成または天然)、界面活性剤、コレステロール、炭水化物、タンパク質、脂質などと組み合わされて粒子を形成することができる。次いで、これらの粒子は、任意選択で薬学的賦形剤と組み合わされて、薬学的組成物を形成することができる。

【0443】

米国特許公開第20110293703号は、アミノアルコールリピドイド化合物を調製する方法も提供する。アミンの1つ以上の当量は、好適な条件下でエポキシド末端化化合物の1つ以上の当量と反応させて、本発明のアミノアルコールリピドイド化合物を形成することができる。ある特定の実施形態では、アミンの全てのアミノ基は、エポキシド末端化化合物と完全に反応して三級アミンを形成する。他の実施形態では、アミンの全てのアミノ基は、エポキシド末端化化合物と完全に反応せずに三級アミンを形成することによって、アミノアルコール脂質化合物において一級または二級アミンをもたらさない。これらの一級アミンまたは二級アミンは、そのまま放置されるか、または異なるエポキシド末端化合物のような別の求電子剤と反応され得る。当業者によって理解されるように、アミンを過剰未満のエポキシド末端化化合物と反応させることは、様々な数の尾部を有する複数の異なるアミノアルコールリピドイド化合物をもたらす。ある特定のアミンは、2つのエポキシド由来化合物尾部で完全に官能化され得るが、他の分子は、エポキシド由来の化

合物尾部で完全に官能化されない。例えば、ジアミンまたはポリアミンは、分子の様々なアミノ部分から離れた１つ、２つ、３つ、または４つのエポキシド由来化合物尾部を含むことができ、一級、二級、及び三級アミンをもたらす。ある特定の実施形態では、全てのアミノ基は完全に官能化されていない。ある特定の実施形態では、同じ型のエポキシド末端化合物のうちの２つが使用される。他の実施形態では、２つ以上の異なるエポキシド末端化合物が使用される。アミノアルコールリピドイド化合物の合成は、溶媒の有無に関わらず実行され、合成は、３０～１００℃の範囲のより高い温度で、好ましくはおよそ５０～９０℃で実行され得る。調製されたアミノアルコールリピドイド化合物は、任意選択で精製され得る。例えば、アミノアルコールリピドイド化合物の混合物は、特定の数のエポキシド由来化合物尾部を有するアミノアルコールリピドイド化合物を得るために精製され得る。または混合物は、特定の立体異性体または位置異性体を得るために精製され得る。アミノアルコールリピドイド化合物はまたロゲン化アルキル（例えば、ヨウ化メチル）または他のアルキル化剤を使用してアルキル化され得、及び／またはそれらはアシル化されて得る。

【０４４４】

米国特許公開第２０１１０２９３７０３号は、本発明の方法によって調製されたアミノアルコールリピドイド化合物のライブラリも提供する。これらのアミノアルコールリピドイド化合物は、液体ハンドラ、ロボット、マイクロタイタープレート、コンピュータなどに関与する高スループット技術を使用して調製及び／またはスクリーニングされ得る。ある特定の実施形態では、アミノアルコール脂質化合物は、ポリヌクレオチドまたは他の薬剤（例えば、タンパク質、ペプチド、小分子）を細胞にトランスフェクトするそれらの能力についてスクリーニングされる。

【０４４５】

米国特許公開第２０１３０３０２４０１号は、ポリ（ベータアミノアルコール）（ＰＢＡＡ）のクラスに関し組み合わせ重合反応を使用して調整されている。本発明のＰＢＡＡは、コーティング（医療デバイスまたはインプラントのためのフィルムまたは多層フィルムのコーティングのような）、添加剤、材料、賦形剤、非生物付着剤（ｎｏｎ－ｂｉｏｆｏｕｌｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）、マイクロパターン化剤、及び細胞封入剤として、バイオテクノロジー及び生物医学的用途で使用され得る。表面コーティングとして使用される際、これらのＰＢＡＡは、それらの化学構造に応じて、インビトロ及びインビボの両方で異なるレベルの炎症を誘発した。このクラスの材料の大きな化学的多様性は、我々がインビトロでマクロファージ活性化を阻害するポリマーコーティングを特定することを可能にした。さらに、これらのコーティングは、カルボキシル化ポリスチレン微粒子の皮下埋め込み後、炎症細胞の動員を低減させ、線維症を低減させる。これらのポリマーは、細胞封入のためのポリ電解質複合体カプセルを形成するために使用され得る。本発明は、抗菌コーティング、ＤＮＡまたはｓｉＲＮＡ送達、ならびに幹細胞組織工学のような多くの他の生物学的用途を有することもできる。米国特許公開第２０１３０３０２４０１号の教示は、本発明のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムに適用され得る。

【０４４６】

Ｃａｓ１３、アデノシンデアミナーゼ（Ｃａｓ１３またはアダプタータンパク質に融合され得る）、及びガイドＲＮＡを含む事前組み立てされた組換えＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ複合体は、例えば電気穿孔によってトランスフェクトされ得、高い変異率及び検出可能なオフターゲット変異の不在をもたらす。Ｈｕｒ，Ｊ．Ｋ．ｅｔ　ａｌ，Ｔａｒｇｅｔｅｄ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　ｉｎ　ｍｉｃｅ　ｂｙ　ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｃａｓ１３　ｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１６　Ｊｕｎ　６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３５９６．

【０４４７】

脳への局所送達の点では、このことは様々な方法で実現され得る。例えば、材料は、例えば注射によって、線条体内に送達され得る。注射は、頭蓋切開術を介して立体的に実行され得る。

【０４４８】
いくつかの実施形態では、糖ベースの粒子が使用され得、例えばＧａｌＮＡｃ、本明細書に記載され、ＷＯ２０１４１１８２７２（参照により本明細書に組み込まれる）及びＮａｉｒ，ＪＫ ｅｔ ａｌ．，２０１４，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ １３６（４９），１６９５８－１６９６１）を参照し、特に送達に関する本明細書の教示は、別段明らかでない限り、全ての粒子に適用する。このことは糖ベースの粒子であると考えられ得、他の送達システム及び／または製剤に関するさらなる詳細が本明細書に提供される。したがって、ＧａｌＮＡｃは、一般用途及び他の考慮事項、例えば、該粒子の送達がＧａｌＮＡｃ粒子にも同様に適用するように、本明細書に記載される他の粒子の意味で粒子であると考えられ得る。溶液相コンジュゲーション戦略は、例えば、ＰＦＰ（ペンタフルオロフェニル）エステルとして活性化された三分枝ＧａｌＮＡｃクラスター（ｍｏｌ．ｗｔ．～２０００）を５’－ヘキシルアミノ修飾オリゴヌクレオチド（５’－ＨＡ ＡＳＯ、ｍｏｌ．ｗｔ．～８０００Ｄａ、ｓｔｅｒｇａａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．，２０１５，２６（８），ｐｐ １４５１－１４５５に結合するために使用され得る。同様に、ポリ（アクリレート）ポリマーは、インビボ核酸活性について説明されている（本明細書に参照により組み込まれるＷＯ２０１３１５８１４１を参照されたい）。さらなる代替的実施形態では、ＣＲＩＳＰＲナノ粒子（またはタンパク質複合体）天然型の血清タンパク質と事前混合することは、送達を向上するために使用され得る（Ａｋｉｎｃ Ａ ｅｔ ａｌ，２０１０，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ ｖｏｌ．１８ ｎｏ．７，１３５７－１３６４）。

【０４４９】
ナノクルー（ｎａｎｏｃｌｅｗ）
さらに、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムはナノクルーを使用して送達され得、例えば、Ｓｕｎ Ｗ ｅｔ ａｌ，Ｃｏｃｏｏｎ－ｌｉｋｅ ｓｅｌｆ－ｄｅｇｒａｄａｂｌｅ ＤＮＡ ｎａｎｏｃｌｅｗ ｆｏｒ ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ．，Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ．２０１４ Ｏｃｔ ２２；１３６（４２）：１４７２２－５．ｄｏｉ：１０．１０２１／ｊａ５０８８０２４．Ｅｐｕｂ ２０１４ Ｏｃｔ １３．、またはＳｕｎ Ｗ ｅｔ ａｌ，Ｓｅｌｆ－Ａｓｓｅｍｂｌｅｄ ＤＮＡ Ｎａｎｏｃｌｅｗｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｆｏｒ Ｇｅｎｏｍｅ Ｅｄｉｔｉｎｇ．，Ａｎｇｅｗ Ｃｈｅｍ Ｉｎｔ Ｅｄ Ｅｎｇｌ．２０１５ Ｏｃｔ ５；５４（４１）：１２０２９－３３．ｄｏｉ：１０．１００２／ａｎｉｅ．２０１５０６０３０．Ｅｐｕｂ ２０１５ Ａｕｇ ２７に記載される。

【０４５０】
ＬＮＰ
いくつかの実施形態では、送達は、ＬＮＰのような脂質粒子におけるＣａｓ１３タンパク質またはｍＲＮＡ形態の封入による。したがって、いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）が企図される。抗甲トランスサイレチン短い干渉ＲＮＡは、脂質ナノ粒子に封入され、ヒトに送達されており（例えば、Ｃｏｅｌｈｏ ｅｔ ａｌ．，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ２０１３；３６９：８１９－２９を参照されたい）、かかるシステムは、本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓシステムに適合及び適用され得る。静脈内に投与される体重のｋｇ当たり約０．０１～約１ｍｇの用量が企図される。デキサメタゾン、アセトアンピノフェン（ａｃｅｔａｍｐｉｎｏｐｈｅｎ）、ジフェンヒドラミンまたはセチリジン、及びラニチジンのような注入関連反応のリスクを低減するための薬剤が企図される。また、５つの用量について４週間毎にキログラム当たり約０．３ｍｇの複数回用量が企図される。

【０４５１】
ＬＮＰは、ｓｉＲＮＡを肝臓に送達するのに非常に有効であることが示されており（例えば、Ｔａｂｅｒｎｅｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，Ａｐｒ

ｉｌ ２０１３，Ｖｏｌ．３，Ｎｏ．４，ｐａｇｅｓ ３６３－４７０を参照されたい）、したがって、ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓをコードするｒｎａを肝臓に送達するために企図される。２週間毎に６ｍｇ／ｋｇのＬＮＰの約４つの用量の投薬が企図され得る。Ｔａｂｅｒｎｅｒｏ ｅｔ ａｌ．は、０．７ｍｇ／ｋｇで投与されたＬＮＰの最初の２サイクル後に腫瘍退縮が観察され、６サイクルの終了までに患者がリンパ節転移の完全退縮及び肝臓腫瘍の実質的な縮小を伴う部分奏効を達成したことを示した。完全奏功は、寛解を維持し２６か月にわたって用量を受けた後に治療を完了したこの患者において、４０の用量の後に得られた。ＶＥＧＦ経路阻害剤での以前の治療後に進行していた腎臓、肺、リンパ節を含むＲＣＣ及び肝外疾患部位を有する２人の患者は、およそ８～１２か月間、全ての部位で安定した疾患を有し、ＰＮＥＴ及び肝臓転移を有する患者は、安定した疾患を有する１８か月（３６用量）の間延長試験で継続した。

【０４５２】

しかしながら、ＬＮＰの電荷が考慮されなければならない。カチオン性脂質が負に荷電した脂質と組み合わされて、細胞内送達を促進する非二重層構造を誘導するためである。帯電したＬＮＰが静脈内注射後に急速に循環から除去されるため、７未満のｐＫａ値を有するイオン化可能なカチオン性脂質が開発された（例えば、Ｒｏｓｉｎ ｅｔ ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９，ｎｏ．１２，ｐａｇｅｓ １２８６－２２００，Ｄｅｃ．２０１１を参照されたい）。ＲＮＡのような負に荷電したポリマーは、低ｐＨ値（例えば、ｐＨ４）でＬＮＰに負荷され得、イオン化可能な脂質は正荷電を示す。しかしながら、生理学的ｐＨ値では、ＬＮＰは、より長い循環時間に適合する低表面電荷を示す。４種のイオン化可能なカチオン性脂質は、すなわち、１，２－ジリネオイル（ｄｉｌｉｎｅｏｙｌ）－３－ジメチルアンモニウムプロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキシ（ｄｉｌｉｎｏｌｅｙｌｏｘｙ）－３－Ｎ、Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシ－ケト－Ｎ、Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＫＤＭＡ）、及び１，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ）、に焦点を当ててきた。ＬＮＰ ｓｉＲＮＡシステムが、Ｆａｃｔｏｒ ＶＩＩ遺伝子サイレンシングモデルを採用するシリーズＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ＞ＤＬｉｎＫＤＭＡ＞ＤＬｉｎＤＭＡ＞＞ＤＬｉｎＤＡＰに従って変化する著しく異なる効力を有する、インビボでの肝細胞において遺伝子サイレンシング特性を示すことが示されている（例えば、Ｒｏｓｉｎ ｅｔ ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９，ｎｏ．１２，ｐａｇｅｓ １２８６－２２００，Ｄｅｃ．２０１１を参照されたい）。１μｇ／ｍｌのＬＮＰまたはＬＮＰにおけるか、もしくはＬＮＰに関連するＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ＲＮＡの投薬は、特にＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡを含有する製剤について企図され得る。

【０４５３】

ＬＮＰ及びＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ封入の調製は、Ｒｏｓｉｎ ｅｔ ａｌ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９，ｎｏ．１２，ｐａｇｅｓ １２８６－２２００，Ｄｅｃ．２０１１）から使用／及びまたは適合され得る。カチオン性脂質１，２－ジリネオイル－３－ジメチルアンモニウムプロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキシ－３－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシケト－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＫ－ＤＭＡ）、１，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ）、（３－ｏ－［２″－（メトキシポリエチレングリコール２０００）スクシノイル］－１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリコール（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）、及びＲ－３－［（ω－メトキシ－ポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－１，２－ジミリスチルオキシプロピル－３－アミン（ＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧ）は、Ｔｅｋｍｉｒａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，Ｃａｎａｄａ）から提供され得るか、または合成され得る。コレステロールは、Ｓｉｇｍａ（Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）から購入され得る。特異的ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ ＲＮＡは、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎＫ－ＤＭＡ、及びＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ（４０：１

０：４０：１０モル比でカチオン性脂質：ＤＳＰＣ：ＣＨＯＬ：ＰＥＧＳ－ＤＭＧまたはＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧ）を含有するＬＮＰに封入され得る。必要な際、０．２％ＳＰ－ＤｉＯＣ１８（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｂｕｒｌｉｎｇｔｏｎ，Ｃａｎａｄａ）は、細胞の取り込み、細胞内送達、及び生体分布を評価するために組み込まれ得る。封入は、カチオン性脂質：ＤＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ（４０：１０：４０：１０モル比）からなる脂質混合物を、１０ｍｍｏｌ／ｌの最終脂質濃度までエタノールに溶解させることによって実行され得る。この脂質のエタノール溶液は、５０ｍｍｏｌ／ｌのクエン酸、ｐＨ４．０に滴下して多層小胞を形成して、３０％エタノールｖｏｌ／ｖｏｌの最終濃度を生成することができる。大きな単層小胞は、Ｅｘｔｒｕｄｅｒ（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｌｉｐｉｄｓ，Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，Ｃａｎａｄａ）を使用して２つ重ねた８０ｎｍ」のＮｕｃｌｅｐｏｒｅポリカーボネートフィルタを通した多層小胞の押出後に形成され得る。封入は、３０％のエタノールｖｏｌ／ｖｏｌを含有する５０ｍｍｏｌ／ｌのクエン酸、ｐＨ４．０に２ｍｇ／ｍｌで溶解したＲＮＡを、押出され前形成された大きな単層小胞に滴下させることと、０．０６／１ｗｔ／ｗｔの最終ＲＮＡ／脂質重量比まで一定攪拌すると共に３１℃で３０分間のインキュベートとによって達成され得る。Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏｒ ２再生セルロース透析膜を使用して、１６時間リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、ｐＨ７．４に対する透析によりエタノールの除去及び製剤緩衝液の中和を実行した。ナノ粒子サイズ分布は、ＮＩＣＯＭＰ ３７０粒子サイザ、小胞／強度モード、及びガウシアンフィッティング（Ｇａｕｓｓｉａｎ ｆｉｔｔｉｎｇ）を使用して動的光散乱によって決定され得る（Ｎｉｃｏｍｐ Ｐａｒｔｉｃｌｅ Ｓｉｚｉｎｇ，Ｓａｎｔａ Ｂａｒｂａｒａ，ＣＡ）。３つのＬＮＰシステム全ての粒子サイズは、直径約７０ｎｍであり得る。ＲＮＡ封入効率は、透析前後に回収された試料からＶｉｖａＰｕｒｅＤ ＭｉｎｉＨカラム（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ Ｓｔｅｄｉｍ Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用する遊離ＲＮＡの除去によって決定され得る。封入されたＲＮＡは、溶出したナノ粒子から抽出され、２６０ｎｍで定量化され得る。ＲＮＡ対脂質比を、Ｗａｋｏ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ ＵＳＡ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＶＡ）からのコレステロールＥ酵素アッセイを使用して、小胞中のコレステロール含有量の測定によって決定した。ＬＮＰ及びＰＥＧ脂質の本明細書での考察と併せて、ＰＥＧ化リポソームまたはＬＮＰは、同様に、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムまたはその成分の送達に適する。

【０４５４】

脂質プレミックス溶液（２０．４ｍｇ／ｍＬの総脂質濃度）は、５０：１０：３８．５モル比でＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＳＰＣ、及びコレステロールを含有するエタノールにおいて調製され得る。酢酸ナトリウムは、０．７５：１（酢酸ナトリウム：ＤＬｉＮＫＣ２－ＤＭＡ）のモル比で脂質プレミックスに添加され得る。脂質は、その後、混合物と１．８５体積のクエン酸緩衝液（１０ｍｍｏｌ／ｌ、ｐＨ３．０）を激しい攪拌を伴い組み合わせることによって水和され得、３５％エタノールを含有する水性緩衝液中で自発的なリポソーム形成をもたらす。リポソーム溶液は、粒子サイズの時間依存的な増加を可能にするために３７℃でインキュベートされ得る。アリコートは、動的光散乱によってリポソームサイズの変化を調査するために、インキュベーション中の様々な時間に除去され得る（Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ Ｎａｎｏ ＺＳ，Ｍａｌｖｅｒｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ，ＵＫ）。所望の粒子サイズが達成されると、ＰＥＧ脂質溶液（原液＝３５％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）エタノールにおいて１０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧ－ＤＭＧ）はリポソーム混合物に添加されて、全脂質の３．５％の最終的なＰＥＧモル濃度を得てことができる。ＰＥＧ－脂質を添加すると、リポソームはそれらのサイズべきであり、さらなる成長を効果的にクエンチする。次いで、ＲＮＡは、およそ１：１０（ｗｔ：ｗｔ）の総脂質比で空のリポソームに添加され、続いて、３７℃で３０分間インキュベートして、負荷されたＬＮＰを形成することができる。その後、混合物は、ＰＢＳ中で一晩透析され、０．４５μｍのシリンジフィルタで濾過され得る。

【０４５５】

Ｓｐｈｅｒｉｃａｌ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ（ＳＮＡ（商標））構築物及び他のナ

ノ粒子（特に金ナノ粒子）は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを意図される標的に送達する手段としても企図される。有意なデータは、核酸官能化金ナノ粒子に基づいて、ＡｕｒａＳｅｎｓｅ　ＴｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓのＳｐｈｅｒｉｃａｌ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ（ＳＮＡ（商標））構築物が有用であることを示す。

【０４５６】

本明細書の教示と併せて採用され得る文献は、Ｃｕｔｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１１　１３３：９２５４－９２５７、Ｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｍａｌｌ．２０１１　７：３１５８－３１６２、Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，ＡＣＳ　Ｎａｎｏ．２０１１　５：６９６２－６９７０、Ｃｕｔｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１２　１３４：１３７６－１３９１、Ｙｏｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｎｏ　Ｌｅｔｔ．２０１２　１２：３８６７－７１、Ｚｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２０１２　１０９：１１９７５－８０、Ｍｉｒｋｉｎ，Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ　２０１２　７：６３５－６３８　Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１２　１３４：１６４８８－１６９１、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，Ｎａｔｕｒｅ　２０１３　４９５：Ｓ１４－Ｓ１６、Ｃｈｏｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２０１３　１１０（１９）：７６２５－７６３０、Ｊｅｎｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．５，２０９ｒａ１５２（２０１３）及びＭｉｒｋｉｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｍａｌｌ，１０：１８６－１９２を含む。

【０４５７】

ＲＮＡを有する自己組織化ナノ粒子は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）の遠位端で結合したＡｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ（ＲＧＤ）ペプチドリガンドでＰＥＧ化されるポリエチレンイミン（ＰＥＩ）で構築され得る。このシステムは、例えば、インテグリンを発現する腫瘍新生血管を標的化し、血管内皮成長因子受容体－２（ＶＥＧＦ　Ｒ２）発現を阻害するｓｉＲＮＡを送達し、それによって腫瘍血管新生を達成する手段として使用される（Ｓｃｈｉｆｆｅｌｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２００４，Ｖｏｌ．３２，Ｎｏ．１９を参照されたい）。ナノプレックスは、等体積のカチオンポリマー及び核酸の水溶液を混合して、２～６の範囲にわたってイオン化可能な窒素（ポリマー）をリン酸塩（核酸）に正味モル過剰を与えることによって調製され得る。カチオン性ポリマーと核酸との静電相互作用は、したがってここでナノプレックスと称される、約１００ｎｍの平均粒子サイズ分布を有するポリプレックスの形成をもたらす。約１００～２００ｍｇのＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの投薬は、Ｓｃｈｉｆｆｅｌｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．の自己組織化ナノ粒子における送達のために想定される。

【０４５８】

Ｂａｒｔｌｅｔｔ　ｅｔ　ａｌ．のナノプレックス（ＰＮＡＳ，Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ　２５，２００７，ｖｏｌ．１０４，ｎｏ．３９）はまた、本明細書に適用され得る。Ｂａｒｔｌｅｔｔ　ｅｔ　ａｌ．のナノプレックスは、等体積のカチオンポリマー及び核酸の水溶液を混合して、２～６の範囲にわたってイオン化可能な窒素（ポリマー）をリン酸塩（核酸）に正味モル過剰を与えることによって調製される。カチオン性ポリマーと核酸との静電相互作用は、したがってここでナノプレックスと称される、約１００ｎｍの平均粒子サイズ分布を有するポリプレックスの形成をもたらす。Ｂａｒｔｌｅｔｔ　ｅｔ　ａｌ．のＤＯＴＡ－ｓｉＲＮＡを以下のように合成した。１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－テトラ酢酸モノ（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）（ＤＯＴＡ－ＮＨＳｅｓｔｅｒ）を、Ｍａｃｒｏｃｙｃｌｉｃｓ（Ｄａｌｌａｓ，ＴＸ）から注文した。炭酸緩衝液（ｐＨ９）中の１００倍モル過剰のＤＯＴＡ－ＮＨＳ－エステルを有するアミン修飾ＲＮＡセンス鎖を、微小遠心分離管に添加した。内容物を室温で４時間撹拌して反応させた。ＤＯＴＡ－ＲＮＡセンスコンジュゲートをエタノール沈殿させ、水に再懸濁し、未修飾アンチセンス鎖にアニールして、ＤＯＴＡ－ｓｉＲＮＡを得た。全ての液体をＣｈｅｌｅｘ－１００（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）で前処理し、微量の金属汚染物質を除去した。Ｔｆ標的及び非標的ｓｉＲＮＡナノ粒子は、

シクロデキストリン含有ポリカチオンを使用することによって形成され得る。典型的には、ナノ粒子は、３（＋／－）の電荷比及び０．５ｇ／リットルのｓｉＲＮＡ濃度で水中に形成された。標的化されたナノ粒子表面上のアダマンタン－ＰＥＧ分子の１パーセントをＴｆで修飾した（アダマンタン－ＰＥＧ－Ｔｆ）。ナノ粒子を注射のために５％（ｗｔ／ｖｏｌ）のグルコース担体溶液中に懸濁させた。

【０４５９】

Ｄａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ，Ｖｏｌ　４６４，１５　Ａｐｒｉｌ　２０１０）は、標的化されたナノ粒子送達システム（臨床試験登録番号ＮＣＴ００６８９０６５）を使用するＲＮＡ臨床試験を実施する。標準治療療法に難治性の固形がんを有する患者は、２１日周期の１、３、８、及び１０日目に３０分の静脈内注入によって標的化されたナノ粒子の用量を投与される。ナノ粒子は、（１）直鎖状シクロデキストリンベースのポリマー（ＣＤＰ）、（２）がん細胞表面上のＴＦ受容体（ＴＦＲ）と係合するためにナノ粒子の外側に示されるリガンドを標的化するヒトトランスフェリンタンパク質（ＴＦ）、（３）親水性ポリマー（生物学的流体におけるナノ粒子の安定性を促進するために使用されるポリエチレングリコール（ＰＥＧ））、及び（４）ＲＲＭ２の発現を低減するように設計されたｓｉＲＮＡ（クリニックで使用される配列は、以前ｓｉＲ２Ｂ＋５と表された）を含有する合成送達システムからなる。ＴＦＲは悪性細胞において上方調節されると長く知られており、ＲＲＭ２は確立された抗がん標的である。これらのナノ粒子（ＣＡＬＡＡ－０１と表される臨床版）は、非ヒト霊長類における複数回用量試験において十分に耐容性があることが示されている。慢性骨髄性白血病の単一の患者はリポソーム送達によってｓｉＲＮＡを投与されているが、Ｄａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ．の臨床試験は、標的化された送達システムでｓｉＲＮＡを全身送達し、固形がんを有する患者を治療するための初期ヒト試験である。標的化された送達システムがヒト腫瘍へ機能的ｓｉＲＮＡの効果的な送達を提供することができるかどうかを確認するために、Ｄａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ．は、３つの異なる投与コホートからの３つの患者、全員が転移性黒色腫を有し、かつそれぞれ１８、２４、及び３０ｍｇのｍ－２　ｓｉＲＮＡのＣＡＬＡＡ－０１用量を受けた患者Ａ、Ｂ、及びＣからの生検を調査した。同様の用量は、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓシステムのためにも企図され得る。本発明の送達は、直鎖状のシクロデキストリンベースのポリマー（ＣＤＰ）、がん細胞表面上のＴＦ受容体（ＴＦＲ）と係合するためにナノ粒子の外側に示されるリガンドを標的化するヒトトランスフェリンタンパク質（ＴＦ）及び／または親水性ポリマー（例えば、生物学的流体におけるナノ粒子の安定性を促進するために使用されるポリエチレングリコール（ＰＥＧ））を含有するナノ粒子で達成され得る。

【０４６０】

本明細書に参照により組み込まれる米国特許第８，７０９，８４３号は、治療薬剤含有粒子の組織、細胞、及び細胞内区画への標的化された送達のための薬物送達システムを提供する。本発明は、界面活性剤、親水性ポリマーまたは脂質にコンジュゲートされたポリマーを含む標的化された粒子を提供する。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第６，００７，８４５号は、多機能性化合物を１つ以上の疎水性ポリマー及び１つ以上の親水性ポリマーと共有結合で連結させることによって形成されるマルチブロックコポリマーのコアを有し、生物活性材料を含有する粒子を提供する。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第５，８５５，９１３号は、５μｍ～３０μｍの平均直径を有し０．４ｇ／ｃｍ３未満のタップ密度を有する空力学的に軽い粒子を有する粒子組成物を提供し、肺システムへの薬物送達のためにその表面に界面活性剤を組み込む。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第５，９８５，３０９号は、正または負に荷電した治療もしくは診断用薬剤の界面活性剤及び／または親水性もしくは疎水性複合体、ならびに肺システムへの送達のための反対電荷の荷電分子を組み込む粒子を提供する。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第５，５４３，１５８号は、生物活性物質及び表面上にポリ（アルキレングリコール）部分を含有する生分解性固体コアを有する生分解性注射可能粒子を提供する。参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１２１３５０２５（ＵＳ２０１２０２５１５６０としても公開される）は、共役ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）ポリマー及び共役

アザーマクロサイクル（総称して、「共役リポマー」または「リポマー」と称される）を記載する。ある特定の実施形態では、かかる共役リポマーが、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの文脈において使用されて、タンパク質発現の調節を含む遺伝子発現を修飾するためのインビトロ、エクスビボ、及びインビボのゲノム撹乱を達成することができることが想定され得る。

【０４６１】

一実施形態では、ナノ粒子は、エポキシド修飾脂質ポリマー、有利には７Ｃ１であり得る（例えば、Ｊａｍｅｓ Ｅ．Ｄａｈｌｍａｎ ａｎｄ Ｃａｒｍｅｎ Ｂａｒｎｅｓ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２０１４）ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ ｏｎｌｉｎｅ １１ Ｍａｙ ２０１４，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｎａｎｏ．２０１４．８４を参照されたい）。Ｃ７１を、Ｃ１５エポキシド末端脂質を１４：１モル比でＰＥＩ６００と反応させることによって合成し、Ｃ１４ＰＥＧ２０００で製剤化して、ＰＢＳ溶液において少なくとも４０日間安定したナノ粒子（直径３５～６０ｎｍ）を生成した。

【０４６２】

エポキシド修飾脂質ポリマーは、本発明のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを肺細胞、心血管細胞または腎細胞に送達するために利用され得るが、当業者は、システムを他の標的器官に送達するように適合させることができる。約０．０５～約０．６ｍｇ／ｋｇの範囲の投薬が想定される。数日または数週間にわたる投薬も想定され、総投薬は約２ｍｇ／ｋｇである。

【０４６３】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子を送達するためのＬＮＰは、例えば、参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２００５／１０５１５２（ＰＣＴ／ＥＰ２００５／００４９２０）、ＷＯ２００６／０６９７８２（ＰＣＴ／ＥＰ２００５／０１４０７４）、ＷＯ２００７／１２１９４７（ＰＣＴ／ＥＰ２００７／００３４９６）、及びＷＯ２０１５／０８２０８０（ＰＣＴ／ＥＰ２０１４／００３２７４）に記載されるもののような当該技術分野で既知の方法によって調製される。ｓｉＲＮＡの哺乳動物細胞への増強及び向上された送達を特異的に目的としたＬＮＰは、例えば、Ａｌｅｋｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，６８（２３）：９７８８－９８（Ｄｅｃ．１，２００８）、Ｓｔｒｕｍｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．，５０（１）：７６－８（Ｊａｎ．２０１２）、Ｓｃｈｕｌｔｈｅｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，３２（３６）：４１４１－４８（Ｄｅｃ．２０，２０１４）、及びＦｅｈｒｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２２（４）：８１１－２０（Ａｐｒ．２２，２０１４）において説明され、これらは本明細書に参照により組み込まれ、本技術へ適用され得る。

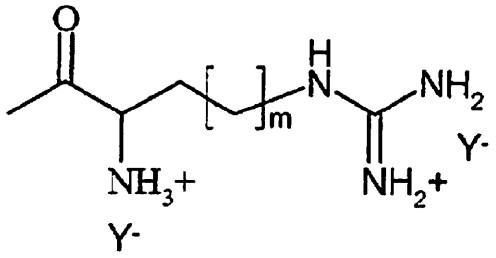
【０４６４】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、ＷＯ２００５／１０５１５２（ＰＣＴ／ＥＰ２００５／００４９２０）、ＷＯ２００６／０６９７８２（ＰＣＴ／ＥＰ２００５／０１４０７４）、ＷＯ２００７／１２１９４７（ＰＣＴ／ＥＰ２００７／００３４９６）、及びＷＯ ２０１５／０８２０８０（ＰＣＴ／ＥＰ２０１４／００３２７４）において開示される任意のＬＮＰを含む。

【０４６５】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、式Ｉを有する少なくとも１つの脂質を含む。

（式Ｉ）、式中、Ｒ１及びＲ２は各々かつ独立してアルキルを含む群から選択され、ｎは１～４の任意の整数であり、Ｒ３はリシル、オルニチル、２，４－ジアミノブチリル、ヒスチジル及び式ＩＩに従うアシル部分を含む群から選択されるアシルであり、



（式ＩＩ）、

式中、ｍは１～３の任意の整数であり、Ｙ－は薬学的に許容されるアニオンである。いくつかの実施形態では、式Ｉに従う脂質は、少なくとも２つの非対称Ｃ原子を含む。いくつかの実施形態では、式Ｉのエナンチオマーは、Ｒ－Ｒ、Ｓ－Ｓ、Ｒ－Ｓ及びＳ－Ｒエナンチオマーを含むが、これらに限定されない。

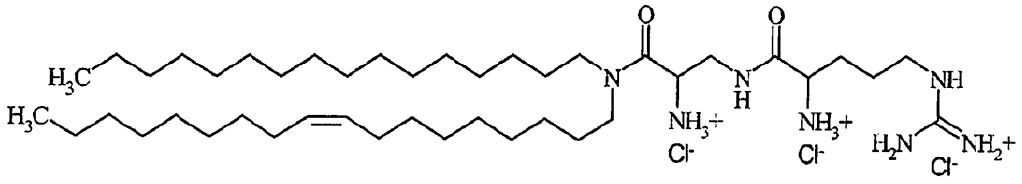
【０４６６】

いくつかの実施形態では、Ｒ１はラウリルであり、Ｒ２はミリスチルである。別の実施形態では、Ｒ１はパルミチルであり、Ｒ２はオレイルである。いくつかの実施形態では、ｍは１または２である。いくつかの実施形態では、Ｙ－は、ハロゲニド（ｈａｌｏｇｅｎｉｄ）、酢酸塩、またはトリフルオロ酢酸塩から選択される。

【０４６７】

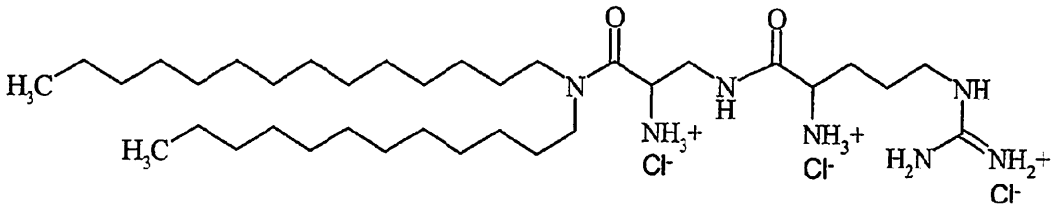
いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、以下から選択される１つ以上の脂質を含む。

－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－パルミチル－Ｎ－オレイル－アミド三塩酸塩（式ＩＩＩ）：



（式ＩＩＩ）、

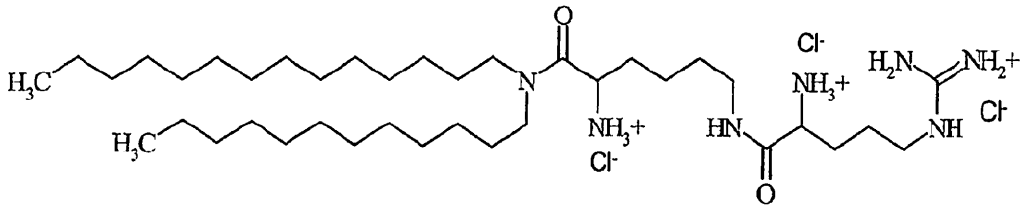
－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－ラウリル－Ｎ－ミリスチル－アミド三塩酸塩（式ＩＶ）：



（式ＩＶ）、

及び

－アルギニル－リシン－Ｎ－ラウリル－Ｎ－ミリスチル－アミド三塩酸塩（式Ｖ）：



（式Ｖ）。

【０４６８】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、構成成分も含む。例として、限定するものではないが、いくつかの実施形態では、構成成分は、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、核酸、またはこれらの組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、構成成分は、抗体、例えば、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形

態では、構成成分は、例えば、リボザイム、アプタマー、スピーゲルマー（ｓｐｉｅｇｅｌｍｅｒ）、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡ、ＬＮＡ、またはこれらの組み合わせから選択される核酸である。いくつかの実施形態では、核酸は、ガイドＲＮＡ及び／またはｍＲＮＡである。

【０４６９】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰの構成成分は、ＣＲＩＰＳＲ－Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰの構成成分は、ＩＩ型またはＶ型ＣＲＩＰＳＲ－Ｃａｓタンパク質をコードするｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰの構成成分は、アデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアダプタータンパク質に融合され得る）をコードするｍＲＮＡを含む。

【０４７０】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰの構成成分は、１つ以上のガイドＲＮＡをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを血管内皮に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを肺内皮に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを肝臓に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを肺に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを心臓に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを脾臓に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを腎臓に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを膵臓に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡを脳に送達するように構成される。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、前述のｍＲＮＡ及びガイドＲＮＡをマクロファージに送達するように構成される。

【０４７１】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、少なくとも１つのヘルパー脂質も含む。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、リン脂質及びステロイドから選択される。いくつかの実施形態では、リン脂質は、リン酸のジエステル及び／またはモノエステルである。いくつかの実施形態では、リン脂質は、ホスホグリセリド及び／またはスフィンゴ脂質である。いくつかの実施形態では、ステロイドは、部分的に水素化されたシクロペンタ［ａ］フェナントレンに基づく天然型及び／または合成化合物である。いくつかの実施形態では、ステロイドは２１～３０のＣ原子を含有する。いくつかの実施形態では、ステロイドはコレステロールである。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＰｈｙＰＥ）、セラミド、及び１，２－ジオレイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）から選択される。

【０４７２】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのヘルパー脂質は、ＰＥＧ部分、ＨＥＧ部分、ポリヒドロキシエチルデンプン（ポリＨＥＳ）部分及びポリプロピレン部分を含む群から選択される部分を含む。いくつかの実施形態では、部分は、約５００～１０，０００Ｄａまたは約２，０００～５，０００Ｄａの分子量を有する。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ部分は、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３ホスホエタノールアミン、１，２－ジアルキル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、及びセラミド－ＰＥＧから選択される。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ部分は、約５００～１０，０００Ｄａまたは約２，０００～５，０００Ｄａの分子量を有する。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ部分は、２，０００Ｄａの分子量を有する。

【０４７３】

いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質は、組成物の総脂質含有量の約２０ｍｏｌ％～８０ｍｏｌ％である。いくつかの実施形態では、ヘルパー脂質成分は、ＬＮＰの総脂質含

有量の約３５ｍｏｌ％～６５ｍｏｌ％である。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、ＬＮＰの総脂質含有量の５０ｍｏｌ％での脂質及び５０ｍｏｌ％でのヘルパー脂質を含む。

【０４７４】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、－３－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－パルミチル－Ｎ－オレイル－アミド三塩酸塩、－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－ラウリル－Ｎ－ミリスチル－アミド三塩酸塩、または－アルギニル－リシン－Ｎ－ラウリル－Ｎ－ミリスチル－アミド三塩酸塩のうちのいずれかをＤＰｈｙＰＥと組み合わせて含み、ＤＰｈｙＰＥの含有量は、ＬＮＰの全体脂質含有量の約８０ｍｏｌ％、６５ｍｏｌ％、５０ｍｏｌ％、及び３５ｍｏｌ％である。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－パーニチル（ｐａｈｎｉｔｙｌ）－Ｎ－オレイル－アミド三塩酸塩（脂質）及び１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－（ヘルパー脂質）を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、β－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－パルミチル－Ｎ－オレイル－アミド三塩酸塩（脂質）、１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（第１のヘルパー脂質）、及び１，２－ジステロイル（ｄｉｓｔｅｒｏｙｌ）－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－ＰＥＧ２０００（第２のヘルパー脂質）を含む。

【０４７５】

いくつかの実施形態では、第２のヘルパー脂質は、総脂質含有量の約０．０５ｍｏｌ％～４．９ｍｏｌ％または約１ｍｏｌ％～３ｍｏｌ％である。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、総脂質含有量の約４５ｍｏｌ％～５０ｍｏｌ％での脂質、総脂質含有量の約４５ｍｏｌ％～５０ｍｏｌ％の第１のヘルパー脂質を含み、ただし、総脂質含有量の約０．１ｍｏｌ％～５ｍｏｌ％、約１ｍｏｌ％～４ｍｏｌ％、または約２ｍｏｌ％のＰＥＧ化された第２のヘルパー脂質が存在することを条件とし、脂質、第１のヘルパー脂質、及び第２のヘルパー脂質の含有量の合計は、総脂質含有量の１００ｍｏｌ％であり、第１のヘルパー脂質及び第２のヘルパー脂質の合計は、総脂質含有量の５０ｍｏｌ％である。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、（ａ）５０ｍｏｌ％のβ－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－パルミチル－Ｎ－オレイル－アミド三塩酸塩、４８ｍｏｌ％の１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、及び２ｍｏｌ％の１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－ＰＥＧ２０００、または（ｂ）５０ｍｏｌ％のβ－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－パルミチル－Ｎ－オレイルアミド三塩酸塩、４９ｍｏｌ％の１，２－ジフィタノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン、及び１ｍｏｌ％のＮ（カルボニル－メトキシポリエチレングリコール－２０００）－１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ３－ホスホエタノールアミン、またはそれらのナトリウム塩を含む。

【０４７６】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは核酸を含有し、核酸骨格リン酸塩対カチオン性脂質窒素原子の電荷比は約１：１．５～７または約１：４である。

【０４７７】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、インビボ条件下で脂質組成物から除去可能な遮蔽化合物も含む。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、生物学的に不活性な化合物である。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、その表面上またはそのような分子上にいかなる電荷も担持しない。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、ポリエチルエングリコール（ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｇｌｙｃｏｌｅ）（ＰＥＧ）、ヒドロキシエチルグルコース（ＨＥＧ）ベースのポリマー、ポリヒドロキシエチルデンプン（ｐｏｌｙＨＥＳ）及びポリプロピレンである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ、ＨＥＧ、ポリＨＥＳ、及びポリプロピレン重量は、約５００～１０，０００Ｄａ、または約２０００～５０００Ｄａである。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、ＰＥＧ２０００またはＰＥＧ５０００である。

【０４７８】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、少なくとも１つの脂質、第１のヘルパー脂質、及びインビボ条件下で脂質組成物から除去可能な遮蔽化合物を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、第２のヘルパー脂質も含む。いくつかの実施形態では、第１のヘルパー脂質は、セラミドである。いくつかの実施形態では、第２のヘルパー脂質は、セラミドである。いくつかの実施形態では、セラミドは、６～１０の炭素原子からの少なくとも１つの短い炭素鎖置換基を含む。いくつかの実施形態では、セラミドは、８つの炭素原子を含む。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、セラミドに結合される。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、セラミドに結合される。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、セラミドに共有結合される。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、ＬＮＰにおける核酸に結合される。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、核酸に共有結合される。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、リンカーによって核酸に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、生理学的条件下で切断される。いくつかの実施形態では、リンカーは、ｓｓＲＮＡ、ｓｓＤＮＡ、ｄｓＲＮＡ、ｄｓＤＮＡ、ペプチド、Ｓ－Ｓ－リンカー及びｐＨ感受性リンカーから選択される。いくつかの実施形態では、リンカー部分は、核酸のセンス鎖の３’末端に結合される。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、ｐＨ感受性リンカーまたはｐＨ感受性部分を含む。いくつかの実施形態では、ｐＨ感受性リンカーまたはｐＨ感受性部分は、アニオン性リンカーまたはアニオン性部分である。いくつかの実施形態では、アニオン性リンカーまたはアニオン性部分は、酸性環境においてより低いアニオン性であるか、または中性である。いくつかの実施形態では、ｐＨ感受性リンカーまたはｐＨ感受性部分は、オリゴ（グルタミン酸）、オリゴフェノレート（複数可）及びジエチレントリアミンペンタ酢酸から選択される。

【０４７９】

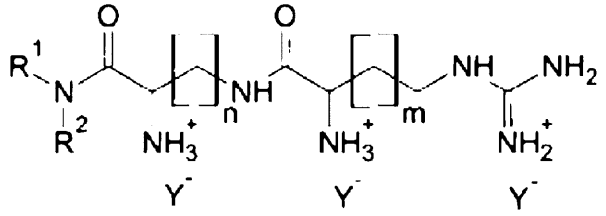
前項におけるＬＮＰ実施形態のいずれかでは、ＬＮＰは、約５０～６００ｍｏｓｍｏｌｅ／ｋｇ、約２５０～３００ｍｏｓｍｏｌｅ／ｋｇ、または約２８０～３２０ｍｏｓｍｏｌｅ／ｋｇの浸透圧を有することができ、及び／または、脂質及び／または１つまたは２つのヘルパー脂質及び遮蔽化合物によって形成されるＬＮＰは、約２０～２００ｎｍ、約３０～１００ｎｍ、または約４０～８０ｎｍの粒子サイズを有する。

【０４８０】

いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、インビボでより長い循環を提供し、ＬＮＰを含有する核酸のより良い生体分布を可能にする。いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、ＬＮＰの血清化合物または他の体液の化合物または細胞質膜、例えば、ＬＮＰが投与される血管構造の内皮内膜の細胞質膜との即時相互作用を防止する。追加的にまたは代替的に、いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、免疫システムのエレメントがＬＮＰと即座に相互作用することも防止する。追加的にまたは代替的に、いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、抗オプソニン化合物として作用する。いかなる機構または理論に束縛されることを望まないが、いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、その環境との相互作用のために利用可能なＬＮＰの表面積を低減させる被覆または外被を形成する。追加的にまたは代替的に、いくつかの実施形態では、遮蔽化合物は、ＬＮＰの全体的な電荷を遮蔽する。

【０４８１】

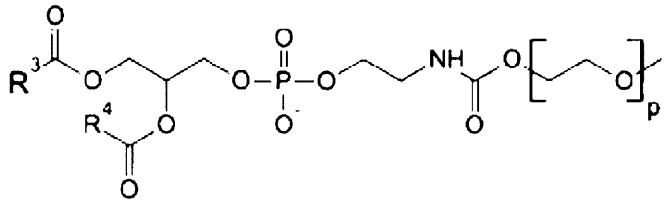
別の実施形態では、ＬＮＰは、式ＶＩを有する少なくとも１つのカチオン性脂質を含む。



（式ＶＩ）、

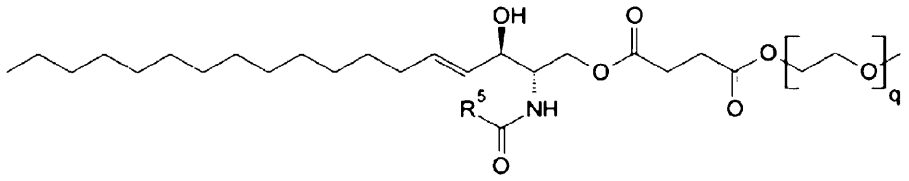
式中、ｎは１、２、３、または４であり、ｍは１、２、または３であり、Ｙ－はアニオン

であり、R^1及びR^2の各々は直鎖Ｃ１２－Ｃ１８アルキル及び直鎖Ｃ１２－Ｃ１８アルケニル、ステロール化合物からなる群から個別にかつ独立して選択され、ステロール化合物はコレステロール及びスチグマステロール、及びＰＥＧ化脂質からなる群から選択され、ＰＥＧ化脂質はＰＥＧ部分を含み、ＰＥＧ化脂質は
式ＶＩＩのＰＥＧ化ホスホエタノールアミンからなる群から選択され、



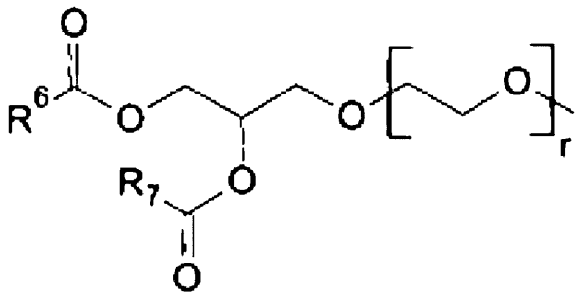
（式ＶＩＩ）、

式中、R^3及びR^4は、個別にかつ独立して直鎖Ｃ１３～Ｃ１７アルキルであり、ｐは、１５～１３０の任意の整数、
式ＶＩＩＩのＰＥＧ化セラミドであり、



（式ＶＩＩＩ）、

式中、R^5は直鎖Ｃ７～Ｃ１５アルキルであり、ｑは１５～１３０の任意の数、及び
式ＩＸのＰＥＧ化ジアシルグリセロールであり、



（式ＩＸ）、

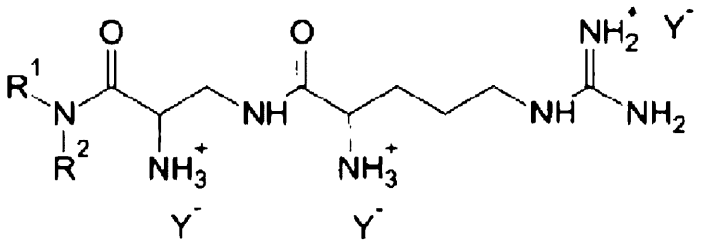
式中、R^6及びR^7のそれぞれは、個々にかつ独立して直鎖Ｃ１１～Ｃ１７アルキルであり、ｒは、１５～１３０の任意の整数である。

【０４８２】

いくつかの実施形態では、R^1及びR^2は互いに異なる。いくつかの実施形態では、R^1はパルミチルでありR^2はオレイルである。いくつかの実施形態では、R^1はラウリルでありR^2はミリスチルである。いくつかの実施形態では、R^1及びR^2は同じである。いくつかの実施形態では、R^1及びR^2のそれぞれは、Ｃ１２アルキル、Ｃ１４アルキル、Ｃ１６アルキル、Ｃ１８アルキル、Ｃ１２アルケニル、Ｃ１４アルケニル、Ｃ１６アルケニル、及びＣ１８アルケニルからなる群から個別にかつ独立して選択される。いくつかの実施形態では、Ｃ１２アルケニル、Ｃ１４アルケニル、Ｃ１６アルケニル、及びＣ１８アルケニルの各々は、１つまたは２つの二重結合を含む。いくつかの実施形態では、Ｃ１８アルケニルは、Ｃ９とＣ１０との間に１つの二重結合を有するＣ１８アルケニルである。いくつかの実施形態では、Ｃ１８アルケニルは、シス－９－オクタデシルである。

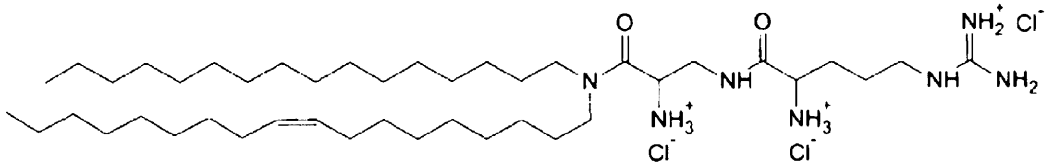
【０４８３】

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式Ｘの化合物である：



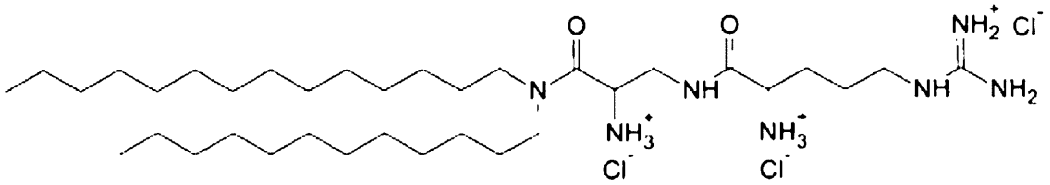
（式Ｘ）。

いくつかの実施形態では、Ｙ$^{-}$は、ハロゲニド、酢酸塩、及びトリフルオロ酢酸塩から選択される。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式ＩＩＩの－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－ｎ－パルミチル－Ｎ－オレイル－アミド三塩酸塩である：



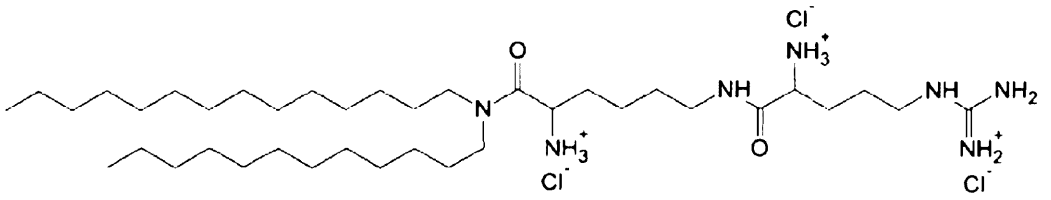
（式ＩＩＩ）。

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式ＩＶの－アルギニル－２，３－ジアミノプロピオン酸－Ｎ－ラウリル－Ｎ－ミリスチル－アミド三塩酸塩である。



（式ＩＶ）。

いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、式Ｖの－アルギニル－リシン－Ｎ－ラウリル－Ｎ－ミリスチル－アミド三塩酸塩である。



（式Ｖ）。

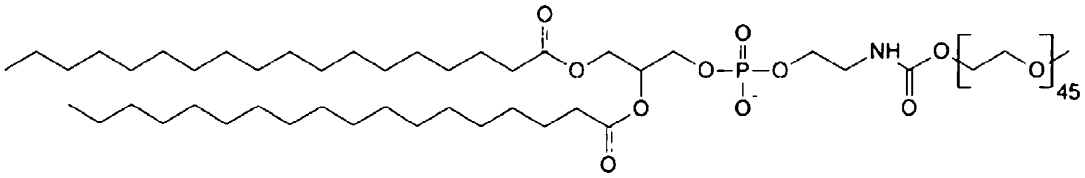
【０４８４】

いくつかの実施形態では、ステロール化合物はコレステロールである。いくつかの実施形態では、ステロール化合物は、スチグマステリンである。

【０４８５】

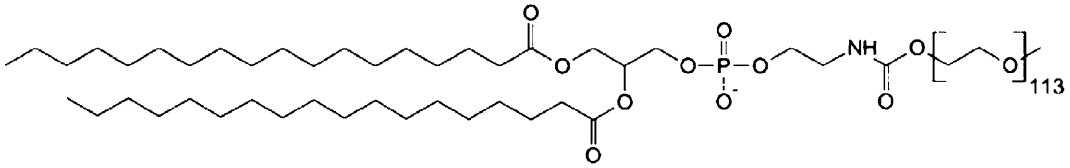
いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質のＰＥＧ部分は、約８００～５，０００Ｄａの分子量を有する。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質のＰＥＧ部分の分子量は、約８００Ｄａである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質のＰＥＧ部分の分子量は、約２，０００Ｄａである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質のＰＥＧ部分の分子量は、約５，０００Ｄａである。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質は式ＶＩＩのＰＥＧ化ホスホエタノールアミンであり、Ｒ^{3}及びＲ^{4}の各々は個々にかつ独立して直鎖Ｃ１３～Ｃ１７アルキルであり、ｐは１８、１９もしくは２０からの、または４４、４５もしくは４６または１１３からの、１１４もしくは１１５からの任意の整数である。いくつかの実施形態では、Ｒ^{3}及びＲ^{4}は同じである。いくつかの実施形態では、Ｒ^{3}及びＲ^{4}は異なる。いくつかの実施形態では、Ｒ^{3}及びＲ^{4}の各々は、Ｃ１３アルキル、Ｃ１５アルキル、及びＣ１７アルキルからなる群から個別にかつ独立して選択される。いくつかの実施形態では、式ＶＩＩのＰＥＧ化ホスホエタノールアミンは、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）

－２０００］（アンモニウム塩）である：



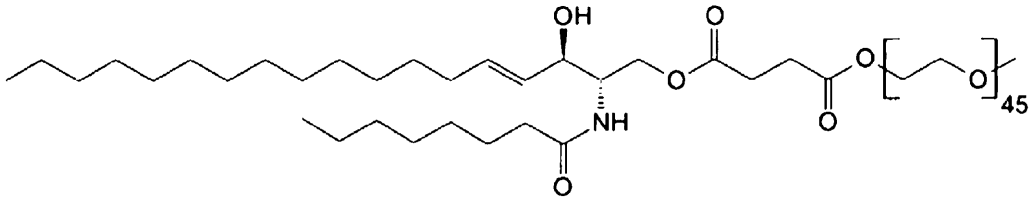
（式ＸＩ）。

いくつかの実施形態では、式ＶＩＩのＰＥＧ化ホスホエタノールアミンは、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン－Ｎ－［メトキシ（ポリエチレングリコール）－５０００］（アンモニウム塩）である：



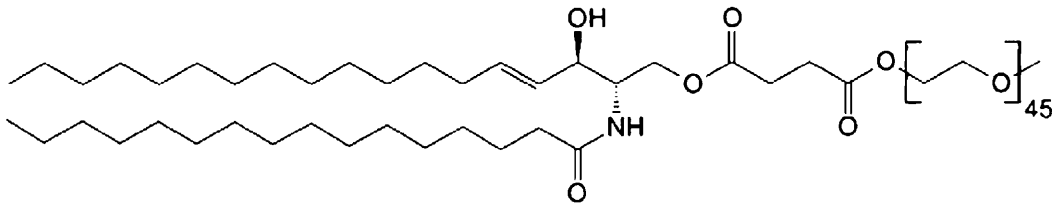
（式ＸＩＩ）。

いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質は式ＶＩＩＩのＰＥＧ化セラミドであり、R^5は直鎖Ｃ７～Ｃ１５アルキルであり、ｑは１８、１９、もしくは２０からの、または４４、４５、もしくは４６からの、または１１３、１１４、もしくは１１５からの任意の整数である。いくつかの実施形態では、R^5は直鎖Ｃ７アルキルである。いくつかの実施形態では、R^5は直鎖Ｃ１５アルキルである。いくつかの実施形態では、式ＶＩＩＩのＰＥＧ化セラミドは、Ｎ－オクタノイル－スフィンゴシン－１－｛スクシニル［メトキシ（ポリエチレングリコール）２０００］｝である：



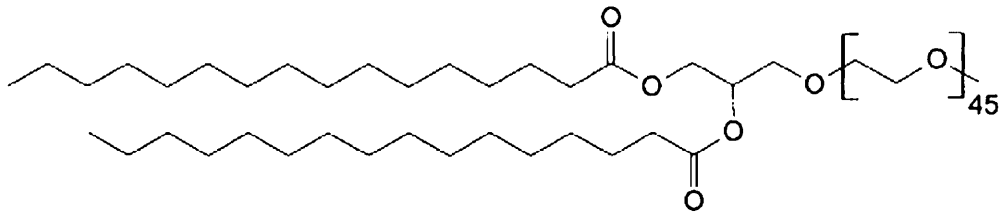
（式ＸＩＩＩ）。

いくつかの実施形態では、式ＶＩＩＩのＰＥＧ化セラミドは、Ｎ－パルミトイル－スフィンゴシン－１－｛スクシニル［メトキシ（ポリエチレングリコール）２０００］｝



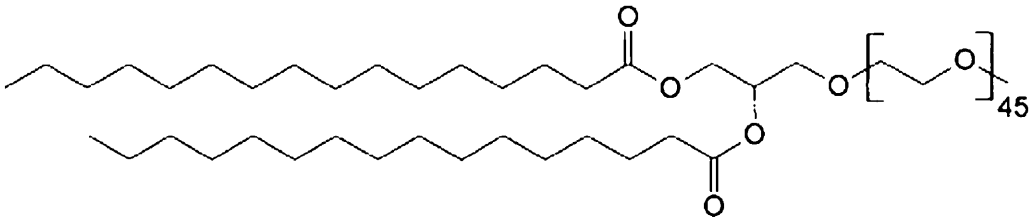
（式ＸＩＶ）

である。いくつかの実施形態では、ＰＥＧ化脂質は式ＩＸのＰＥＧ化ジアシルグリセロールであり、R^6及びR^7の各々は個々にかつ独立して直鎖Ｃ１１－Ｃ１７アルキルであり、ｒは１８、１９、もしくは２０からの、または４４、４５、もしくは４６からの、または１１３、１１４、もしくは１１５からの任意の整数である。いくつかの実施形態では、R^6及びR^7は同じである。いくつかの実施形態では、R^6及びR^7は異なる。いくつかの実施形態では、R^6及びR^7の各々は、直鎖Ｃ１７アルキル、直鎖Ｃ１５アルキル、及び直鎖Ｃ１３アルキルからなる群から個別にかつ独立して選択される。いくつかの実施形態では、式ＩＸのＰＥＧ化ジアシルグリセロールである１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロール［メトキシ（ポリエチレングリコール）２０００］：



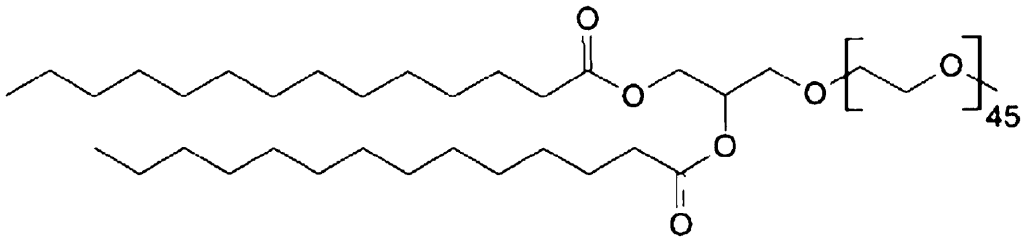
（式ＸＶ）。

いくつかの実施形態では、式ＩＸのＰＥＧ化ジアシルグリセロールは、１，２－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロール［メトキシ（ポリエチレングリコール）２０００］である：



（式ＸＶＩ）。

いくつかの実施形態では、式ＩＸのＰＥＧ化ジアシルグリセロールは、



（式ＸＶＩＩ）

である。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、式ＩＩＩ、ＩＶ、及びＶから選択される少なくとも１つのカチオン性脂質、コレステロール及びスチグマステリンから選択される少なくとも１つのステロール化合物を含み、ＰＥＧ化脂質は、式ＸＩ及びＸＩＩから選択される少なくとも１つである。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、式ＩＩＩ、ＩＶ、及びＶから選択される少なくとも１つのカチオン性脂質、コレステロール及びスチグマステリンから選択される少なくとも１つのステロール化合物を含み、ＰＥＧ化脂質は、式ＸＩＩ及びＸＩＶから選択される少なくとも１つである。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、式ＩＩＩ、ＩＶ、及びＶから選択される少なくとも１つのカチオン性脂質、コレステロール及びスチグマステリンから選択される少なくとも１つのステロール化合物を含み、ＰＥＧ化脂質は、式ＸＶ及びＸＶＩから選択される少なくとも１つである。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、式ＩＩＩのカチオン性脂質、ステロール化合物としてのコレステロールを含み、ＰＥＧ化脂質は式ＸＩである。

【０４８６】

前項におけるＬＮＰ実施形態のいずれかでは、カチオン性脂質組成物の含有量が約６５モル％～７５モル％であり、ステロール化合物の含有量が約２４モル％～３４モル％であり、ＰＥＧ化脂質の含有量が約０．５モル％～１．５モル％であり、脂質組成物に対するステロール化合物及びＰＥＧ化脂質のカチオン性脂質の合計が、１００モル％である、前項のＬＮＰ実施形態のいずれかである。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は約７０モル％であり、ステロール化合物の含有量は約２９モル％であり、ＰＥＧ化脂質の含有量は約１モル％である。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、式ＩＩＩの７０モル％、コレステロールの２９モル％、及び式ＸＩの１モル％である。

エクソソーム

【０４８７】

エクソソームは、ＲＮＡ及びタンパク質を輸送し、ＲＮＡを脳及び他の標的器官に送達することができる内因性ナノ小胞である。免疫原性を低減させるために、Ａｌｖａｒｅｚ

－Ｅｒｖｉｔｉ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２９：３４１）は、エクソソーム産生のための自己由来樹状細胞を使用した。脳への標的化は、樹状細胞を操作して、ニューロン特異的ＲＶＧペプチドに融合したエクソソーム膜タンパク質であるＬａｍｐ２ｂを発現させることによって達成された。精製されたエクソソームは、電気穿孔によって外因性ＲＮＡを負荷された。静脈内注射されたＲＶＧ標的化エクソソームは、脳においてニューロン、ミクログリア、オリゴデンドロサイトに特異的にＧＡＰＤＨ　ｓｉＲＮＡを送達し、特異的遺伝子ノックダウンをもたらした。ＲＶＧエクソソームへの事前暴露はノックダウンを減衰させず、他の組織における非特異的取り込みは観察されなかった。エクソソーム媒介性ｓｉＲＮＡ送達の治療電位は、アルツハイマー病における治療標的であるＢＡＣＥ１の強力なｍＲＮＡ（６０％）及びタンパク質（６２％）ノックダウンによって示された。

【０４８８】

免疫学的に不活性なエクソソームのプールを得るために、Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ　ｅｔ　ａｌ．は、均質な主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）ハプロタイプを有する近交Ｃ５７ＢＬ／６マウスから骨髄を収集した。未成熟樹状細胞は、ＭＨＣ－ＩＩ及びＣＤ８６のようなＴ細胞活性化因子を欠く大量のエクソソームを産生するため、Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ　ｅｔ　ａｌ．は、７ｄについての顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）を有する樹状細胞について選択した。エクソソームは、確立された超遠心分離プロトコルを使用して、翌日培養上清から精製された。産生されたエクソソームは物理的に均一であり、ナノ粒子トラッキング解析（ＮＴＡ）によって決定されたサイズ分布は直径８０ｎｍで最大に達した。Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ　ｅｔ　ａｌ．は、１０６の細胞当たり６～１２μｇのエクソソーム（タンパク質濃度に基づき測定された）を得た。

【０４８９】

次に、Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ　ｅｔ　ａｌ．は、ナノスケール用途に適合した電気穿孔プロトコルを使用して、修飾されたエクソソームを外因性カーゴに負荷する可能性を調査した。ナノメートル規模での膜粒子の電気穿孔が十分に特徴付けられていないため、電気穿孔プロトコルの経験的最適化のために、非特異的Ｃｙ５標識ＲＮＡが使用された。超遠心分離及びエクソソームの溶解後に、封入されたＲＮＡの量がアッセイされた。４００Ｖ及び１２５μＦでの電気穿孔は、ＲＮＡの最大の保持をもたらし、全てのその後の実験のために使用された。

【０４９０】

Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ　ｅｔ　ａｌ．は、１５０μｇのＲＶＧエクソソームに封入された１５０μｇの各ＢＡＣＥ１　ｓｉＲＮＡを正常なＣ５７ＢＬ／６マウスに投与し、ノックダウン効率を４つの対照と比較した：未処理マウス、ＲＶＧエクソソームのみを注射したマウス、インビボカチオン性リポソーム試薬に組み合わされたＢＡＣＥ１　ｓｉＲＮＡを注射されたマウス、及びＲＶＧ－９Ｒに組み合わされたＢＡＣＥ１　ｓｉＲＮＡを注射されたマウス、ｓｉＲＮＡに静電気的に結合する９つのＤ－アルギニンにコンジュゲートされたＲＶＧペプチド。皮質組織試料は投与の３ｄ後に分析され、ＢＡＣＥ１ｍＲＮＡレベルにおける有意な減少（それぞれ、６６％［＋または－］１５％、Ｐ＜０．００１及び６１％［＋または－］１３％、Ｐ＜０．０１）に由来するｓｉＲＮＡ－ＲＶＧ－９Ｒ処理及びｓｉＲＮＡＲＶＧエクソソーム処理マウスの両方における有意なタンパク質ノックダウン（４５％、Ｐ＜０．０５、対６２％、Ｐ＜０．０１）が観察された。そのうえ、出願人は、ＲＶＧエクソソーム処理動物において、アルツハイマー病理学におけるアミロイドプラークの主要成分である総［ベータ］アミロイド１～４２レベルにおける有意な減少（５５％、Ｐ＜０．０５）を示した。観察された減少は、ＢＡＣＥ１阻害剤の脳室内注射後の正常マウスにおいて示されたβ－アミロイド１～４０減少よりも大きかった。Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ　ｅｔ　ａｌ．は、ＢＡＣＥ１切断産物に対するｃＤＮＡ末端の５’－ラピッド増幅（ＲＡＣＥ）を行い、ｓｉＲＮＡによるＲＮＡｉ媒介性ノックダウンの証拠を提供した。

【０４９１】
最後に、Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．は、ＩＬ－６、ＩＰ－１０、ＴＮＦα、及びＩＦＮ－α血清濃度を評価することによって、ＲＮＡ－ＲＶＧエクソソームがインビボで免疫応答を誘導したかどうかを調査した。エクソソーム処理後、全てのサイトカインにおける有意でない変化は、ＩＬ－６分泌を強力に刺激したｓｉＲＮＡ－ＲＶＧ－９Ｒとは対照的に、ｓｉＲＮＡトランスフェクション試薬処理と同様に登録され、エクソソーム処理の免疫学的に不活性なプロファイルを確認した。エクソソームがｓｉＲＮＡの２０％のみを封入することを考えると、ＲＶＧ－エクソソームでの送達は、同等のｍＲＮＡノックダウン及びより大きなタンパク質ノックダウンが対応する免疫刺激なしに5倍少ないｓｉＲＮＡで達成されたため、ＲＶＧ－９Ｒ送達よりも効率的であるようである。この実験は、神経変性疾患に関連する遺伝子の長期的サイレンシングに潜在的に適するＲＶＧ－エクソソーム技術の治療可能性を示した。Ａｌｖａｒｅｚ－Ｅｒｖｉｔｉ ｅｔ ａｌ．のエクソソーム送達システムは、本発明のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムを治療標的、特に神経変性疾患に送達するために適用され得る。約１００～１０００ｍｇのＲＶＧエクソソームに封入された約１００～１０００ｍｇのＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの投薬が、本発明のために企図され得る。

【０４９２】
Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ ｅｔ ａｌ．（Ｎａｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ７，２１１２－２１２６（２０１２））は、培養細胞に由来するエクソソームがインビトロ及びインビボでのＲＮＡの送達のためにどのように利用され得るかを開示する。このプロトコルは、まず、ペプチドリガンドと融合したエクソソームタンパク質を含む発現ベクターのトランスフェクションを通じた標的化されたエクソソームの生成を説明する。次に、Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ ｅｔ ａｌ．は、トランスフェクトされた細胞上清からエクソソームをどのように精製し特徴付けるかを説明する。次に、Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ ｅｔ ａｌ．は、ＲＮＡをエクソソームに負荷するための重要なステップを詳細に説明する。最後に、Ｅｌ－Ａｎｄａｌｏｕｓｓｉ ｅｔ ａｌ．は、マウス脳内でＲＮＡを効率的にインビトロ及びインビボで送達するためにエクソソームを使用する方法を概説する。エクソソーム媒介性ＲＮＡ送達が機能アッセイ及び画像診断によって評価される予想される結果の例も、提供される。プロトコル全体は約３週間かかる。本発明に従う送達または投与は、自己由来の樹状細胞から産生されるエクソソームを使用して実行され得る。本明細書の教示から、これは、本発明の実施に採用され得る。

【０４９３】
別の実施形態では、Ｗａｈｌｇｒｅｎ ｅｔ ａｌ．（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１２，Ｖｏｌ．４０，Ｎｏ．１７ ｅ１３０）の細胞質エクソソームが企図される。エクソソームは、樹状細胞（ＤＣ）、Ｂ細胞、Ｔ細胞、肥満細胞、上皮細胞及び腫瘍細胞を含む多くの細胞型によって産生されるナノサイズの小胞（３０～９０ｎｍのサイズ）である。これらの小胞は、後期エンドソームの内部発芽によって形成され、その後、形質膜との融合時に細胞外環境に放出される。エクソソームは細胞間でＲＮＡを自然に運ぶため、この性質は遺伝子治療に有用であり得、本開示からは本発明の実施に採用され得る。

【０４９４】
血漿由来のエクソソームは、血漿を単離するために９００ｇで２０分間バフィーコートを遠心分離し、続いて細胞上清を収集し、細胞を排除するために３００ｇで１０分間、そして１６５００ｇで３０分間遠心分離し、続いて０．２２ｍｍフィルタを通して濾過することによって調製され得る。エクソソームは、１２００００ｇで７０分間の超遠心分離によってペレット化される。ｓｉＲＮＡのエクソソームへの化学的トランスフェクションは、ＲＮＡｉ Ｈｕｍａｎ／Ｍｏｕｓｅ Ｓｔａｒｔｅｒ Ｋｉｔ（Ｑｕｉａｇｅｎ，Ｈｉｌｄｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）の製造元の指示書に従って行われる。ｓｉＲＮＡは、２ｍｍｏｌ／ｍｌの最終濃度で１００ｍｌのＰＢＳに添加される。ＨｉＰｅｒＦｅｃｔトランスフェクション試薬を添加した後、混合物は室温で１０分間インキュベートされる。過剰な

ミセルを除去するために、エクソソームは、アルデヒド／硫酸ラテックスビーズを使用して再単離される。ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓのエクソソームへの化学的トランスフェクションは、ｓｉＲＮＡと同様に実施され得る。エクソソームは、健常なドナーの末梢血から単球及びリンパ球と共培養され得る。したがって、ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓを含有するエクソソームが、ヒトの単球及びリンパ球に導入され、ヒトに自己再導入され得ることが企図され得る。したがって、本発明に従う送達または投与は、血漿エクソソームを使用して実行され得る。

【０４９５】

リポソーム

本発明に従う送達または投与は、リポソームで実施され得る。リポソームは、内部水性区画を囲む単層または多層脂質二重層と、比較的不透過性の外部親油性リン脂質二重層とからなる球状小胞構造である。リポソームは、生体適合性であり、無毒であり、親水性及び親油性の薬物分子の両方を送達し、血漿酵素による分解からそれらのカーゴを保護し、それらの負荷を生物学的膜及び血液脳関門（ＢＢＢ）を越えて輸送することができるため、薬物送達担体としてかなりの注目を集めている（レビューについて、例えば、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照されたい）。

【０４９６】

リポソームはいくつかの異なる型の脂質から作製されるが、リン脂質は最も一般的に薬物担体としてリポソームを生成するために使用される。脂質フィルムが水溶液と混合される際、リポソーム形成は自発的であるが、ホモジナイザ、超音波破砕装置、または押出装置を使用することによって、振盪するする形態で力を加えることによっても促進され得る（レビューについて、例えば、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照されたい）。

【０４９７】

いくつかの他の添加物は、それらの構造及び特性を修飾するためにリポソームに添加され得る。例えば、コレステロールまたはスフィンゴミエリンのいずれかは、リポソーム構造を安定化するのに役立ち、リポソームの内部カーゴの漏洩を防止するためリポソーム混合物に添加され得る。さらに、リポソームは、水素化卵ホスファチジルコリンまたは卵ホスファチジルコリン、コレステロール、及びリン酸ジセチルから調製され、それらの平均小胞サイズは、約５０及び１００ｎｍに調整された（レビューについて、例えば、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照されたい）。

【０４９８】

リポソーム製剤は、主に、１，２－ジステアロリル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、スフィンゴミエリン、卵ホスファチジルコリン、及びモノシアロガングリオシドのような天然リン脂質及び脂質から構成され得る。この製剤はリン脂質のみからなるため、リポソーム製剤は多くの課題に遭遇しており、その一つが血漿における不安定性である。これらの課題を克服するいくつかの試みが、具体的には脂質膜の操作において、なされている。これらの試みの１つは、コレステロールの操作に焦点を当てた。従来の製剤へのコレステロールの添加は封入された生物活性化合物の血漿中への急速な放出を低減するか、または１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）は安定性を高める（レビューについて、例えば、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照されたい）。

【０４９９】
特に有利な実施形態では、Ｔｒｏｊａｎ Ｈｏｒｓｅリポソーム（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｒｏｊａｎ Ｈｏｒｓｅとしても知られる）が望ましく、ｈｔｔｐ：／／ｃｓｈｐｒｏｔｏｃｏｌｓ．ｃｓｈｌｐ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／２０１０／４／ｐｄｂ．ｐｒｏｔ５４０７．ｌｏｎｇで発見され得る。これらの粒子は、血管内注射後に導入遺伝子を脳全体へ送達することを可能にする。限定によって束縛されることなく、表面にコンジュゲートされた特異的抗体を有する中性脂質粒子は、エンドサイトーシスを介して血液脳関門を横断することを可能にすることが考えられる。Ｔｒｏｊａｎ Ｈｏｒｓｅ Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓは、血管内注射を介してヌクレアーゼのＣＲＩＳＰＲファミリーを脳に送達するために使用され得、胚操作を必要とせずに全脳トランスジェニック動物を可能にする。約１～５ｇのＤＮＡまたはＲＮＡは、リポソームにおけるインビボ投与のために企図され得る。

【０５００】
別の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓシステムまたはその成分は、安定核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）のようなリポソームに投与され得る（例えば、Ｍｏｒｒｉｓｓｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２３，Ｎｏ．８，Ａｕｇｕｓｔ ２００５を参照されたい）。ＳＮＡＬＰにおいて標的化される特定のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの約１、３、または５ｍｇ／ｋｇ／日の毎日の静脈内注射が企図される。毎日の処理は約３日間超であり、その後約５週間毎週であり得る。別の実施形態では、約１または２．５ｍｇ／ｋｇの用量で静脈内注射によって投与される特定のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ封入ＳＮＡＬＰ）も企図される（例えば、Ｚｉｍｍｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｌｅｔｔｅｒｓ，Ｖｏｌ．４４１，４ Ｍａｙ ２００６を参照されたい）。ＳＮＡＬＰ製剤は、脂質３－Ｎ－［（ｗメトキシポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－１，２－ジミリスチルオキシ－プロピルアミン（ＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシ－Ｎ、Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）及びコレステロールを、２：４０：１０：４８モルパーセント比で含有することができる（例えば、Ｚｉｍｍｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｌｅｔｔｅｒｓ，Ｖｏｌ．４４１，４ Ｍａｙ ２００６を参照されたい）。

【０５０１】
別の実施形態では、安定核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）は、非常に血管形成したＨｅｐＧ２由来肝臓腫瘍に対して有効な送達分子であるが、不十分に血管形成したＨＣＴ－１１６由来肝臓腫瘍においては有効でないことが証明している（Ｌｉ，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ（２０１２）１９，７７５－７８０を参照されたい）。ＳＮＡＬＰリポソームは、２５：１の脂質／ｓｉＲＮＡ比及び４８／４０／１０／２のモル比のコレステロール／Ｄ－Ｌｉｎ－ＤＭＡ／ＤＳＰＣ／ＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡを使用して、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、コレステロール及びｓｉＲＮＡでＤ－Ｌｉｎ－ＤＭＡ及びＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡを製剤化することによって調製され得る。得られたＳＮＡＬＰリポソームは、約８０～１００ｎｍのサイズである。

【０５０２】
さらに別の実施形態では、ＳＮＡＬＰは、合成コレステロール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ，Ａｌａｂａｓｔｅｒ，ＡＬ，ＵＳＡ）、３－Ｎ－［（ｗ－メトキシポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－１，２－ジミレチルオキシプロピルアミン（ｄｉｍｙｒｅｓｔｙｌｏｘｙｐｒｏｐｙｌａｍｉｎｅ）、及びカチオン性１，２－ジリノレイルオキシ－３－Ｎ，Ｎジメチルアミノプロパンを含むことができる（例えば、Ｇｅｉｓｂｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ ２０１０；３７５：１８９６－９０５を参照されたい）。例えば、ボーラス静脈内注入として投与される用量当たり約２ｍｇ／ｋｇの総ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓの投薬が企図され得る。

【０５０３】

さらに別の実施形態では、ＳＮＡＬＰは、合成コレステロール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ、Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ　Ｉｎｃ．）、ＰＥＧ－ｃＤＭＡ、及び１，２－ジリノレイルオキシ－３－（Ｎ；Ｎ－ジメチル）アミノプロパン（ＤＬｉＮＤＭＡ）を含むことができる（例えば、Ｊｕｄｇｅ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１９：６６１－６７３（２００９）を参照されたい）。インビボ試験に使用される製剤は、約９：１の最終脂質／ＲＮＡ質量比を含むことができる。

【０５０４】

ＲＮＡｉナノ医薬品の安全性プロファイルは、Ａｌｎｙｌａｍ　ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＢａｒｒｏｓ　ａｎｄ　Ｇｏｌｌｏｂによってレビューされている（例えば、Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　６４（２０１２）１７３０－１７３７を参照されたい）。安定核酸脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）は、低ｐＨでカチオン性であるイオン化可能な脂質（ＤＬｉｎＤＭＡ）、中性ヘルパー脂質、コレステロール、及び拡散性ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）脂質である４つの異なる脂質からなる。粒子は直径約８０ｎｍであり、生理学的ｐＨで電荷中性である。製剤化中、イオン化可能な脂質は、粒子形成中に脂質をアニオン性ＲＮＡと縮合させるよう役立つ。ますます酸性化したエンドソーム条件下で正荷電される際、イオン化可能な脂質は、ＳＮＡＬＰとエンドソーム膜との融合も媒介し、細胞質へのＲＮＡの放出を可能にする。ＰＥＧ－脂質は、製剤化中に粒子を安定させて凝集を低減し、その後、薬物動態特性を向上させる中性親水性外側を提供する。

【０５０５】

これまで、２つの臨床プログラムがＲＮＡを有するＳＮＡＬＰ製剤を使用して開始されている。Ｔｅｋｍｉｒａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓは最近、上昇したＬＤＬコレステロールを有する成人ボランティアにおけるＳＮＡＬＰ－ＡｐｏＢの第Ｉ相単回用量研究を完了した。ＡｐｏＢは、主に肝臓及び空腸で発現され、ＶＬＤＬ及びＬＤＬの組み立て及び分泌に必須である。１７名の対象は、ＳＮＡＬＰ－ＡｐｏＢの単回用量を受けた（７用量レベルにわたる用量漸増）。肝臓毒性の証拠はなかった（臨床前研究に基づく潜在的な用量制限毒性として予想される）。最高用量で対象１名（２名のうち）が、免疫システム刺激と一致したインフルエンザ様症状を経験し、試験を終了する決定がなされた。

【０５０６】

Ａｌｎｙｌａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓは、上記に記載のＳＮＡＬＰ技術を採用し、ＴＴＲアミロイドーシス（ＡＴＴＲ）を治療するために変異体型及び野生型ＴＴＲの両方の肝細胞産生を標的化する、同様に高度なＡＬＮ－ＴＴＲ０１を有する。ＡＴＴＲ症候群は説明されており、家族性アミロイドポリニューロパチー（ＦＡＰ）及び家族性アミロイド心筋症（ＦＡＣ）－両方ともＴＴＲにおける常染色体優性変異により引き起こされ、野生型ＴＴＲによる老人性全身性アミロイドーシス（ＳＳＡ）原因である。ＡＬＮ－ＴＴＲ０１のプラセボ対照単回用量漸増第Ｉ相試験は、最近、ＡＴＴＲを有する患者において完了された。ＡＬＮ－ＴＴＲ０１は、０．０１～１．０ｍｇ／ｋｇ（ｓｉＲＮＡに基づく）の用量範囲内で３１名の患者（試験薬物で２３名、プラセボで８名）に１５分のＩＶ注入として投与された。肝機能試験における有意な増加はなく、治療は十分に耐容性を示した。点滴関連反応は２３名の患者のうち３名において０．４ｍｇ／ｋｇ以上で認められ、全員が注入速度の低下に応答し、全員が試験を継続した。血清サイトカインＩＬ－６、ＩＰ－１０、及びＩＬ－１ｒａの最小及び一過性の上昇は、１ｍｇ／ｋｇの最高用量（臨床前及びＮＨＰ研究から予想される）で２名の患者において認められた。ＡＬＮ－ＴＴＲ０１の期待される薬物力学効果である血清ＴＴＲの低下が１ｍｇ／ｋｇで観察された。

【０５０７】

さらに別の実施形態では、ＳＮＡＬＰは、例えば、エタノールにおいて、例えば、それぞれ４０：１０：４０：１０のモル比でカチオン性脂質、ＤＳＰＣ、コレステロール及びＰＥＧ－脂質を可溶化させることによって作製され得る（Ｓｅｍｐｌｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｎｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ　２８　Ｎｕｍｂｅｒ　２

Ｆｅｂｒｕａｒｙ ２０１０，ｐｐ．１７２－１７７を参照されたい）。脂質混合物は、水性緩衝液（５０ｍＭクエン酸、ｐＨ４）に添加され、押出前にそれぞれ３０％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）及び６．１ｍｇ／ｍｌの最終エタノール及び脂質濃度まで混合され、２２℃で２分間平衡された。水和脂質は、動的光散乱分析によって決定されるように、７０～９０ｎｍの小胞直径が得られるまで、Ｌｉｐｅｘ Ｅｘｔｒｕｄｅｒ（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｌｉｐｉｄｓ）を使用して、２２℃で２つの積み重ねられた８０ｎｍ孔径フィルタ（Ｎｕｃｌｅｐｏｒｅ）を通して押出された。このことは、一般に１～３回の通過を必要とした。ｓｉＲＮＡ（３０％エタノールを含有する５０ｍＭのクエン酸、ｐＨ４水溶液中で可溶化された）は、混合しながら約５ｍｌ／分の速度で事前平衡化した（３５℃）小胞に添加された。最終的な標的ｓｉＲＮＡ／脂質比である０．０６（ｗｔ／ｗｔ）に達した後、混合物は、ｓｉＲＮＡの小胞再編成及び封入を可能にするために３５℃でさらに３０分間インキュベートされた。次いで、エタノールは除去され、外部緩衝液は透析またはタンジェンシャルフローダイアフィルトレーション（ｔａｎｇｅｎｔｉａｌ ｆｌｏｗ ｄｉａｆｉｌｔｒａｔｉｏｎ）のいずれかによってＰＢＳ（１５５ｍＭ ＮａＣｌ、３ｍＭ Ｎａ２ＨＰＯ４、１ｍＭ ＫＨ２ＰＯ４、ｐＨ７．５）で置き換えられた。ｓｉＲＮＡは、制御された段階的希釈法プロセスを使用してＳＮＡＬＰに封入された。ＫＣ２－ＳＮＡＬＰの脂質成分は、５７．１：７．１：３４．３：１．４のモル比で使用されたＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ（カチオン性脂質）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ、Ａｖａｎｔｉ Ｐｏｌａｒ Ｌｉｐｉｄｓ）、合成コレステロール（Ｓｉｇｍａ）及びＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡであった。負荷された粒子の形成時に、ＳＮＡＬＰは、使用前にＰＢＳに対して透析され、０．２μｍのフィルタを通して滅菌された。平均粒径は７５～８５ｎｍであり、ｓｉＲＮＡの９０～９５％は脂質粒子内に封入された。インビボ試験に使用される製剤における最終ｓｉＲＮＡ／脂質比は、約０．１５（ｗｔ／ｗｔ）であった。第ＶＩＩ因子ｓｉＲＮＡを含有するＬＮＰ－ｓｉＲＮＡシステムは、使用直前に滅菌ＰＢＳにおいて適切な濃度まで希釈され、製剤は１０ｍｌ／ｋｇの総体積で側尾静脈を通して静脈内投与された。この方法及びこれらの送達システムは、本発明のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓシステムに外挿され得る。

【０５０８】

他の脂質

アミノ脂質２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）のような他のカチオン性脂質は、ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓまたはその成分、またはそれらについてコードする、例えば、ＳｉＲＮＡと同様の核酸分子（複数可）を封入するために利用され得（例えば、Ｊａｙａｒａｍａｎ，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．２０１２，５１，８５２９－８５３３を参照されたい）、したがって、本発明の実施において採用され得る。以下の脂質組成物を有する前形成された小胞が企図され、それぞれ、モル比４０／１０／４０／１０及び約０．０５（ｗ／ｗ）のＦＶＩＩ ｓｉＲＮＡ／総脂質比で、アミノ脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、コレステロール及び（Ｒ）－２，３－ビス（オクタデシルオキシ）プロピル－１－（メトキシポリ（エチレングリコール）２０００）プロピルカルバメート（ＰＥＧ－脂質）である。７０～９０ｎｍの範囲における狭い粒子サイズ分布及び０．１１＋０．０４（ｎ＝５６）の低い多分散性指標を確実にするために、粒子は、ガイドＲＮＡを添加する前に８０ｎｍ膜を通して３回押出され得る。強力なアミノ脂質１６を含有する粒子が使用され得、インビボ活性を増強するためにさらに最適化され得る４つの脂質成分１６、ＤＳＰＣ、コレステロール及びＰＥＧ－脂質のモル比（５０／１０／３８．５／１．５）。

【０５０９】

Ｍｉｃｈａｅｌ Ｓ Ｄ Ｋｏｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．（”Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ａｆｔｅｒ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｍＲＮＡ ｉｎ ｍｉｃｅ：Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ：２９，Ｐａｇｅｓ：１５４－１５７（

２０１１））は、ＲＮＡを送達するための脂質エンベロープの使用を説明する。脂質エンベロープの使用は、本発明においても好ましい。

【０５１０】

別の実施形態では、脂質は、本発明のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓシステムまたはその成分（複数可）またはそれらについてコードする核酸分子（複数可）で製剤化され、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を形成することができる。脂質は、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ４、Ｃ１２－２００、及びコリピド（ｃｏｌｉｐｉｄ）ジステロイルホスファチジルコリンを含むがこれらに限定されず、コレステロール、及びＰＥＧ－ＤＭＧは、自発的小胞形成手順を使用して、ｓｉＲＮＡの代わりにＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓで製剤化され得る（例えば、Ｎｏｖｏｂｒａｎｔｓｅｖａ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ－Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ（２０１２）１，ｅ４；ｄｏｉ：１０．１０３８／ｍｔｎａ．２０１１．３を参照されたい）。成分モル比は、約５０／１０／３８．５／１．５（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡまたはＣ１２－２００／ジステロイルホスファチジルコリン／コレステロール／ＰＥＧ－ＤＭＧ）であり得る。最終脂質：ｓｉＲＮＡ重量比は、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ及びＣ１２－２００脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の場合、それぞれ約１２：１及び９：１であり得る。製剤は、９０％超の捕捉効率で約８０ｎｍの平均粒子直径を有することができる。３ｍｇ／ｋｇ用量が、企図され得る。

【０５１１】

Ｔｅｋｍｉｒａは、ＬＮＰ及びＬＮＰ製剤の様々な態様へ導かれた米国内及び国外においておよそ９５の特許ファミリーのポートフォリオを有し（例えば、米国特許第７，９８２，０２７号、同第７，７９９，５６５号、同第８，０５８，０６９号、同第８，２８３，３３３号、同第７，９０１，７０８号、同第７，７４５，６５１号、同第７，８０３，３９７号、同第８，１０１，７４１号、同第８，１８８，２６３号、同第７，９１５，３９９号、同第８，２３６，９４３号及び同第７，８３８，６５８号ならびに欧州特許第１７６６０３５号、同第１５１９７１４号、同第１７８１５９３号及び同第１６６４３１６号を参照されたい）、これらの全てが本発明に使用及び／または適合され得る。

【０５１２】

ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓシステもまたはその成分またはそれらについてコードする核酸は、タンパク質、タンパク質前駆体、またはタンパク質もしくはタンパク質前駆体の部分的もしくは完全に処理された形態をコードすることができる修正された核酸分子を含む組成物の製剤の態様に関する米国公開出願第２０１３０２５２２８１号及び同第２０１３０２４５１０７号及び同第２０１３０２４４２７９号（Ｍｏｄｅｒｎａ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓに譲渡された」）においてさらに説明されるように、ＰＬＧＡ Ｍｉｃｒｏｓｐｈｅｒｅｓに封入されて送達され得る。製剤は、モル比５０：１０：３８．５：１．５～３．０（カチオン性脂質：膜融合性脂質：コレステロール：ＰＥＧ脂質）を有することができる。ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ、ＰＥＧ－ＤＭＧから選択され得るが、これらに限定されない。膜融合性脂質は、ＤＳＰＣであり得る。Ｓｃｈｒｕｍ ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ａｎｄ Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ、米国公開出願第２０１２０２５１６１８号も参照されたい。

【０５１３】

ナノマー（ｎａｎｏｍｅｒｉｃ）の技術は、低分子量疎水性薬物、ペプチド、及び核酸ベースの治療薬（プラスミド、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ）を含む広範囲の治療薬のバイオアベイラビリティの課題に対処する。技術が明確な利点を示した具体的な投与経路は、経口経路、血液脳関門を越える輸送、目と同様に固形腫瘍への送達を含む。例えば、Ｍａｚｚａ ｅｔ ａｌ．，２０１３，ＡＣＳ Ｎａｎｏ．２０１３ Ｆｅｂ ２６；７（２）：１０１６－２６、Ｕｃｈｅｇｂｕ ａｎｄ Ｓｉｅｗ，２０１３，Ｊ Ｐｈａｒｍ Ｓｃｉ．１０２（２）：３０５－１０及びＬａｌａｔｓａ ｅｔ ａｌ．，２０１２，Ｊ Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌｅａｓｅ．２０１２ Ｊｕｌ ２０；１６１（２）：５２３－３６を参照されたい。

【０５１４】
米国特許公開第２００５００１９９２３号は、ポリヌクレオチド分子、ペプチド及びポリペプチド及び／または薬学的薬剤のような生物活性分子を哺乳動物体に送達するためのカチオン性デンドリマーを説明する。デンドリマーは、例えば、肝臓、脾臓、肺、腎臓、または心臓（または脳さえ）への生物活性分子の送達を標的化するのに適する。デンドリマーは、単純な分岐モノマー単位から段階的に調製される合成三次元巨大分子であり、その性質及び機能は容易に制御され、様々である。デンドリマーは、多機能コアへの基本単位への（合成への発散アプローチ）、または多機能コアへの（合成への収束アプローチ）繰り返し添加から合成され、基本単位の三次元シェルの各々の添加は、より高い世代のデンドリマーの形成を引き起こす。ポリプロピレンイミンデンドリマーは、アクリロニトリルの一級アミンへの二重マイケル添加によって２倍の数のアミノ基が添加されニトリルの水素化が続く、ジアミノブタンコアから始まる。このことは、アミノ基が倍増させる。ポリプロピレンイミン（ｐｏｌｙｐｒｏｐｙｌｅｎｉｍｉｎｅ）デンドリマーは、１００％プロトン化可能な（ｐｒｏｔｏｎａｂｌｅ）窒素及び最大６４の末端アミノ基を含有する（第５世代、ＤＡＢ６４）。プロトン化可能な基は、通常、中性ｐＨで陽子を受け入れることができるアミン基である。遺伝子送達剤としてのデンドリマーの使用は、主にポリアミドアミンの使用に焦点を当ててきた。そして遺伝子送達のためのより低い世代のポリプロピレンイミドデンドリマーの使用に関して研究は報告されておらず、コンジュゲート化単位それぞれとしてアミン／アミドまたはＮ－－Ｐ（Ｏ２）Ｓの混合物を有するリン含有化合物。ポリプロピレンイミンデンドリマーは、末梢アミノ酸基によって化学的に修飾された際の薬物送達及びそれらのゲスト分子の封入のためのｐＨ感受性制御放出システムとしても研究されている。ＤＡＢ６４のトランスフェクション有効性と同様にポリプロピレンイミンデンドリマーとＤＮＡとの細胞毒性及び相互作用も研究されている。

【０５１５】
米国特許公開第２００５００１９９２３号は、先行報告とは反対に、ポリプロピレンイミンデンドリマーのようなカチオン性デンドリマーが、遺伝物質のような生物活性分子の標的化された送達における使用のための特異的標的化及び低毒性のような好適な特性を示すという観察に基づく。加えて、カチオン性デンドリマーの誘導体は、生物活性分子の標的化された送達に適した特性も示す。カチオン性ポリアミンポリマー及びデンドリマー型ポリマーを含む「様々なポリマーを開示するＢｉｏａｃｔｉｖｅ　Ｐｏｌｙｍｅｒｓ、米国公開出願第２００８０２６７９０３号は、抗増殖活性を有することが示され、したがって、新生物及び腫瘍、炎症性障害（自己免疫障害を含む）、乾癬及びアテローム性動脈硬化のような望ましくない細胞増殖により特徴付けられる障害の治療に有用であり得る。ポリマーは、遺伝子療法のための薬物分子または核酸のような、活性化剤として、または他の治療薬剤のための送達ビヒクルとして使用され得る。かかる場合では、ポリマー自身の固有の抗腫瘍活性は、送達される薬剤の活性を補完することができる。」これらの特許公開の開示は、本明細書におけるＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓシステム（複数可）またはその成分（複数可）またはそれについてコードする核酸分子（複数可）の送達のための教示と併せて採用され得る。

【０５１６】
超荷電タンパク質
超荷電タンパク質は、異常に高い正または負の正味理論電荷を有する操作されたまたは天然型のタンパク質のクラスであり、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓシステム（複数可）またはその成分（複数可）またはそれについてコードする核酸分子（複数可）の送達に採用され得る。超負荷電タンパク質及び超正荷電タンパク質の両方は、熱的または化学的に誘導される凝集に耐える顕著な能力を示す。超正荷電タンパク質は、哺乳動物細胞に透過することもできる。カーゴをプラスミドＤＮＡ、ＲＮＡ、または他のタンパク質のようなこれらのタンパク質と関連付けることは、インビトロ及びインビボの両方でこれらの巨大分子の哺乳動物細胞への機能的送達を可能にすることができる。超荷電タンパク質の作製及び特徴付けは、２００７年に報告されている（Ｌａｗｒｅｎｃｅ　ｅｔ　ａｌ．，２

００７，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ １２９，１０１１０－１０１１２）。

【０５１７】

ＲＮＡ及びプラスミドＤＮＡの哺乳動物細胞への非ウイルス送達は、研究及び治療用途の両方について貴重である（Ａｋｉｎｃ ｅｔ ａｌ．，２０１０，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２６，５６１－５６９）。精製された＋３６ＧＦＰタンパク質（または他の超荷電タンパク質）は、適切な血清フリー培地においてＲＮＡと混合され、細胞への添加前に組み合わせることを可能にされる。この段階での血清の封入は、超荷電タンパク質－ＲＮＡ複合体の形成を阻害し、治療の有効性を低減させる。以下のプロトコルは、様々な細胞株に有効であることが発見されている（ＭｃＮａｕｇｈｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０６，６１１１－６１１６）（しかしながら、特定の細胞株の手順を最適化するために、タンパク質及びＲＮＡの用量を変えるパイロット実験が、実行されるべきである）。（１）処理の１日前に、４８ウェルプレートにおいてウェル当たり１×１０５個の細胞を蒔く。（２）治療当日に、血清フリーの培地において精製された＋３６ＧＦＰタンパク質を最終濃度２００ｎＭに希釈する。ＲＮＡを最終濃度５０ｎＭまで添加する。ボルテックスして混合し、１０分間室温でインキュベートする。（３）インキュベーション中、細胞から培地を吸引し、ＰＢＳで１回洗浄する。（４）＋３６ＧＦＰ及びＲＮＡのインキュベーション後、タンパク質－ＲＮＡ複合体を細胞に添加する。（５）３７℃で複合体を有する細胞を４時間インキュベートする。（６）インキュベーション後、培地を吸引し、２０Ｕ／ｍＬのヘパリンＰＢＳで３回洗浄する。活性のアッセイに応じて、血清含有培地でさらに４８時間以上細胞をインキュベートする。（７）免疫ブロット、ｑＰＣＲ、表現型アッセイ、またはその他の適切な方法で細胞を分析する。

【０５１８】

＋３６ＧＦＰが様々な細胞において有効なプラスミド送達試薬であることがさらに発見されている。プラスミドＤＮＡはｓｉＲＮＡよりも大きなカーゴであるため、比例してさらに＋３６ＧＦＰタンパク質がプラスミドを効果的に組み合わせるために必要とされる。有効なプラスミド送達のために、出願人は、インフルエンザウイルスヘマグルチニンタンパク質に由来する既知のエンドソーム破壊ペプチドであるＣ末端ＨＡ２ペプチドタグを有する＋３６ＧＦｐのバリアントを開発した。以下のプロトコルは、様々な細胞において有効であったが、上記のように、プラスミドＤＮＡ及び超荷電タンパク質用量は、特定の細胞株及び送達用途のために最適化されることが勧告される。（１）処理の１日前、４８ウェルプレート内においてウェル当たりプレート１×１０５を蒔く。（２）処理当日に、血清フリーの培地においてｐ３６ＧＦＰタンパク質を最終濃度２ｍＭに希釈する。１ｍｇのプラスミドＤＮＡを添加する。ボルテックスして混合し、１０分間室温でインキュベートする。（３）インキュベーション中、細胞から培地を吸引し、ＰＢＳで１回洗浄する。（４）ｐ３６ＧＦＰ及びプラスミドＤＮＡのインキュベーション後、細胞にタンパク質－ＤＮＡ複合体を穏やかに添加する。（５）４時間３７℃で複合体を有する細胞をインキュベートする。（６）インキュベーション後、培地を吸引し、ＰＢＳで洗浄する。血清含有培地において細胞をインキュベートし、さらに２４～４８時間インキュベートする。（７）プラスミド送達（例えば、プラスミド駆動遺伝子発現による）を適宜分析する。

【０５１９】

例えば、ＭｃＮａｕｇｈｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０６，６１１１－６１１６（２００９）、Ｃｒｏｎｉｃａｎ ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ５，７４７－７５２（２０１０）、Ｃｒｏｎｉｃａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ＆Ｂｉｏｌｏｇｙ １８，８３３－８３８（２０１１）、Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ５０３，２９３－３１９（２０１２）、Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，Ｄ．Ｂ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ＆Ｂｉｏｌｏｇｙ １９（７），８３１－８４３（２０１２）を参照されたい。超荷電タンパク質の方法は、本発明のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ

Ｃａｓシステムの送達のために使用及び／または適合され得る。これらのシステムは、本明細書における教示と併せて、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓシステム（複数可）またはその成分（複数可）、またはそれについてコードする核酸分子（複数可）の送達に採用され得る。

【０５２０】

細胞膜透過ペプチド（ＣＰＰ）

さらに別の実施形態では、細胞膜透過ペプチド（ＣＰＰ）は、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓシステムの送達のために企図される。ＣＰＰは、様々な分子カーゴ（ナノサイズ粒子から小化学分子及びＤＮＡの大きな断片まで）の細胞取り込みを促進する短いペプチドである。本明細書で使用される用語「カーゴ」は、治療薬剤、診断プローブ、ペプチド、核酸、アンチセンスオリゴヌクレオチド、プラスミド、タンパク質、ナノ粒子を含む粒子、リポソーム、発色団、小分子、及び放射性物質からなる群を含むが、これらに限定されない。本発明の態様では、カーゴは、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓシステムまたは ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓシステム全体の任意の成分を含むこともできる。本発明の態様は、（ａ）本発明の細胞膜透過ペプチド及び所望のカーゴを含む複合体を調製することと、（ｂ）複合体を対象に経口、関節内、腹腔内、髄腔内、動脈内、鼻腔内、実質内、皮下、筋肉内、静脈内、皮膚、直腸内、または局所的に投与することと、を含む、対象に所望のカーゴを送達する方法をさらに提供する。カーゴは、共有結合を介した化学結合または非共有結合相互作用のいずれかを通じてペプチドと会合する。

【０５２１】

ＣＰＰの機能は、細胞内にカーゴを送達することであり、生きている哺乳動物細胞のエンドソームに送達されるカーゴと共にエンドサイトーシスを通じて一般的に起こるプロセスである。細胞膜透過ペプチドは、異なるサイズ、アミノ酸配列、及び電荷であるが、全てのＣＰＰは、形質膜を転位させ細胞質またはオルガネラへの様々な分子カーゴの送達を促進する能力である、１つの明確な特徴を有する。ＣＰＰ転位は、膜における直接透過、エンドサイトーシス媒介性侵入、及び一過性構造の形成を通じた転位である３つの主な侵入機構に分類され得る。ＣＰＰは、細胞標識のための造影剤と同様に、がん及びウイルス阻害剤を含む異なる疾患の治療における薬物送達剤として医学における多くの用途を発見した。後者の例は、ＧＦＰ、ＭＲＩ造影剤、または量子ドットのための担体として作用することを含む。ＣＰＰは、研究及び医学における使用のためのインビトロ及びインビボ送達ベクターのように大きな可能性を有する。ＣＰＰは、典型的には、リシンまたはアルギニンのような正荷電アミノ酸の高い相対的存在量を含有するか、または極性／荷電アミノ酸及び非極性疎水性アミノ酸の交互パターンを含有する配列を有するいずれかのアミノ酸組成物を有する。これらの２つの型の構造は、それぞれ、ポリカチオン性または両親媒性と呼ばれる。ＣＰＰの第３のクラスは、無極性残基のみを含有し、低正味電荷を有するか、または細胞取り込みに重要な疎水性アミノ酸基を有する疎水性ペプチドである。最初に発見されたＣＰＰの１つは、培養物における多数の細胞型によって周囲の培地から効率的に取り込まれることが発見された、ヒト免疫不全ウイルス１（ＨＩＶ－１）由来のトランス活性化転写活性化因子（Ｔａｔ）である。それ以降、既知のＣＰＰの数はかなり拡大し、より有効なタンパク質導入特性を有する低分子合成類似体が生成されている。ＣＰＰは、Ｐｅｎｅｔｒａｔｉｎ、Ｔａｔ（４８～６０）、Ｔｒａｎｓｐｏｒｔａｎ、及び（Ｒ－ＡｈＸ－Ｒ４）（Ａｈｘ＝アミノヘキサノイル）を含むが、これらに限定されない。

【０５２２】

米国特許第８，３７２，９５１号は、高細胞透過効率及び低毒性を示す好酸球カチオン性タンパク質（ＥＣＰ）に由来するＣＰＰを提供する。ＣＰＰをそのカーゴと共に脊椎動物対象に送達する態様も、提供される。ＣＰＰ及びそれらの送達のさらなる態様は、米国特許第８，５７５，３０５号、第８号、第６１４，１９４号及び第８，０４４，０１９号に説明される。ＣＰＰは、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムまたはその成分を送達するために使用され得る。ＣＰＰがＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムまたはその成分を送達することができることは、その全体が参照により組み込まれる原稿Ｓｕｒｅ

ｓｈ Ｒａｍａｋｒｉｓｈｎａ，Ａｂｕ－Ｂｏｎｓｒａｈ Ｋｗａｋｕ Ｄａｄ，Ｊａｇａｄｉｓｈ Ｂｅｌｏｏｒ，ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．２０１４ Ａｐｒ ２による「Ｇｅｎｅ ｄｉｓｒｕｐｔｉｏｎ ｂｙ ｃｅｌｌ－ｐｅｎｅｔｒａｔｉｎｇ ｐｅｐｔｉｄｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ Ｃａｓ９ ｐｒｏｔｅｉｎ ａｎｄ ｇｕｉｄｅ ＲＮＡ」においても提供され、ＣＰＰコンジュゲート組換えＣａｓ９タンパク質及びＣＰＰ複合体ガイドＲＮＡによる処理が、ヒト細胞株における内因性遺伝子破壊を引き起こすことが実証される。論文ではＣａｓ９タンパク質がチオエーテル結合を介してＣＰＰにコンジュゲートされ、一方でガイドＲＮＡがＣＰＰと組み合わされ、縮合した正荷電粒子を形成した。修飾されたＣａｓ９及びガイドＲＮＡでの、胚性幹細胞、皮膚線維芽細胞、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＨｅＬａ細胞、及び胚癌腫細胞を含むヒト細胞の同時及び順次処理が、プラスミドトランスフェクションに対して低減したオフターゲット変異を伴う効率的な遺伝子破壊を引き起こすことが示された。

【０５２３】

エアロゾル送達

肺疾患について治療された対象は、例えば、自発的に呼吸しながら気管支内的に送達されることによって薬学的に有効な量のエアロゾル化ＡＡＶベクターシステムを受けることができる。そこで、エアロゾル化送達は、一般にＡＡＶ送達について好ましい。アデノウイルスまたはＡＡＶ粒子は、送達に使用され得る。各々が１つ以上の調節配列に動作可能に連結された好適な遺伝子構築物は、送達ベクターにクローン化され得る。

【０５２４】

パッケージング及びプロモーター

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及びアデノシンデアミナーゼコード核酸分子発現を駆動するために使用されるプロモーターは、プロモーターとして役立つことができるＡＡＶ ＩＴＲを含むことができる。このことは、追加的なプロモーターエレメント（ベクトルにおける空間を占めることができる）の必要性を排除するために有利である。解放された追加的な空間は、追加的なエレメント（ｇＲＮＡなど）の発現を駆動するために使用され得る。また、ＩＴＲ活性は比較的より弱く、Ｃａｓ１３の過剰発現による潜在的毒性を低減するために使用され得る。

【０５２５】

ユビキタスな発現のために、使用され得るプロモーターは、ＣＭＶ、ＣＡＧ、ＣＢｈ、ＰＧＫ、ＳＶ４０、フェリチン重鎖または軽鎖などを含む。脳または他のＣＮＳ発現については、ＳｙｎａｐｓｉｎＩは全てのニューロンに対して使用され得、ＣａＭＫＩＩａｌｐｈａは興奮性ニューロンに対して使用され得、ＧＡＤ６７またはＧＡＤ６５またはＶＧＡＴはＧＡＢＡｅｒｇｉｃニューロンに対して使用され得る。肝臓発現については、アルブミンプロモーターが使用され得る。肺発現については、ＳＰ－Ｂが使用され得る。内皮細胞については、ＩＣＡＭが使用され得る。造血細胞については、ＩＦＮベータまたはＣＤ４５が使用され得る。骨芽細胞については、ＯＧ－２が使用され得る。

【０５２６】

ガイドＲＮＡを駆動するために使用されるプロモーターは、Ｕ６またはＨ１のようなＰｏｌ ＩＩＩプロモーター、同様にＰｏｌ ＩＩプロモーター及びガイドＲＮＡを発現するためのイントロンカセットの使用を含むことができる。

【０５２７】

アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、アデノシンデアミナーゼ、及び１つ以上のガイドＲＮＡは、アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）、レンチウイルス、アデノウイルス、または他のプラスミドもしくはウイルスベクタータイプを使用して、特に、例えば、米国特許第８，４５４，９７２号（製剤、アデノウイルスに対する用量）、第８，４０４，６５８号（製剤、ＡＡＶに対する用量）及び第５，８４６，９４６号（製剤、ＤＮＡプラスミドに対する用量）からの、ならびにレンチウイルス、ＡＡＶ及びアデノウイルスを伴う臨床試験に関する臨床試験及び刊行物からの製剤及び用量を使用して送達され得る。例えば、アデノ

ウイルスについて、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第８，４５４，９７２号における通りであり、ＡＡＶを伴う臨床試験における通りであり得る。アデノウイルスについて、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第８，４０４，６５８号における通りであり、アデノウイルスを伴う臨床試験における通りであり得る。プラスミド送達の場合について、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第５，８４６，９４６号における通りであり、プラスミドを伴う臨床研究における通りであり得る。用量は、平均７０ｋｇの個体（例えば、男性成人ヒト）に基づくか、または外挿され得、患者、対象、異なる体重及び種の哺乳動物について調整され得る。投与の頻度は、年齢、性別、全身の健康を含む因子、患者または対象の他の状態、及び対処される特定の状態または症状を含む通常の要因に応じて、医学または獣医学の開業医（例えば、医師、獣医師）の範囲内にある。ウイルスベクターは、目的の組織に注射され得る。細胞型特異的ゲノム修飾について、Ｃａｓ１３及びアデノシンデアミナーゼの発現は、細胞型特異的プロモーターによって駆動され得る。例えば、肝臓特異的発現は、アルブミンプロモーターを使用することができ、ニューロン特異的発現（例えば、ＣＮＳ障害を標的化するため）は、Ｓｙｎａｐｓｉｎ　Ｉプロモーターを使用することができる。

【０５２８】

インビボ送達の点では、ＡＡＶは、低毒性（このことは、免疫応答を活性化することができる細胞粒子の超遠心分離を必要としない精製方法に起因し得る）、及び宿主ゲノムに統合しないため挿入変異誘発を引き起こす低い可能性といういくつかの理由で、他のウイルスベクターよりも有利である。

【０５２９】

ＡＡＶは、４．５または４．７５Ｋｂのパッケージング限界を有する。このことは、プロモーター及び転写ターミネーターと同様にＣａｓ１３が全て同じウイルスベクターに適合しなければならないことを意味する。４．５または４．７５Ｋｂを超える構築物は、有意に低減したウイルス産生を引き起こす。ＳｐＣａｓ９はかなり大きく、遺伝子自体は４．１Ｋｂを超えており、ＡＡＶに詰め込むことが困難である。したがって、本発明の実施形態は、より短いＣａｓ１３のホモログを利用することを含む。

【０５３０】

ＡＡＶに関して、ＡＡＶは、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５またはこれらの任意の組み合わせであり得る。標的化される細胞に関してＡＡＶのＡＡＶを選択することができ、例えば、脳または神経細胞を標的とするためのＡＡＶ血清型１、２、５、またはハイブリッドキャプシドＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ５またはこれらの任意の組み合わせを選択することができ、心臓組織を標的とするためのＡＡＶ４を選択することができる。ＡＡＶ８は、肝臓への送達に有用である。本明細書におけるプロモーター及びベクターは、個別に好ましい。これらの細胞に関するある特定のＡＡＶ血清型の作表（Ｇｒｉｍｍ，Ｄ．ｅｔａｌ，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．８２：５８８７－５９１１（２００８）を参照されたい）は、以下の通りである。

細胞株	ＡＡＶ－１	ＡＡＶ－２	ＡＡＶ－３	ＡＡＶ－４	ＡＡＶ－５	ＡＡＶ－６	ＡＡＶ－８	ＡＡＶ－９
Ｈｕｈ－７	１３	１００	２．５	０．０	０．１	１０	０．７	０．０
ＨＥＫ２９３	２５	１００	２．５	０．１	０．１	５	０．７	０．１
ＨｅＬａ	３	１００	２．０	０．１	６．７	１	０．２	０．１
ＨｅｐＧ２	３	１００	１６．７	０．３	１．７	５	０．３	ＮＤ
Ｈｅｐ１Ａ	２０	１００	０．２	１．０	０．１	１	０．２	０．０
９１１	１７	１００	１１	０．２	０．１	１７	０．１	ＮＤ
ＣＨＯ	１００	１００	１４	１．４	３３３	５０	１０	１．０
ＣＯＳ	３３	１００	３３	３．３	５．０	１４	２．０	０．５
ＭｅＷｏ	１０	１００	２０	０．３	６．７	１０	１．０	０．２
ＮＩＨ３Ｔ３	１０	１００	２．９	２．９	０．３	１０	０．３	ＮＤ
Ａ５４９	１４	１００	２０	ＮＤ	０．５	１０	０．５	０．１
ＨＴ１１８０	２０	１００	１０	０．１	０．３	３３	０．５	０．１
単球	１１１１	１００	ＮＤ	ＮＤ	１２５	１４２９	ＮＤ	ＮＤ
未熟ＤＣ	２５００	１００	ＮＤ	ＮＤ	２２２	２８５７	ＮＤ	ＮＤ
成熟ＤＣ	２２２２	１００	ＮＤ	ＮＤ	３３３	３３３３	ＮＤ	ＮＤ

【０５３１】

レンチウイルス

レンチウイルスは、有糸分裂及び有糸分裂後の細胞の両方においてそれらの感染し遺伝子を発現する能力を有する複雑なレトロウイルスである。最も一般的に知られているレンチウイルスは、他のウイルスのエンベロープ糖タンパク質を使用して広範囲の細胞型を標的化するヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）である。

【０５３２】

レンチウイルスは、以下のように調製され得る。ＰＣａＳＥＳ１０（レンチウイルス転移プラスミド骨格を含有する）をクローニングした後、低継代でのＨＥＫ２９３ＦＴ（ｐ＝５）を、１０％の胎児ウシ血清を有し抗生物質を有しないＤＭＥＭにおけるトランスフェクションの前日にＴ－７５ラスコにおいて５０％のコンフルエンスに播種した。２０時間後、培地をＯｐｔｉＭＥＭ（血清フリー）培地に変更し、４時間後にトランスフェクションを行った。細胞を１０μｇのレンチウイルス転移プラスミド（ｐＣａＳＥＳ１０）及び以下のパッケージングプラスミド、５μｇのｐＭＤ２．Ｇ（ＶＳＶ－ｇ擬似型）、及び７．５ｕｇのｐｓＰＡＸ２（ｇａｇ／ｐｏｌ／ｒｅｖ／ｔａｔ）でトランスフェクトした。４ｍＬのＯｐｔｉＭＥＭにおいて、カチオン性脂質送達剤（５０ｕＬのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００及び１００ｕｌのＰｌｕｓ試薬）でトランスフェクションを行った。６時間後、培地を１０％の胎児ウシ血清を有する抗生物質フリーのＤＭＥＭに変更した。これらの方法は細胞培養中に血清を使用するが、血清フリーの方法が好ましい。

【０５３３】

レンチウイルスは、以下のように精製され得る。４８時間後にウイルス上清を採取した。まず上清を破片から除去し、０．４５ｕｍの低タンパク質結合（ＰＶＤＦ）フィルタを通して濾過した。次いで２時間２４，０００ｒｐｍで超遠心分離器において回転させた。ウイルスペレットを４℃で一晩５０ｕｌのＤＭＥＭにおいて再懸濁した。次いで、それらを等分し、－８０℃で即座に冷凍した。

【０５３４】

別の実施形態では、ウマ伝染性貧血ウイルス（ＥＩＡＶ）に基づく最小の非霊長類レンチウイルスベクターも、特に眼遺伝子治療について企図される（例えば、Ｂａｌａｇａａｎ，Ｊ　Ｇｅｎｅ　Ｍｅｄ　２００６；８：２７５－２８５を参照されたい）。別の実施形態では、加齢黄斑変性症の網形態の治療のために網膜下注射を介して送達される血管新生タンパク質エンドスタチン及びアンジオスタチンを発現するウマ伝染性貧血ウイルスベースのレンチウイルス遺伝子療法ベクターであるＲｅｔｉｎｏＳｔａｔ（登録商標）も企図され（例えば、Ｂｉｎｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，ＨＵＭＡＮ　ＧＥＮＥ　ＴＨＥＲＡＰＹ

２３：９８０－９９１（Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ ２０１２）を参照されたい）、このベクターは本発明のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムのために修飾され得る。

【０５３５】

別の実施形態では、ＨＩＶ ｔａｔ／ｒｅｖ、核小体局在化ＴＡＲデコイ、及び抗ＣＣＲ５特異的ハンマーヘッド型リボザイム（例えば、ＤｉＧｉｕｓｔｏ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ ２：３６ｒａ４３を参照されたい）により共有された共通のエクソンを標的とするＳｉＲＮＡを伴う自己不活性型のレンチウィルスベクターは、本発明のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムに使用及び／または適合され得る。キログラム患者当たり２．５×１０６のＣＤ３４＋細胞の最小値は、回収され得、２×１０６細胞／ｍｌで２μｍｏｌ／Ｌ－グルタミンを含有するＸ－ＶＩＶＯ １５培地（Ｌｏｎｚａ）、幹細胞因子（１００ｎｇ／ｍｌ）、Ｆｌｔ－３リガンド（Ｆｌｔ－３Ｌ）（１００ｎｇ／ｍｌ）、及びトロンボポエチン（１０ｎｇ／ｍｌ）（ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ）において１６～２０時間前刺激され得る。前刺激された細胞は、フィブロネクチン（２５ｍｇ／ｃｍ2）（ＲｅｔｒｏＮｅｃｔｉｎ，Ｔａｋａｒａ Ｂｉｏ Ｉｎｃ．）で被覆された７５ｃｍ2の組織培養フラスコにおいて１６～２４時間、５の感染多重度でレンチウイルスで形質導入され得る。

【０５３６】

レンチウイルスベクターはパーキンソン病のための治療におけるように開示されており、例えば、米国特許公開第２０１２０２９５９６０号及び米国特許第７３０３９１０号及び第７３５１５８５号を参照されたい。レンチウイルスベクターは眼疾患の治療のためにも開示されており、例えば、米国特許公開第２００６０２８１１８０号、第２００９００７２８４号、第ＵＳ２０１１０１１７１８９号、第ＵＳ２００９００１７５４３号、第ＵＳ２００７００５４９６１号、第ＵＳ２０１００３１７１０９号を参照されたい。レンチウイルスベクターは脳への送達のためにも開示されており、例えば、米国特許公開第ＵＳ２０１１０２９３５７１号、第ＵＳ２０１１０２９３５７１号、第ＵＳ２００４００１３６４８号、第ＵＳ２００７００２５９７０号、第ＵＳ２００９０１１１１０６号及び米国特許第ＵＳ７２５９０１５号を参照されたい。

【０５３７】

非動物生物における用途

ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム（複数可）（例えば、単一または多重）は、作物ゲノム科学における最近の進歩と併せて使用され得る。本明細書に記載のシステムは、例えば、植物遺伝子またはゲノムの迅速な調査（ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ）及び／または選択及び／または調査（ｉｎｔｅｒｒｏｇａｔｉｏｎ）及び／または比較及び／または操作及び／または変換のために、効率的かつ費用対効果の高い植物遺伝子もしくはゲノムの調査（ｉｎｔｅｒｒｏｇａｔｉｏｎ）もしくは編集もしくは操作を実行するために、例えば、植物（複数可）もしくは植物ゲノムに形質（複数可）もしくは特徴（複数可）を作成、識別、開発、最適化もしくは付与するために使用され得る。したがって植物、形質もしくは特徴の新しい組み合わせを有する新しい植物、または増強された形質を有する新しい植物の向上した生産があり得る。ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、部位特異的統合（ＳＤＩ）または遺伝子編集（ＧＥ）または任意の近逆育種（ｎｅａｒ Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｂｒｅｅｄｉｎｇ、ＮＲＢ）または逆育種（ＲＢ）技術において植物に関して使用され得る。本明細書に記載のＣａｓ１３エフェクタータンパク質システムを利用する態様は、植物におけるＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９）システムの使用と類似することができ、言及はＵｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ａｒｉｚｏｎａウェブサイト「ＣＲＩＳＰＲ－Ｐｌａｎｔ」（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｏｍｅ．ａｒｉｚｏｎａ．ｅｄｕ／ｃｒｉｓｐｒ／）（Ｐｅｎｎ Ｓｔａｔｅ及びＡＧＩによって支援される）についてなされる。本発明の実施形態は、植物におけるゲノム編集またはＲＮＡｉもしくは類似のゲノム編集技術が以前に使用されている場所において使用され得、例えば、Ｎｅｋｒａｓｏｖ，“Ｐｌａｎｔ ｇｅｎｏｍｅ ｅｄｉｔｉｎｇ ｍａｄｅ ｅａｓｙ：ｔａｒｇｅｔｅｄ ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｉｎ ｍｏｄｅｌ ａｎｄ ｃｒｏｐ ｐｌａｎ

ts using the CRISPR－Cas system,”Plant Methods 2013,9：39（doi：10.1186／1746－4811－9－39）、Brooks,“Efficient gene editing in tomato in the first generation using the CRISPR－Cas9 system,”Plant Physiology September 2014 pp 114.247577、Shan,“Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR－Cas system,”Nature Biotechnology 31,686－688（2013）、Feng,“Efficient genome editing in plants using a CRISPR－Cas system,”Cell Research（2013）23：1229－1232.doi：10.1038／cr.2013.114；published online 20 August 2013、Xie,“RNA－guided genome editing in plants using a CRISPR－Cas system,”Mol Plant.2013 Nov；6（6）：1975－83.doi：10.1093／mp／sst119.Epub 2013 Aug 17、Xu,“Gene targeting using the Agrobacterium tumefaciens－mediated CRISPR－Cas system in rice,”Rice 2014,7：5（2014）、Zhou et al.,“Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial Populus reveals 4－coumarate：CoA ligase specificity and Redundancy,”New Phytologist（2015）（Forum）1－4（available online only at www.newphytologist.com）、Caliando et al,“Targeted DNA degradation using a CRISPR device stably carried in the host genome,NATURE COMMUNICATIONS 6：6989,DOI：10.1038／ncomms7989,www.nature.com／naturecommunications DOI：10.1038／ncomms7989、米国特許第6,603,061号－Agrobacterium－Mediated Plant Transformation Method、米国特許第7,868,149号－Plant Genome Sequences and Uses Thereof及び米国第2009／0100536号－Transgenic Plants with Enhanced Agronomic Traitsを参照されたく、それらの各々の内容及び開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本発明に実施では、本明細書の実施形態が植物に関してどれほど使用され得るかに関して含む、その各々が参照により本明細書に組み込まれるMorrell et al“Crop genomics：advances and applications,”Nat Rev Genet.2011 Dec 29；13（2）：85－96の内容及び開示。したがって、本明細書における動物細胞への言及はまた、別段明らかでない限り、植物細胞に準用することもでき、低減したオフターゲット効果を有する本明細書における酵素及びかかる酵素を採用するシステムは、本明細書に言及されるものを含む植物用途において使用され得る。

【0538】

AD官能化CRISPRシステムの植物及び酵母への適用

一般に、用語「植物」は、細胞分裂によって特徴的に成長し、クロロプラストを含有し、セルロースからなる細胞壁を有する、植物界の任意の様々な光合成生物、真核生物、単細胞または多細胞生物に関する。植物という用語は、単子葉及び双子葉植物を包含する。具体的には、植物は、アカシア、アルファルファ、アマランス、リンゴ、アプリコット、

アーティチョーク、トネリコの木、アスパラガス、アボカド、バナナ、オオムギ、豆、ビート、カバノキ、ブナ、ブラックベリー、ブルーベリー、ブロッコリー、芽キャベツ、キャノーラ、キャノーラ、マスクメロン、ニンジン、キャッサバ、カリフラワー、スギ、穀物、セロリ、クリ、チェリー、ハクサイ、柑橘類、クレメンタイン、クローバー、コーヒー、トウモロコシ（ｃｏｒｎ）、ワタ、ササゲ、キュウリ、サイプレス、ナス、ニレ、エンダイブ、ユーカリ、フェンネル、イチジク、モミ、ゼラニウム、ブドウ、グレープフルーツ、ラッカセイ、グラウンドチェリー、ガムヘムロック、ヒッコリー、ケール、キウイフルーツ、コールラビ、カラマツ、レタス、リーキ、レモン、ライム、ハリエンジュ、マツ、クジャクシダ、トウモロコシ（ｍａｉｚｅ）、マンゴー、カエデ、メロン、雑穀、キノコ、マスタード、ナッツ、オーク、エンバク、アブラヤシ、オクラ、タマネギ、オレンジ、観葉植物または花または木、パパイヤ、ヤシ、パセリ、パースニップ、インゲンマメ、モモ、ピーナッツ、ナシ、ピート、コショウ、カキ、キマメ、マツ、パイナップル、プランテン、プラム、ザクロ、ジャガイモ、カボチャ（ｐｕｍｐｋｉｎ）、ラディッキオ、ラディッシュ、ナタネ、ラズベリー、イネ、ライムギ、ソルガム、ベニバナ、ヤナギ、ダイズ、ホウレンソウ、トウヒ、カボチャ（ｓｑｕａｓｈ）、イチゴ、サトウキビ、サトウキビ、ヒマワリ、サツマイモ、スイートコーン、タンジェリン、茶、タバコ、トマト、木、ライコムギ、芝草、カブ、つる、クルミ、クレソン、スイカ、コムギ、ヤムイモ、イチイ、及びズッキーニのような被子植物及び裸子植物を含むが限定しないことが意図される。植物という用語は、高等植物を特徴付ける根、葉、及び他の器官のそれらの欠失により第１に統合される主に光独立栄養生物である藻類も包含する。

【０５３９】

本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを使用したゲノム編集方法は、本質的に任意の植物に所望の形質を付与するために使用され得る。多種多様な植物及び植物細胞システムは、本開示の核酸構築物及び上述の様々な形質転換方法を使用して、本明細書に記載される所望の生理学的及び農学的特徴について操作され得る。好ましい実施形態では、操作のための標的植物及び植物細胞は、穀物作物（例えば、コムギ、トウモロコシ、イネ、雑穀、オオムギ）、果実作物（例えば、トマト、リンゴ、ナシ、イチゴ、オレンジ）、飼料作物（例えば、アルファルファ）、根菜作物（例えば、ニンジン、ジャガイモ、テンサイ、ヤムイモ）、葉菜作物（例えば、レタス、ホウレンソウ）、開花植物（例えば、ペチュニア、バラ、キク）、針葉樹及びマツの木（例えば、マツモミ、トウヒ）、ファイトレメディエーションにおいて使用される植物（例えば、重金属蓄積植物）、油作物（例えば、ヒマワリ、アブラナ）、及び実験目的で使用される植物（例えば、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ）のようなこれらの単子葉及び双子葉植物を含むが、これらに限定されない。したがって、方法及びシステムは、例えば、目Ｍａｇｎｉｏｌａｌｅｓ、Ｉｌｌｉｃｉａｌｅｓ、Ｌａｕｒａｌｅｓ、Ｐｉｐｅｒａｌｅｓ、Ａｒｉｓｔｏｃｈｉａｌｅｓ、Ｎｙｍｐｈａｅａｌｅｓ、Ｒａｎｕｎｃｕｌａｌｅｓ、Ｐａｐｅｖｅｒａｌｅｓ、Ｓａｒｒａｃｅｎｉａｃｅａｅ、Ｔｒｏｃｈｏｄｅｎｄｒａｌｅｓ、Ｈａｍａｍｅｌｉｄａｌｅｓ、Ｅｕｃｏｍｉａｌｅｓ、Ｌｅｉｔｎｅｒｉａｌｅｓ、Ｍｙｒｉｃａｌｅｓ、Ｆａｇａｌｅｓ、Ｃａｓｕａｒｉｎａｌｅｓ、Ｃａｒｙｏｐｈｙｌｌａｌｅｓ、Ｂａｔａｌｅｓ、Ｐｏｌｙｇｏｎａｌｅｓ、Ｐｌｕｍｂａｇｉｎａｌｅｓ、Ｄｉｌｌｅｎｉａｌｅｓ、Ｔｈｅａｌｅｓ、Ｍａｌｖａｌｅｓ、Ｕｒｔｉｃａｌｅｓ、Ｌｅｃｙｔｈｉｄａｌｅｓ、Ｖｉｏｌａｌｅｓ、Ｓａｌｉｃａｌｅｓ、Ｃａｐｐａｒａｌｅｓ、Ｅｒｉｃａｌｅｓ、Ｄｉａｐｅｎｓａｌｅｓ、Ｅｂｅｎａｌｅｓ、Ｐｒｉｍｕｌａｌｅｓ、Ｒｏｓａｌｅｓ、Ｆａｂａｌｅｓ、Ｐｏｄｏｓｔｅｍａｌｅｓ、Ｈａｌｏｒａｇａｌｅｓ、Ｍｙｒｔａｌｅｓ、Ｃｏｒｎａｌｅｓ、Ｐｒｏｔｅａｌｅｓ、Ｓａｎ　ｔａｌｅｓ、Ｒａｆｆｌｅｓｉａｌｅｓ、Ｃｅｌａｓｔｒａｌｅｓ、Ｅｕｐｈｏｒｂｉａｌｅｓ、Ｒｈａｍｎａｌｅｓ、Ｓａｐｉｎｄａｌｅｓ、Ｊｕｇｌａｎｄａｌｅｓ、Ｇｅｒａｎｉａｌｅｓ、Ｐｏｌｙｇａｌａｌｅｓ、Ｕｍｂｅｌｌａｌｅｓ、Ｇｅｎｔｉａｎａｌｅｓ、Ｐｏｌｅｍｏｎｉａｌｅｓ、Ｌａｍｉａｌｅｓ、Ｐｌａｎｔａｇｉｎａｌｅｓ、Ｓｃｒｏｐｈｕｌａｒｉａｌｅｓ、Ｃａｍｐａｎｕｌａｌｅｓ、Ｒｕｂｉａｌｅｓ、Ｄｉｐｓａｃａｌｅｓ、及びＡｓｔｅｒａｌｅｓに属

する双子葉植物を有するような幅広い植物にわたって使用され得、方法及びＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、目Ａｌｉｓｍａｔａｌｅｓ、Ｈｙｄｒｏｃｈａｒｉｔａｌｅｓ、Ｎａｊａｄａｌｅｓ、Ｔｒｉｕｒｉｄａｌｅｓ、Ｃｏｍｍｅｌｉｎａｌｅｓ、Ｅｒｉｏｃａｕｌａｌｅｓ、Ｒｅｓｔｉｏｎａｌｅｓ、Ｐｏａｌｅｓ、Ｊｕｎｃａｌｅｓ、Ｃｙｐｅｒａｌｅｓ、Ｔｙｐｈａｌｅｓ、Ｂｒｏｍｅｌｉａｌｅｓ、Ｚｉｎｇｉｂｅｒａｌｅｓ、Ａｒｅｃａｌｅｓ、Ｃｙｃｌａｎｔｈａｌｅｓ、Ｐａｎｄａｎａｌｅｓ、Ａｒａｌｅｓ、Ｌｉｌｌｉａｌｅｓ、Ｏｒｃｈｉｄ　ａｌｅｓに属するもののような単子葉植物、またはＧｙｍｎｏｓｐｅｒｍａｅ、例えば、目Ｐｉｎａｌｅｓ、Ｇｉｎｋｇｏａｌｅｓ、Ｃｙｃａｄａｌｅｓ、Ａｒａｕｃａｒｉａｌｅｓ、Ｃｕｐｒｅｓｓａｌｅｓ及びＧｎｅｔａｌｅｓに属するもののような植物で使用され得る。

【０５４０】

ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム及び本明細書に記載の使用の方法は、下記、Ａｔｒｏｐａ、Ａｌｓｅｏｄａｐｈｎｅ、Ａｎａｃａｒｄｉｕｍ、Ａｒａｃｈｉｓ、Ｂｅｉｌｓｃｈｍｉｅｄｉａ、Ｂｒａｓｓｉｃａ、Ｃａｒｔｈａｍｕｓ、Ｃｏｃｃｕｌｕｓ、Ｃｒｏｔｏｎ、Ｃｕｃｕｍｉｓ、Ｃｉｔｒｕｓ、Ｃｉｔｒｕｌｌｕｓ、Ｃａｐｓｉｃｕｍ、Ｃａｔｈａｒａｎｔｈｕｓ、Ｃｏｃｏｓ、Ｃｏｆｆｅａ、Ｃｕｃｕｒｂｉｔａ、Ｄａｕｃｕｓ、Ｄｕｇｕｅｔｉａ、Ｅｓｃｈｓｃｈｏｌｚｉａ、Ｆｉｃｕｓ、Ｆｒａｇａｒｉａ、Ｇｌａｕｃｉｕｍ、Ｇｌｙｃｉｎｅ、Ｇｏｓｓｙｐｉｕｍ、Ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ、Ｈｅｖｅａ、Ｈｙｏｓｃｙａｍｕｓ、Ｌａｃｔｕｃａ、Ｌａｎｄｏｌｐｈｉａ、Ｌｉｎｕｍ、Ｌｉｔｓｅａ、Ｌｙｃｏｐｅｒｓｉｃｏｎ、Ｌｕｐｉｎｕｓ、Ｍａｎｉｈｏｔ、Ｍａｊｏｒａｎａ、Ｍａｌｕｓ、Ｍｅｄｉｃａｇｏ、Ｎｉｃｏｔｉａｎａ、Ｏｌｅａ、Ｐａｒｔｈｅｎｉｕｍ、Ｐａｐａｖｅｒ、Ｐｅｒｓｅａ、Ｐｈａｓｅｏｌｕｓ、Ｐｉｓｔａｃｉａ、Ｐｉｓｕｍ、Ｐｙｒｕｓ、Ｐｒｕｎｕｓ、Ｒａｐｈａｎｕｓ、Ｒｉｃｉｎｕｓ、Ｓｅｎｅｃｉｏ、Ｓｉｎｏｍｅｎｉｕｍ、Ｓｔｅｐｈａｎｉａ、Ｓｉｎａｐｉｓ、Ｓｏｌａｎｕｍ、Ｔｈｅｏｂｒｏｍａ、Ｔｒｉｆｏｌｉｕｍ、Ｔｒｉｇｏｎｅｌｌａ、Ｖｉｃｉａ、Ｖｉｎｃａ、Ｖｉｌｉｓ、及びＶｉｇｎａならびに属Ａｌｌｉｕｍ、Ａｎｄｒｏｐｏｇｏｎ、Ａｒａｇｒｏｓｔｉｓ、Ａｓｐａｒａｇｕｓ、Ａｖｅｎａ、Ｃｙｎｏｄｏｎ、Ｅｌａｅｉｓ、Ｆｅｓｔｕｃａ、Ｆｅｓｔｕｌｏｌｉｕｍ、Ｈｅｔｅｒｏｃａｌｌｉｓ、Ｈｏｒｄｅｕｍ、Ｌｅｍｎａ、Ｌｏｌｉｕｍ、Ｍｕｓａ、Ｏｒｙｚａ、Ｐａｎｉｃｕｍ、Ｐａｎｎｅｓｅｔｕｍ、Ｐｈｌｅｕｍ、Ｐｏａ、Ｓｅｃａｌｅ、Ｓｏｒｇｈｕｍ、Ｔｒｉｔｉｃｕｍ、Ｚｅａ、Ａｂｉｅｓ、Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍｉａ、Ｅｐｈｅｄｒａ、Ｐｉｃｅａ、Ｐｉｎｕｓ、及びＰｓｅｕｄｏｔｓｕｇａの双子葉類、単子葉類、裸子植物属の非限定的なリストに含まれる幅広い植物種にわたって使用され得る。

【０５４１】

ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム及び使用の方法は、原核生物門Ｃｙａｎｏｂａｃｔｅｒｉａ（藍藻）と同様に、Ｒｈｏｄｏｐｈｙｔａ（紅藻）、Ｃｈｌｏｒｏｐｈｙｔａ（緑藻）、Ｐｈａｅｏｐｈｙｔａ（褐藻）、Ｂａｃｉｌｌａｒｉｏｐｈｙｔａ（珪藻）、Ｅｕｓｔｉｇｍａｔｏｐｈｙｔａ及び渦鞭毛藻類を含むいくつかの真核生物門から選択される、例えば、藻類（ａｌｇｅａ）を含む、広範囲の「藻類（ａｌｇａｅ）」または「藻類細胞（ａｌｇａｅ　ｃｅｌｌｓ）」にわたっても使用され得る。用語「藻類」は、例えば、Ａｍｐｈｏｒａ、Ａｎａｂａｅｎａ、Ａｎｉｋｓｔｒｏｄｅｓｍｉｓ、Ｂｏｔｒｙｏｃｏｃｃｕｓ、Ｃｈａｅｔｏｃｅｒｏｓ、Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ、Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ、Ｃｈｌｏｒｏｃｏｃｃｕｍ、Ｃｙｃｌｏｔｅｌｌａ、Ｃｙｌｉｎｄｒｏｔｈｅｃａ、Ｄｕｎａｌｉｅｌｌａ、Ｅｍｉｌｉａｎａ、Ｅｕｇｌｅｎａ、Ｈｅｍａｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｉｓｏｃｈｒｙｓｉｓ、Ｍｏｎｏｃｈｒｙｓｉｓ、Ｍｏｎｏｒａｐｈｉｄｉｕｍ、Ｎａｎｎｏｃｈｌｏｒｉｓ、Ｎａｎｎｎｏｃｈｌｏｒｏｐｓｉｓ、Ｎａｖｉｃｕｌａ、Ｎｅｐｈｒｏｃｈｌｏｒｉｓ、Ｎｅｐｈｒｏｓｅｌｍｉｓ、Ｎｉｔｚｓｃｈｉａ、Ｎｏｄｕｌａｒｉａ、Ｎｏｓｔｏｃ、Ｏｏｃｈｒｏｍｏｎａｓ、Ｏｏｃｙｓｔｉｓ、Ｏｓｃｉｌｌａｒｔｏｒｉａ、Ｐａｖｌｏｖａ、Ｐｈａｅｏｄａｃｔｙｌｕｍ、Ｐｌａｙｔｍｏｎａｓ、Ｐｌｅｕｒｏｃｈｒｙｓｉｓ、Ｐｏｒｈｙｒａ、Ｐｓｅｕｄｏａｎａｂａｅｎａ、Ｐｙｒａｍ

ｉｍｏｎａｓ、Ｓｔｉｃｈｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓｙｎｅｃｈｏｃｙｓｔｉｓ、Ｔｅｔｒａｓｅｌｍｉｓ、Ｔｈａｌａｓｓｉｏｓｉｒａ、及びＴｒｉｃｈｏｄｅｓｍｉｕｍから選択される藻類を含む。

【０５４２】

植物の部分、すなわち、「植物組織」は、改良された植物を生産するために本発明の方法に従って処理され得る。植物組織は、植物細胞も包含する。本明細書で使用される用語「植物細胞」という用語は、無傷の植物全体におけるか、またはインビトロ組織培養物中、培地もしくは寒天上、成長培地もしくは緩衝液中の懸濁液中で成長した単離された形態におけるか、または例えば、植物組織、植物器官、もしくは植物全体のような、より高度に組織化されたユーナイト（ｕｎｉｔｅ）の一部としてのいずれかの生体植物の個々の単位を指す。

【０５４３】

「プロトプラスト」は、例えば、適切な成長条件下でそれらの細胞壁を再形成し、増殖し、かつ植物全体へと成長することができる生体植物の無傷の生物化学的成分単位をもたらす機械的または酵素的手段を使用して完全にまたは部分的に除去されたその保護細胞壁を有した植物細胞を指す。

【０５４４】

用語「形質転換」は、広義には、植物宿主がＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉａまたは様々な化学的もしくは物理的方法のうちの１つの手段によるＤＮＡの導入によって遺伝学的に修飾されるプロセスを指す。本明細書で使用される用語「植物宿主」は、植物の任意の細胞、組織、器官、または後代を含む植物を指す。多くの好適な植物組織または植物細胞は、形質転換され、プロトプラスト、体細胞胚、花粉、葉、実生、茎、カルス、走根、マイクロチューバー、及びシュートを含むことができるが、これらに限定されない。植物組織は、かかる植物、種子、後代、有性または無性に生成されるかに関わらず繁殖体、及び挿し木または種子のような、これらのいずれかの子孫の任意のクローンも指す。

【０５４５】

本明細書で使用される用語「形質転換された」は、構築物のような、外来ＤＮＡ分子が導入されている細胞、組織、器官、または生物を指す。導入されたＤＮＡ分子は、導入されたＤＮＡ分子がその後の後代に伝達されるように、レシピエント細胞、組織、器官、または生物のゲノムＤＮＡに組み込まれ得る。これらの実施形態では、「形質転換された」または「トランスジェニック」細胞または植物は、細胞または植物の後代、及び形質転換された植物を交雑における親として採用し、導入されたＤＮＡ分子の存在に起因する改変された表現型を示す育種プログラムから生産される後代も含むことができる。好ましくは、トランスジェニック植物は、稔性であり、導入されたＤＮＡを有性生殖を通じて後代に伝達することができる。

【０５４６】

トランスジェニック植物の後代のような用語「後代」は、植物またはトランスジェニック植物から生まれ、生じ、または由来するものである。導入されたＤＮＡ分子はまた、導入されたＤＮＡ分子がその後の後代に受け継がれず、したがって「トランスジェニック」と考えられないように、レシピエント細胞に一時的に導入され得る。したがって、本明細書で使用される場合、「非トランスジェニック」植物または植物細胞は、そのゲノムに安定して組み込まれた外来ＤＮＡを含有しない植物である。

【０５４７】

本明細書で使用される用語「植物プロモーター」は、その起源が植物細胞であるかどうかに関わらず、植物細胞において転写を開始することができるプロモーターである。例示的な好適な植物プロモーターは、植物、植物ウイルス、及び植物細胞において発現される遺伝子を含むＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍまたはＲｈｉｚｏｂｉｕｍのような細菌から得られるものを含むが、これらに限定されない。

【０５４８】

本明細書で使用される場合、「真菌細胞」は、真菌界内の任意の型の真核細胞を指す。

真菌界の門は、Ａｓｃｏｍｙｃｏｔａ、Ｂａｓｉｄｉｏｍｙｃｏｔａ、Ｂｌａｓｔｏｃｌａｄｉｏｍｙｃｏｔａ、Ｃｈｙｔｒｉｄｉｏｍｙｃｏｔａ、Ｇｌｏｍｅｒｏｍｙｃｏｔａ、Ｍｉｃｒｏｓｐｏｒｉｄｉａ、及びＮｅｏｃａｌｌｉｍａｓｔｉｇｏｍｙｃｏｔａを含む。真菌細胞は、酵母、カビ、糸状菌を含むことができる。いくつかの実施形態では、真菌細胞は、酵母である。

【０５４９】

本明細書で使用される場合、用語「酵母細胞」は、門Ａｓｃｏｍｙｃｏｔａ及びＢａｓｉｄｉｏｍｙｃｏｔａ内の任意の真菌細胞を指す。酵母細胞は、出芽酵母細胞、分裂酵母細胞、及びカビ細胞を含むことができる。これらの生物に限定されることなく、実験室や産業現場で使用される多くの型の酵母は、門Ａｓｃｏｍｙｃｏｔａの部分である。いくつかの実施形態では、酵母細胞は、Ｓ．ｃｅｒｅｒｖｉｓｉａｅ、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｍａｒｘｉａｎｕｓ、またはＩｓｓａｔｃｈｅｎｋｉａ ｏｒｉｅｎｔａｌｉｓ細胞である。他の酵母細胞は、Ｃａｎｄｉｄａ ｓｐｐ．（例えば、Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）、Ｙａｒｒｏｗｉａ ｓｐｐ．（例えば、Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）、Ｐｉｃｈｉａ ｓｐｐ．（例えば、Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｓｐｐ．（例えば、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ及びＫｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｍａｒｘｉａｎｕｓ）、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｓｐｐ．（例えば、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒａｓｓａ）、Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｓｐｐ．（例えば、Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｏｘｙｓｐｏｒｕｍ）、及びＩｓｓａｔｃｈｅｎｋｉａ ｓｐｐ．（例えば、Ｉｓｓａｔｃｈｅｎｋｉａ ｏｒｉｅｎｔａｌｉｓ、別名Ｐｉｃｈｉａ ｋｕｄｒｉａｖｚｅｖｉｉ及びＣａｎｄｉｄａ ａｃｉｄｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｍとしても知られる）を含むことができるが限定しない。いくつかの実施形態では、真菌細胞は、糸状菌細胞である。本明細書で使用される場合、用語「糸状菌細胞」は、糸状体、すなわち、菌糸または菌糸体で成長する任意の型の真菌細胞を指す。糸状菌細胞の例は、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｓｐｐ．（例えば、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）、Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｓｐｐ．（例えば、Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｅｉ）、Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ｓｐｐ．（例えば、Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ｏｒｙｚａｅ）、及びＭｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ｓｐｐ．（例えば、Ｍｏｒｔｉｅｒｅｌｌａ ｉｓａｂｅｌｌｉｎａ）を含むことができるが限定しない。

【０５５０】

いくつかの実施形態では、真菌細胞は、産業用株である。本明細書で使用される場合、「産業用株」は、産業プロセス、例えば、商業規模または産業規模の製品の生産において使用されるか、または産業プロセスから単離される真菌細胞の任意の株を指す。産業用株は、産業プロセスで典型的に使用される真菌種を指すことができるか、または非産業用目的（例えば、実験室研究）のためにも使用され得る真菌種の分離株を指すことができる。産業プロセスの例は、発酵（例えば、食品または飲料製品の生産における）、蒸留、バイオ燃料生産、化合物の生産、及びポリペプチドの生産を含むことができる。産業用株の例は、ＪＡＹ２７０及びＡＴＣＣ４１２４を含むことができるが限定しない。

【０５５１】

いくつかの実施形態では、真菌細胞は、倍数体細胞である。本明細書で使用される場合、「倍数体」細胞は、そのゲノムが２つ以上のコピーで存在する任意の細胞を指すことができる。倍数体細胞は倍数体状態で天然に発見される細胞の型を指すことができるか、またはそれは倍数体状態で存在するように誘導されている細胞を指すことができる（例えば、減数分裂、細胞質分裂、またはＤＮＡ複製の特定の調節、改変、不活性化、活性化、または修飾を通じて）。倍数体細胞は、ゲノム全体が倍数体である細胞を指し得るか、または目的の特定のゲノム座位における倍数体である細胞を指すことができる。理論に束縛されることを望まないが、ガイドＲＮＡの存在量は、より多くの場合、単数体細胞におけるより倍数体細胞のゲノム操作における速度限定成分であり得ることが考えられ、したがって、本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを使用する方法は、ある特定の真菌細胞型を使用することを利用することができる。

【０５５２】
いくつかの実施形態では、真菌細胞は二倍体細胞である。本明細書で使用される場合、「二倍体」細胞は、そのゲノムが２つのコピーで存在する任意の細胞を指すことができる。二倍体細胞は二倍体状態で天然に発見される細胞の型を指すことができるか、またはそれは二倍体状態で存在するように誘導されている細胞を指すことができる（例えば、減数分裂、細胞質分裂、またはＤＮＡ複製の特定の調節、改変、不活性化、活性化、または修飾を通じて）。例えば、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ株Ｓ２２８Ｃは、単数体または倍数体状態で維持され得る。二倍体細胞はそのゲノム全体が二倍体である細胞を指すことができるか、またはそれは目的の特定のゲノム座位において二倍体である細胞を指すことができる。いくつかの実施形態では、真菌細胞は、単数体細胞である。本明細書で使用される場合、「ハプロイド」細胞は、ゲノムが１つのコピーで存在する任意の細胞を指すことができる。単数体細胞は単数体状態で天然に発見される細胞の型を指すことができるか、またはそれは単数体状態で存在するように誘導されている細胞を指すことができる（例えば、減数分裂、細胞質分裂、またはＤＮＡ複製の特定の調節、改変、不活性化、活性化、または修飾を通じて）。例えば、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ株Ｓ２２８Ｃは、単数体または倍数体状態で維持され得る。単数体細胞はそのゲノム全体が単数体である細胞を指すことができるか、またはそれは目的の特定のゲノム座位において単数体である細胞を指すことができる。

【０５５３】
本明細書で使用される場合、「酵母発現ベクター」は、ＲＮＡ及び／またはポリペプチドをコードする１つ以上の配列を含有し、核酸（複数可）の発現を制御する任意の所望のエレメント、同様に酵母細胞内の発現ベクターの複製及び維持を可能にする任意のエレメントをさらに含有することができる核酸を指す。多くの好適な酵母発現ベクター及びその特徴は当該技術分野において既知であり、例えば、様々なベクター及び技術はＹｅａｓｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｘｉａｏ，Ｗ．，ｅｄ．（Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，２００７）及びＢｕｃｋｈｏｌｚ，Ｒ．Ｇ．及びＧｌｅｅｓｏｎ，Ｍ．Ａ．（１９９１）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＮＹ）９（１１）：１０６７－７２においてで例示される。酵母ベクターは、セントロメア（ＣＥＮ）配列、自律複製配列（ＡＲＳ）、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩプロモーターのような、目的の配列または遺伝子に動作可能に連結されたプロモーター、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩターミネーターのようなターミネーター、複製の起点、及びマーカー遺伝子（例えば、栄養要求性、抗生物性、または他の選択可能なマーカー）を含有することができるが、限定しない。酵母における使用のための発現ベクターの例は、プラスミド、酵母人工染色体、２μプラスミド、酵母組み込みプラスミド、酵母複製プラスミド、シャトルベクター、及びエピソームプラスミドを含むことができる。

【０５５４】
植物及び植物細胞のゲノムにおけるＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム成分の安定した統合
特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの成分をコードするポリヌクレオチドが植物細胞のゲノムへの安定した統合のために導入されることが想定される。これらの実施形態では、形質転換ベクターまたは発現システムの設計は、アデノシンデアミナーゼ及びＣａｓ１３のガイドＲＮＡ及び／または融合タンパク質がいつ、どこで、どのような条件下で発現されるかに応じて調整され得る。

【０５５５】
特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの成分を植物細胞のゲノムＤＮＡに安定的に導入することが想定される。追加的にまたは代替的に、これらに限定されないが、プラスチド、ｅミトコンドリオン、または葉緑体のような植物オルガネラのＤＮＡへの安定した統合のためのＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの成分を導入することが想定される。

【０５５６】
植物細胞のゲノムに安定して組み込むための発現システムは、以下のエレメント、植物

細胞においてアデノシンデアミナーゼ及びＣａｓ１３のＲＮＡ及び／または融合タンパク質を発現するために使用され得るプロモーターエレメント、発現を増強するための５’非翻訳領域、単子葉類細胞のようなある特定の細胞における発現をさらに増強するためのイントロンエレメント、アデノシンデアミナーゼ及び／またはアデノシンデアミナーゼ及びＣａｓ１３コード配列及び他の所望のエレメントのガイドＲＮＡ及び／または融合タンパク質を挿入するための便利な制限部位を提供するための多重クローニング部位、ならびに発現された転写産物の効率的な終結を提供するための３’非翻訳領域、のうちの１つ以上を含有することができる。

【０５５７】

発現システムのエレメントは、プラスミドもしくは形質転換ベクターのような環状、または直鎖二本鎖のような非環状ＤＮＡのいずれかである。１つ以上の発現構築物上にあり得る。

【０５５８】

特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ発現システムは、植物における標的配列とハイブリダイズするガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をコードするヌクレオチド配列であって、ガイドＲＮＡがガイド配列及び直接反復配列、ならびにアデノシンデアミナーゼ及びＣａｓ１３の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、構成成分（ａ）または（ｂ）は、同じまたは異なる構築物上に位置し、それによって異なるヌクレオチド配列が植物細胞において動作可能な同じまたは異なる調節エレメントの制御下にあり得る、ヌクレオチド配列を少なくとも含む。

【０５５９】

ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム、及び適用可能な場合、テンプレート配列の成分を含有するＤＮＡ構築物（複数可）は、様々な従来の技術によって植物、植物部分、または植物細胞のゲノムへ導入され得る。このプロセスは、概して、好適な宿主細胞または宿主組織を選択するステップと、構築物（複数可）を宿主細胞または宿主組織に導入するステップと、そこから植物細胞または植物を再生するステップと、を含む。

【０５６０】

特定の実施形態では、ＤＮＡ構築物は、電気穿孔、マイクロインジェクション、植物細胞プロトプラストのエアロゾルビーム注射のような技術を使用して植物細胞に導入され得るか、またはＤＮＡ構築物は、ＤＮＡ粒子衝撃のようなバイオリスティック（ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ）方法を使用して植物組織に直接導入され得る（Ｆｕ ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｒｅｓ．２０００ Ｆｅｂ；９（１）：１１－９も参照されたい）。粒子衝撃の根拠は、粒子による原形質の透過及び典型的にはゲノムへの安定した統合をもたらす、細胞への目的の遺伝子（複数可）で被覆された粒子の加速である（例えば、Ｋｌｅｉｎ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ（１９８７）、Ｋｌｅｉｎ ｅｔ ａｈ，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（１９９２）、Ｃａｓａｓ ｅｔ ａｈ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９３）を参照されたい。）。

【０５６１】

特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの成分を含有するＤＮＡ構築物は、Ａｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ媒介性形質転換によって植物中に導入され得る。ＤＮＡ構築物は、好適なＴ－ＤＮＡ隣接領域と組み合わされて、従来のＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｍｅｆａｃｉｅｎｓ宿主ベクターに導入され得る。外来ＤＮＡは、植物に感染させることによって、または１つ以上のＴｉ（腫瘍誘導性）プラスミドを含有するＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ細菌と共に植物プロトプラストをインキュベートすることによって、植物のゲノムに組み込まれ得る。（例えば、Ｆｒａｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，（１９８５）、Ｒｏｇｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，（１９８７）及び米国特許第５，５６３，０５５号を参照されたい）。

【０５６２】

植物プロモーター

植物細胞内において適切な発現を確実にするために、本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲ

ＩＳＰＲシステムの成分は、典型的には、植物プロモーター、すなわち植物細胞における動作可能なプロモーターの制御下に配置される。異なる型のプロモーターの使用が想定される。

【０５６３】

構成的植物プロモーターは、植物の全てまたはほぼ全ての発生段階（「構成的発現」と称される）中、植物組織の全てまたはほぼ全てにおいてそれが制御するオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を発現することができるプロモーターである。構成的プロモーターの１つの非限定的な例は、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーターである。「調節プロモーター」は、構成的ではないが一時的及び／または空間的に調節された様式で遺伝子発現を導くプロモーターを指し、組織特異的、組織嗜好性及び誘導性プロモーターを含む。異なるプロモーターは、異なる組織もしくは細胞型において、または異なる発生の段階で、または異なる環境条件に応答して、遺伝子の発現を導くことができる。特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ成分のうちの１つ以上は、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーター課題嗜好性（ｔｉｓｓｕｅ－ｐｒｅｆｅｒｒｅｄ）プロモーターが特定の植物組織内のある特定の細胞型、例えば、葉もしくは根における維管束細胞、または種の特定の細胞における増強された発現を標的化するために利用され得るように、構成的プロモーターの制御下で発現される。ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムにおける使用のための特定のプロモーターの例は、Ｋａｗａｍａｔａ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ ３８：７９２－８０３、Ｙａｍａｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｐｌａｎｔ Ｊ １２：２５５－６５、Ｈｉｒｅ ｅｔ ａｌ，（１９９２）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２０：２０７－１８、Ｋｕｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ，（１９９５）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２９：７５９－７２、及びＣａｐａｎａ ｅｔ ａｌ．，（１９９４）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２５：６８１－９１において発見される。

【０５６４】

誘導性プロモーターは、デアミナーゼの非特異的活性を回避するための限定された状況下でＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの成分のうちの１つ以上発現することが興味深くあり得る。特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの１つ以上のエレメントは、誘導性プロモーターの制御下で発現される。誘導性であり、遺伝子編集または遺伝子発現の時空間的制御を可能にするプロモーターの例は、エネルギーの形態を使用することができる。エネルギーの形態は、音響エネルギー、電磁放射線、化学エネルギー及び／または熱エネルギーを含むことができるが、これらに限定されない。誘導性システムの例は、テトラサイクリン誘導性プロモーター（Ｔｅｔ－ＯｎまたはＴｅｔ－Ｏｆｆ）、低分子ツーハイブリッド転写活性化システム（ＦＫＢＰ、ＡＢＡなど）、または配列特異的な様式で転写活性の変化を誘導する光誘導性転写エフェクター（ＬＩＴＥ）のような、光誘導性システム（フィトクローム、ＬＯＶドメイン、またはクリプトクロム）を含む。光誘導性システムの成分は、アデノシンデアミナーゼ及びＣａｓ１３の融合タンパク質、光応答性シトクロムヘテロ二量体（例えば、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ｔｈａｌｉａｎａから）を含むことができる。誘導性ＤＮＡ結合タンパク質のさらなる例及びそれらの使用のための方法は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国第６１／７３６４６５号及び米国第６１／７２１，２８３号に提供される。

【０５６５】

特定の実施形態では、一過性または誘導性発現は、例えば、化学調節プロモーターを使用することによって達成され得、すなわち、それによって外因性化学物質の適用が遺伝子発現を誘導する。遺伝子発現の調節は、化学的抑制性プロモーターによっても得られ、化学的抑制性プロモーターの適用は、遺伝子発現を抑制する。化学誘導性プロモーターは、ベンゼンスルホンアミド除草剤軽減剤によって活性化されたトウモロコシｌｎ２－２プロモーター（Ｄｅ Ｖｅｙｌｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ ３８：５６８－７７）、発芽前除草剤として使用される疎水性求電子化合物によって活性化されたトウモロコシＧＳＴプロモーター（ＧＳＴ－ｌｌ－２７、ＷＯ

９３／０１２９４）、及びサリチル酸により活性化されるタバコＰＲ－１　ａプロモーター（Ｏｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，（２００４）Ｂｉｏｓｃｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍ　６８：８０３－７）を含むが、これらに限定されない。テトラサイクリン誘導性及びテトラサイクリン抑制性プロモーター（Ｇａｔｚ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９１）Ｍｏｌ　Ｇｅｎ　Ｇｅｎｅｔ　２２７：２２９－３７、米国特許第５，８１４，６１８号及び同第５，７８９，１５６号）のような抗生物質により調節されるプロモーターは、本明細書でも使用され得る。

【０５６６】

特定の植物オルガネラへの転位及び／または特定の植物オルガネラにおける発現

発現システムは、特定の植物オルガネラへの転位及び／または特定の植物オルガネラにおける発現のためのエレメントを含むことができる。

【０５６７】

葉緑体標的化

特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、葉緑体遺伝子を特異的に修飾するか、または葉緑体における発現を確実にするために使用されることが想定される。この目的のために、使用は、葉緑体形質転換方法またはＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ成分の葉緑体への区画化（ｃｏｍｐａｒｔｉｍｅｎｔａｌｉｚａｔｉｏｎ）からなる。例えば、プラスチドゲノムにおける遺伝子組換えの導入は、花粉を通じた遺伝子流動のようなバイオセーフティー課題を低減することができる。

【０５６８】

葉緑体形質転換の方法は、当該技術分野において既知であり、粒子衝撃、ＰＥＧ処理、及びマイクロインジェクションを含む。追加的に、核ゲノムからパスチド（ｐａｓｔｉｄ）への形質転換カセットの転位を伴う方法は、ＷＯ２０１００６１１８６に記載されるように使用され得る。

【０５６９】

代替的に、ＡＤ官能性ＣＲＩＳＰＲ成分のうちの１つ以上を植物葉緑体に標的化することが想定される。このことは、アデノシンデアミナーゼ及びＣａｓ１３の融合タンパク質をコードする配列の５’領域に動作可能に連結された葉緑体トランジットペプチド（ＣＴＰ）または色素体トランジットペプチドをコードする配列を発現構築物に組み込むことによって達成される。ＣＴＰは、葉緑体への転位中に処理ステップで除去される。発現されたタンパク質の葉緑体標的化は、当業者に周知である（例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｒａｎｓｐｏｒｔ　ｉｎｔｏ　Ｃｈｌｏｒｏｐｌａｓｔｓ，２０１０，Ａｎｎｕａｌ　Ｒｅｖｉｅｗ　ｏｆ　Ｐｌａｎｔ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．６１：１５７－１８０を参照されたい）。かかる実施形態では、ガイドＲＮＡを植物クロロプラストに標的化することも望ましい。ガイドＲＮＡを葉緑体局在配列の手段によって葉緑体に転位させるために使用され得る方法及び構築物は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国第２００４０１４２４７６号に記載される。かかる構築物の変形例は、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム成分を効率的に転位するために本発明の発現システムに組み込まれ得る。

【０５７０】

藻類細胞におけるＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムをコードするポリヌクレオチドの導入

トランスジェニック藻類（またはナタネのような他の植物）は、植物油またはアルコールのようなバイオ燃料（特にメタノール及びエタノール）または他の製品の生産において特に有用であり得る。これらは、石油またはバイオ燃料産業における使用のための高レベルの石油またはアルコールを発現または過剰発現するように設計され得る。

【０５７１】

ＵＳ８９４５８３９は、Ｃａｓ９を使用してＭｉｃｒｏ－Ａｌｇａｅ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ細胞）種）を操作するための方法を記載する。同様のツールを使用すると、本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの方法は、Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ種及び他の藻類に適用され得る。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）、アデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩ

ＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアプタマー結合アダプタータンパク質に融合され得る）、及びガイドＲＮＡは、Ｈｓｐ７０Ａ－Ｒｂｃ　Ｓ２またはベータ２－チューブリンのような構成的プロモーターの制御下で、アデノシンデアミナーゼ及びＣａｓ１３の融合タンパク質を発現するベクターを使用して発現される藻類に導入される。ガイドＲＮＡは、任意選択でＴ７プロモーターを含有するベクターを使用して送達される。代替的に、Ｃａｓ１３　ｍＲＮＡ及びインビトロ転写ガイドＲＮＡは、藻類細胞に送達され得る。電気穿孔プロトコルは、ＧｅｎｅＡｒｔ　Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇキットから標準的な推奨プロトコルのように当業者に利用可能である。

【０５７２】

酵母細胞におけるＡＤ官能ＣＲＩＳＰＲシステム成分の導入

特定の実施形態では、本発明は、酵母細胞のゲノム編集のためのＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの使用に関する。ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム成分をコードするポリヌクレオチドを導入するために使用され得る酵母細胞を形質転換する方法は、Ｋａｗａｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０，Ｂｉｏｅｎｇ　Ｂｕｇｓ．２０１０　Ｎｏｖ－Ｄｅｃ；１（６）：３９５－４０３）において記載される。非限定的な例は、酢酸リチウム処理による（担体ＤＮＡ及びＰＥＧ処理をさらに含むことができる）、衝撃または電気穿孔による酵母細胞の形質転換を含む。

【０５７３】

植物及び植物細胞におけるＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム成分の一過性発現

特定の実施形態では、ガイドＲＮＡ及び／またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子が植物細胞において一時的に発現されることが、想定される。これらの実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、ガイドＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）、及びアデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアプタマー結合アダプタータンパク質に融合され得る）の両方が細胞内に存在する際にのみ、ゲノム修飾がさらに制御され得るように、標的遺伝子の修飾を確実にすることができる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質の発現が一過性である場合、かかる植物細胞から再生された植物は、典型的には外来ＤＮＡを含有しない。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は植物細胞によって安定して発現され、ガイド配列は一時的に発現される。

【０５７４】

特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム成分は、植物ウイルスベクターを使用して植物細胞に導入され得る（Ｓｃｈｏｌｔｈｏｆ　ｅｔ　ａｌ．１９９６，Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｐｈｙｔｏｐａｔｈｏｌ．１９９６；３４：２９９－３２３）。さらなる特定の実施形態では、該ウイルスベクターは、ＤＮＡウイルスからのベクターである。例えば、ジェミニウイルス（例えば、キャベツ葉巻ウイルス、マメ黄萎ウイルス、コムギ萎縮ウイルス、トマト葉巻ウイルス、トウモロコシ条斑ウイルス、タバコ葉巻ウイルス、またはトマトゴールデンモザイクウイルス）またはナノウイルス（例えば、ソラマメえそ黄色ウイルス）。他の特定の実施形態では、該ウイルスベクターは、ＲＮＡウイルスからのベクターである。例えば、トブラウイルス（ｔｏｂｒａｖｉｒｕｓ）（例えば、タバコ茎えそウイルス、タバコモザイクウイルス）、ポテックスウイルス（例えば、ジャガイモウイルスＸ）、またはホルデイウイルス（ｈｏｒｄｅｉｖｉｒｕｓ）（例えば、オオムギ班葉モザイクウイルス）。植物ウイルスの複製ゲノムは、非統合ベクターである。

【０５７５】

特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの一過性発現のために使用されるベクターは、例えば、プロトプラストにおけるＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ媒介性一過性発現（Ｓａｉｎｓｂｕｒｙ　Ｆ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｌａｎｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　Ｊ．２００９　Ｓｅｐ；７（７）：６８２－９３）のために調整されるｐＥＡＱベクターである。ゲノム位置の正確な標的化は、ＣＲＩＳＰＲ酵素を発現する安定したトランスジェニック植物においてガイドＲＮＡを発現するための修飾されたキャベツ葉巻ウイルス（ＣａＬＣｕＶ）ベクターを使用して示された（Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｒｅｐｏｒｔｓ　５

，Ａｒｔｉｃｌｅ ｎｕｍｂｅｒ：１４９２６（２０１５），ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓｒｅｐ１４９２６）。

【０５７６】

特定の実施形態では、ガイドＲＮＡ及び／またはＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子をコードする二本鎖ＤＮＡ断片は、植物細胞に一時的に導入され得る。かかる実施形態では、導入された二本鎖ＤＮＡ断片は、細胞を修飾するのに十分な量で提供されるが、企図される期間が経過した後、または１つ以上の細胞分裂の後に持続しない。植物における直接ＤＮＡ転写のための方法は、当業者に既知である（例えば、Ｄａｖｅｙ ｅｔ ａｌ．Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．１９８９ Ｓｅｐ；１３（３）：２７３－８５を参照されたい。）

【０５７７】

他の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）及び／またはアデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアプタマー結合アダプタータンパク質に融合され得る）をコードするＲＮＡポリヌクレオチドは、植物細胞に導入され、次いで、タンパク質を生成する宿主細胞によって、細胞を修飾するのに十分な量で翻訳及び処理される（少なくとも１つのガイドＲＮＡの存在下で）が、企図される期間が経過した後または１つ以上の細胞分裂後に持続しない。一過性発現のために植物プロトプラストにｍＲＮＡを導入する方法は、当業者に既知である（例えば、Ｇａｌｌｉｅ，Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ（１９９３），１３；１１９－１２２を参照されたい）。

【０５７８】

上記に記載される異なる方法の組み合わせも、想定される。

【０５７９】

ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム成分の植物細胞への送達

特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの１つ以上の成分を植物細胞に直接送達することは、興味深い。このことは、とりわけ、非トランスジェニック植物の生成について興味深い（以下参照）。特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム成分のうちの１つ以上は、植物または植物細胞の外側で調製され、細胞に送達される。例えば、特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、植物細胞への導入前にインビトロで調製される。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、当業者に既知の様々な方法によって調製され得、組換え産生を含む。発現後、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は単離され、必要に応じてリフォールディングされ、精製され、任意選択でＨｉｓ－タグのような任意の精製タグを除去するために処理される。粗、部分的に精製された、またはより完全に精製されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質が得られると、タンパク質は、植物細胞に導入され得る。

【０５８０】

特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質は、目的の遺伝子を標的化するガイドＲＮＡと混合されて、事前組み立てされたリボ核タンパク質を形成する。

【０５８１】

個々の成分または事前組み立てされたリボ核タンパク質は、電気穿孔を介して、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ関連遺伝子産物被覆粒子での衝撃によって、化学的トランスフェクションによって、または細胞膜にわたるいくつかの他の輸送の手段によって植物細胞に導入され得る。例えば、事前組み立てされたＣＲＩＳＰＲリボ核タンパク質での植物プロトプラストのトランスフェクションは、植物ゲノムの標的化された修飾を確実にするために示されている（Ｗｏｏ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２０１５；ＤＯＩ：１０．１０３８／ｎｂｔ．３３８９により説明されるように）。

【０５８２】

特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム成分は、ナノ粒子を使用して植物細胞に導入される。成分は、タンパク質または核酸として、またはそれらの組み合わせでのいずれかで、ナノ粒子にアップロードまたはパッケージされ、植物に適用され得る（

例えば、ＷＯ２００８０４２１５６及びＵＳ２０１３０１８５８２３に記載されるように）。具体的には、本発明の実施形態は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）をコードするＤＮＡ分子（複数可）、アデノシンデアミナーゼをコードするＤＮＡ分子（複数可）（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアプタマー結合アダプタータンパク質に融合され得る）、ならびにＷＯ２０１５０８９４１９に記載されるガイドＲＮＡ及び／または単離されたガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子でアップロードまたは充填されたナノ粒子を含む。

【０５８３】

ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの１つ以上の成分を植物細胞に導入するさらなる手段は、細胞膜透過ペプチド（ＣＰＰ）を使用することによる。したがって、特に、実施形態本発明は、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質に連結した細胞膜透過ペプチドを含む組成物を含む。本発明の特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び／またはガイドＲＮＡは、１つ以上のＣＰＰに結合され、それらを植物プロトプラスト内で効果的に輸送する。Ｒａｍａｋｒｉｓｈｎａ（Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．２０１４ Ｊｕｎ；２４（６）：１０２０－７ヒト細胞におけるＣａｓ９について）。他の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ遺伝子及び／またはガイドＲＮＡは、植物プロトプラスト送達のための１つ以上のＣＰＰに結合される１つ以上の環状または非環状ＤＮＡ分子（複数可）によってコードされる。次いで、植物プロトプラストは、植物細胞、さらに植物に再生される。ＣＰＰは、一般に、受容体に依存しない様式で細胞膜を越えて生物分子を輸送することができる、タンパク質に由来するか、またはキメラ配列に由来するかのいずれかの３５未満のアミノ酸の短いペプチドとして説明される。ＣＰＰは、カチオン性ペプチド、疎水性配列を有するペプチド、両親媒性ペプチド、プロリンリッチ及び抗微生物配列を有するペプチド、ならびにキメラまたは二分ペプチドであり得る（Ｐｏｏｇａ ａｎｄ Ｌａｎｇｅｌ ２００５）。ＣＰＰは、生物学的膜を透過し、したがって、細胞膜を越える様々な生物分子の細胞質への移動を誘発してそれらの細胞内経路を向上することができ、したがって、生体分子（ｂｉｏｌｏｍｏｌｅｃｕｌｅ）と標的との相互作用を促進する。ＣＰＰの例は、他に、１型ＨＩＶによるウイルス複製に必要とされる核転写活性化因子タンパク質であるＴａｔ、ペネトラチン、カポジ線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）シグナルペプチド配列、インテグリンβ３シグナルペプチド配列、ポリアルギニンペプチドＡｒｇｓ配列、グアニンリッチ分子輸送体、スイートアロー（ｓｗｅｅｔ ａｒｒｏｗ）ペプチドなどを含む。

【０５８４】

遺伝子組換え非トランスジェニック植物を作製するＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの使用

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、植物のゲノム内における外来ＤＮＡの存在を回避するために、ＣＲＩＳＰＲ成分をコードするものを含む任意の外来遺伝子の植物のゲノムへの永続的導入を伴わずに、内因性遺伝子を修飾するか、またはそれらの発現を修飾するために使用される。非トランスジェニック植物に対する規制要件があまり厳密でないため、このことは興味深くあり得る。

【０５８５】

特定の実施形態では、このことは、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム成分の一過性発現によって確実にされる。特定の実施形態では、成分のうちの１つ以上は、十分なＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、アデノシンデアミナーゼ、及びガイドＲＮＡを産生する１つ以上のウイルスベクター上で発現され、本明細書に記載の方法に従って、目的の遺伝子の修飾を一貫して着実に確実にする。

【０５８６】

特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム構築物の一過性発現は、植物プロトプラストにおいて確実にされ、したがって、ゲノムに統合されない。限られた発現のウィンドウは、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムが本明細書に記載される標的遺伝子の修飾を確実にすることを可能にするのに十分であり得る。

【０５８７】

特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの異なる成分は、上記の本明細書に記載されるようにナノ粒子またはＣＰＰ分子のようなパリキュレート（ｐａｒｉｃｕｌａｔｅ）送達分子の補助を受けて、別個にまたは混合物でのいずれかで植物細胞、プロトプラストまたは植物組織に導入される。

【０５８８】

ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム成分の発現は、アデノシンデアミナーゼのデアミナーゼ活性によって、ゲノムの標的化された修飾を誘導することができる。上記の本明細書に記載される異なる戦略は、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム成分の植物ゲノムへの導入を必要することなく、ＣＲＩＳＰＲ媒介性標的化されたゲノム編集を可能にする。植物細胞に一時的に導入される成分は、典型的には、交雑時に除去される。

【０５８９】

植物培養物及び再生

特定の実施形態では、修飾されたゲノムを有し、本明細書に記載の方法のいずれかによって生産されるか、または得られる植物細胞は、形質転換または修飾された遺伝子型、したがって所望の表現型を有する植物全体を再生するために培養され得る。従来の再生技術は、当業者に周知である。かかる再生技術の特定の例は、組織培養成長培地における特定の植物ホルモンの操作に依存し、典型的には、所望のヌクレオチド配列と共に導入されている殺生物剤及び／または除草剤マーカーに依存する。さらなる特定の実施形態では、植物再生は、培養されたプロトプラスト、植物カルス、外植片、器官、花粉、胚またはその部分から得られる（例えば、Ｅｖａｎｓ ｅｔ ａｌ．（１９８３），Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ、Ｋｌｅｅ ｅｔ ａｌ（１９８７）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．ｏｆ Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓ．を参照されたい）。

【０５９０】

特定の実施形態では、本明細書に記載の形質転換もしくは改良された植物は、本発明のホモ接合性改良植物（ＤＮＡ修飾についてホモ接合性）のための種子を提供するために自家受粉され得るか、またはヘテロ接合性植物のための種子を提供するために非トランスジェニック植物もしくは異なる改良植物と交雑され得る。組換えＤＮＡが植物細胞に導入された場合、かかる交雑の得られた植物は、組換えＤＮＡ分子についてヘテロ接合性の植物である。改良植物からの交雑により得られ、遺伝子組換え（組換えＤＮＡであり得る）を含む、かかるホモ接合性植物及びヘテロ接合性植物の両方は、本明細書では「後代」と称される。後代植物は、元のトランスジェニック植物から由来し、本明細書に提供される方法によって導入されるゲノム修飾または組換えＤＮＡ分子を含有する植物である。代替的に、遺伝子組換え植物は、それによって外来のＤＮＡがゲノムに組み込まれないＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを使用して、上記に記載される方法のうちの１つによって得られ得る。さらなる育種によって得られるかかる植物の後代は、遺伝子組換えも含むことができる。育種は、異なる作物について一般的に使用される任意の育種方法によって実行される（例えば、Ａｌｌａｒｄ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｐｌａｎｔ Ｂｒｅｅｄｉｎｇ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，ＮＹ，Ｕ．ｏｆ ＣＡ，Ｄａｖｉｓ，ＣＡ，５０－９８（１９６０）。

【０５９１】

増強された農学的形質を有する植物の生成

本明細書に提供されるＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、標的化されたＡ－Ｇ及びＴ－Ｃ変異を導入するために使用され得る。単一の細胞において複数の修飾を達成するように導かれる複数の標的化ＲＮＡの共発現により、多重化ゲノム修飾が確実にされ得る。この技術は、増強された栄養品質と、増加した病害への耐性ならびに生物的及び非生物的ストレスへの耐性と、商業的に価値のある植物製品または異種化合物の増加した生産と、を含む、向上した特徴を有する植物の高精度操作に使用され得る。

【０５９２】

特定の実施形態では、本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲは、標的化されたＡ－Ｇ及びＴ－Ｃ変異を導入するために使用され得る。かかる変異は、ナンセンス変異（例え

ば、中途終止コドン）またはミスセンス変異（例えば、異なるアミノ酸残基をコードする）であり得る。ある特定の内因性遺伝子におけるＡ－Ｇ及びＴ－Ｃ変異が所望の形質を付与するか、または所望の形質に寄与することができることは、興味深い。

【０５９３】

本明細書に記載される方法は、一般に、それらが野生型植物と比較して１つ以上の望ましい形質を有するという点で、「改良植物」の生成をもたらす。特定の実施形態では、得られる植物、植物細胞または植物部分は、植物の細胞の全部または一部のゲノムに組み込まれた外因性ＤＮＡ配列を含むトランスジェニック植物である。特定の実施形態では、外因性ＤＮＡ配列が植物の植物細胞のいずれかのゲノムに組み込まれない点で、非トランスジェニック遺伝子組換え植物、植物部分または細胞が得られる。かかる実施形態では、改良植物は非トランスジェニックである。内因性遺伝子の修飾のみが確実にされ、外来遺伝子が植物ゲノムに導入または維持されない場合、得られた遺伝子組換え作物は、外来遺伝子を含まず、したがって、基本的に非トランスジェニックと考えられ得る。

【０５９４】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ＤＮＡウイルス（例えば、ジェミニウイルス）またはＲＮＡウイルス（例えば、トブラウイルス）によって細胞内に送達される。特定の実施形態では、導入するステップは、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質、アデノシンデアミナーゼ、及びガイドＲＮＡをコードする１つ以上のポリヌクレオチド配列を含有するＴ－ＤＮＡを植物細胞に送達することを含み、送達することはＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍを介する。ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの成分をコードするポリヌクレオチド配列は、構成的プロモーター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス３５Ｓプロモーター）または細胞特異的または誘導性プロモーターのようなプロモーターに動作可能に連結され得る。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、微小発射体衝撃によって導入される。特定の実施形態では、方法は、目的の遺伝子の発現が修飾されているかどうかを決定するための導入するステップの後に植物細胞をスクリーンすることをさらに含む。特定の実施形態では、方法は、植物細胞から植物を再生するステップを含む。さらなる実施形態では、方法は、遺伝学的に所望の植物系統を得るために植物を交雑させることを含む。

【０５９５】

上記に記載される方法の特定の実施形態では、耐病性作物は、病害感受性遺伝子または植物防御遺伝子の負の調節因子（例えば、Ｍｌｏ遺伝子）をコードする遺伝子の標的化された変異によって得られる。特定の実施形態では、除草剤耐性作物は、アセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）及びプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ（ＰＰＯ）をコードするもののような植物遺伝子における特定のヌクレオチドの標的化された置換によって生成される。特定の実施形態では、非生物的ストレス耐性の負の調節因子をコードする遺伝子の標的化された変異による乾燥及び塩害耐性作物、Ｗａｘｙ遺伝子の標的化された変異による低アミロース粒、糊粉層における主要リパーゼ遺伝子の標的化された変異による低減した酸敗を有する米または他の粒など。特定の実施形態における。目的の形質をコードする内因性遺伝子のより広範なリストは、以下に列挙される。

【０５９６】

倍数体植物を修飾するためのＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの使用

多くの植物はポリプロイドであり、それらは、コムギのように、それらのゲノムの重複したコピーを時には６つも担持する。ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを利用する本発明に従う方法は、遺伝子の全てのコピーに影響するか、または一度に数十の遺伝子を標的化するために「多重化」され得る。例えば、特定の実施形態では、本発明の方法は、病害に対する防御を抑制することを担う異なる遺伝子における機能変異の欠失を同時に確実にするために使用される。特定の実施形態では、本発明の方法は、コムギ植物がうどんこ病に耐性のあることを確実にするために、コムギ植物細胞におけるＴａＭＬＯ－Ａｌ、ＴａＭＬＯ－Ｂｌ及びＴａＭＬＯ－Ｄｌ核酸配列の発現を同時に抑制し、そこからコムギ植物を再生する（ＷＯ２０１５１０９７５２も参照）。

【０５９７】

農学的形質を付与する例示的な遺伝子

特定の実施形態では、本発明は、以下に列挙されるような、内因性遺伝子における標的化されたＡ－Ｇ及びＴ－Ｃ変異ならびにそれらの調節エレメントを伴う方法を包含する。

【０５９８】

１．害虫や病害への耐性を付与する遺伝子：

植物病害耐性遺伝子。植物は、特定の病原体株に耐性のある植物を操作するためのクローン化された耐性遺伝子で形質転換され得る。例えば、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６６：７８９（１９９４）（Ｃｌａｄｏｓｐｏｒｉｕｍ ｆｕｌｖｕｍへの耐性のためのトマトＣｆ－９遺伝子のクローニング）、Ｍａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６２：１４３２（１９９３）（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｙｒｉｎｇａｅ ｐｖ．ｔｏｍａｔｏへの耐性のためのトマトＰｔｏ遺伝子はプロテインキナーゼをコードする）、Ｍｉｎｄｒｉｎｏｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ７８：１０８９（１９９４）（ＡｒａｂｉｄｏｐｓｍａｙはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｙｒｉｎｇａｅへの耐性のためのＲＳＰ２遺伝子である）を参照されたい。病原体感染中に上方調節または下方調節される植物遺伝子は、病原体耐性について操作され得る。例えば、Ｔｈｏｍａｚｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．，ｂｉｏＲｘｉｖ ０６４８２４；ｄｏｉ：ｈｔｔｐｓ：／／ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１０１／０６４８２４ Ｅｐｕｂ．Ｊｕｌｙ ２３，２０１６（病原体感染時に通常上方制御されるＳｌＤＭＲ６－１の欠失を有するトマト植物）を参照されたい。

【０５９９】

ダイズシスト線虫のような害虫への耐性を付与する遺伝子。例えば、ＰＣＴ出願ＷＯ９６／３０５１７、ＰＣＴ出願ＷＯ ９３／１９１８１を参照されたい。

【０６００】

Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｔｈｕｒｉｎｇｉｅｎｓｉｓタンパク質例えば、Ｇｅｉｓｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ４８：１０９（１９８６）を参照されたい。

【０６０１】

レクチン、例えば、Ｖａｎ Ｄａｍｍｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２４：２５（１９９４を参照されたい。

【０６０２】

アビジンのようなビタミン結合タンパク質、昆虫害虫に対する殺幼虫剤としてのアビジン及びアビジン類似体の使用を教示するＰＣＴ出願ＵＳ９３／０６４８７を参照されたい。

【０６０３】

プロテアーゼまたはプロテアーゼ阻害剤またはアミラーゼ阻害剤のような酵素阻害剤。例えば、Ａｂｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：１６７９３（１９８７）、Ｈｕｕｂ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２１：９８５（１９９３）、Ｓｕｍｉｔａｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｓｃｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５７：１２４３（１９９３）及び米国特許第５，４９４，８１３号を参照されたい。

【０６０４】

エクジステロイドもしくは幼若ホルモン、その変異体、それに基づく模倣物、またはそのアンタゴニストもしくはアゴニストのような昆虫特異的ホルモンまたはフェロモン。例えば、Ｈａｍｍｏｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４４：４５８（１９９０）を参照されたい。

【０６０５】

発現時に罹患した害虫の生理を妨害する昆虫特異的ペプチドまたは神経ペプチド。例えば、Ｒｅｇａｎ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９：９（１９９４）及びＰｒａｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．１６３：１２４３（１９８９）を参照されたい。米国特許第５，２６６，３１７号も参照されたい。

【０６０６】

ヘビ、スズメバチ、またはその他の生物によって天然に産生される昆虫特異的毒液。例えば、Ｐａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　１１６：１６５（１９９２）を参照されたい。

【０６０７】

モノテルペン、セスキテルペン、ステロイド、ヒドロキサム酸、フェニルプロパノイド誘導体または殺虫活性を有する別の非タンパク質分子の過剰蓄積を担う酵素。

【０６０８】

生物的に活性な分子の翻訳後修飾を含む、修飾に関与する酵素、例えば、天然かまたは剛性かに関わらず、解糖系酵素、タンパク質分解酵素、脂肪分解酵素、ヌクレアーゼ、シクラーゼ、トランスアミナーゼ、エステラーゼ、加水分解酵素、ホスファターゼ、キナーゼ、ホスホリラーゼ、ポリメラーゼ、エラスターゼ、キチナーゼ、及びグルカナーゼ（天然または合成を問わず）。ＰＣＴ出願ＷＯ９３／０２１９７、Ｋｒａｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｓｅｃｔ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２３：６９１（１９９３）及びＫａｗａｌｌｅｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２１：６７３（１９９３）を参照されたい。

【０６０９】

シグナル伝達を刺激する分子。例えば、Ｂｏｔｅｌｌａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．２４：７５７（１９９４）及びＧｒｉｅｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｌａｎｔ　Ｐｈｙｓｉｏｌ．１０４：１４６７（１９９４）を参照されたい。

【０６１０】

ウイルス侵襲性タンパク質またはそれに由来する複合体毒素。Ｂｅａｃｈｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．ｒｅｖ．Ｐｈｙｔｏｐａｔｈｏｌ．２８：４５１（１９９０）を参照されたい。

【０６１１】

病原体または寄生生物によって自然界で産生される発達抑止性（ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ－ａｒｒｅｓｔｉｖｅ）タンパク質。Ｌａｍｂ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１０：１４３６（１９９２）及びＴｏｕｂａｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，ＰｌａｎｔＪ．２：３６７（１９９２）を参照されたい。

【０６１２】

植物によって自然界で産生される発達抑止性タンパク質。例えば、Ｌｏｇｅｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１０：３０５（１９９２）。

【０６１３】

植物では、病原体は宿主特異的である場合が多い。例えば、いくつかのＦｕｓａｒｉｕｍ種はトマトの萎凋を引き起こすがトマトのみを攻撃し、他のＦｕｓａｒｉｕｍ種はコムギのみを攻撃する。植物は、ほとんどの病原体に抵抗するための既存の及び誘導性の防御力を有する。植物の世代にわたる変異及び組換え事象は、特に病原体が植物よりも頻繁に繁殖するため、感受性をもたらす遺伝子変異性を引き起こす。植物では、非宿主耐性があり得、例えば、宿主及び病原体は不親和性であるか、または典型的には多くの遺伝子によって制御される病原体の全ての類への部分的な耐性、及び／または病原体のいくつかの類への完全な耐性があり得るが、他の類へはない。かかる耐性は、典型的には、いくつかの遺伝子によって制御される。新しいツールであるＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの方法及び成分は、今や本明細書において前もって特定の変異を誘導するように存在する。したがって、抵抗性遺伝子の供給源のゲノムを分析することができ、所望の特徴または形質を有する植物において、抵抗性遺伝子の増大を誘導するためにＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの方法及び成分を使用することができる。本システムは、これまでの変異誘発剤よりもより精密にそのことを行うことができ、したがって、植物育種プログラムを加速及び向上することができる。

【０６１４】

２．ＷＯ２０１３０４６２４７において列挙されるもののような植物病害に関与する遺伝子：

【０６１５】
イネ病害：Ｍａｇｎａｐｏｒｔｈｅ ｇｒｉｓｅａ、Ｃｏｃｈｌｉｏｂｏｌｕｓ ｍｉｙａｂｅａｎｕｓ、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ、Ｇｉｂｂｅｒｅｌｌａ ｆｕｊｉｋｕｒｏｉ；コムギ病害：Ｅｒｙｓｉｐｈｅ ｇｒａｍｉｎｉｓ、Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｇｒａｍｉｎｅａｒｕｍ、Ｆ．ａｖｅｎａｃｅｕｍ、Ｆ．ｃｕｌｍｏｒｕｍ、Ｍｉｃｒｏｄｏｃｈｉｕｍ ｎｉｖａｌｅ、Ｐｕｃｃｉｎｉａ ｓｔｒｉｉｆｏｒｍｉｓ、Ｐ．ｇｒａｍｉｎｉｓ、Ｐ．ｒｅｃｏｎｄｉｔａ、Ｍｉｃｒｏｎｅｃｔｒｉｅｌｌａ ｎｉｖａｌｅ、Ｔｙｐｈｕｌａ ｓｐ．、Ｕｓｔｉｌａｇｏ ｔｒｉｔｉｃｉ、Ｔｉｌｌｅｔｉａ ｃａｒｉｅｓ、Ｐｓｅｕｄｏｃｅｒｃｏｓｐｏｒｅｌｌａ ｈｅｒｐｏｔｒｉｃｈｏｉｄｅｓ、Ｍｙｃｏｓｐｈａｅｒｅｌｌａ ｇｒａｍｉｎｉｃｏｌａ、Ｓｔａｇｏｎｏｓｐｏｒａ ｎｏｄｏｒｕｍ、Ｐｙｒｅｎｏｐｈｏｒａ ｔｒｉｔｉｃｉ－ｒｅｐｅｎｔｉｓ；オオムギ病害：Ｅｒｙｓｉｐｈｅ ｇｒａｍｉｎｉｓ、Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｇｒａｍｉｎｅａｒｕｍ、Ｆ．ａｖｅｎａｃｅｕｍ、Ｆ．ｃｕｌｍｏｒｕｍ、Ｍｉｃｒｏｄｏｃｈｉｕｍ ｎｉｖａｌｅ、Ｐｕｃｃｉｎｉａ ｓｔｒｉｉｆｏｒｍｉｓ、Ｐ．ｇｒａｍｉｎｉｓ、Ｐ．ｈｏｒｄｅｉ、Ｕｓｔｉｌａｇｏ ｎｕｄａ、Ｒｈｙｎｃｈｏｓｐｏｒｉｕｍ ｓｅｃａｌｉｓ、Ｐｙｒｅｎｏｐｈｏｒａ ｔｅｒｅｓ、Ｃｏｃｈｌｉｏｂｏｌｕｓ ｓａｔｉｖｕｓ、Ｐｙｒｅｎｏｐｈｏｒａ ｇｒａｍｉｎｅａ、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ；トウモロコシ病害：Ｕｓｔｉｌａｇｏ ｍａｙｄｉｓ、Ｃｏｃｈｌｉｏｂｏｌｕｓ ｈｅｔｅｒｏｓｔｒｏｐｈｕｓ、Ｇｌｏｅｏｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ ｓｏｒｇｈｉ、Ｐｕｃｃｉｎｉａ ｐｏｌｙｓｏｒａ、Ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ ｚｅａｅ－ｍａｙｄｉｓ、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ；

【０６１６】
柑橘類病害：Ｄｉａｐｏｒｔｈｅ ｃｉｔｒｉ、Ｅｌｓｉｎｏｅ ｆａｗｃｅｔｔｉ、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ ｄｉｇｉｔａｔｕｍ、Ｐ．ｉｔａｌｉｃｕｍ、Ｐｈｙｔｏｐｈｔｈｏｒａ ｐａｒａｓｉｔｉｃａ、Ｐｈｙｔｏｐｈｔｈｏｒａ ｃｉｔｒｏｐｈｔｈｏｒａ；リンゴ病害：Ｍｏｎｉｌｉｎｉａ ｍａｌｉ、Ｖａｌｓａ ｃｅｒａｔｏｓｐｅｒｍａ、Ｐｏｄｏｓｐｈａｅｒａ ｌｅｕｃｏｔｒｉｃｈａ、Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ ａｌｔｅｒｎａｔａ ａｐｐｌｅ ｐａｔｈｏｔｙｐｅ、Ｖｅｎｔｕｒｉａ ｉｎａｅｑｕａｌｉｓ、Ｃｏｌｌｅｔｏｔｒｉｃｈｕｍ ａｃｕｔａｔｕｍ、Ｐｈｙｔｏｐｈｔｏｒａ ｃａｃｔｏｒｕｍ；

【０６１７】
ナシ病害：Ｖｅｎｔｕｒｉａ ｎａｓｈｉｃｏｌａ、Ｖ．ｐｉｒｉｎａ、Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ ａｌｔｅｒｎａｔａ Ｊａｐａｎｅｓｅ ｐｅａｒ ｐａｔｈｏｔｙｐｅ、Ｇｙｍｎｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ ｈａｒａｅａｎｕｍ、Ｐｈｙｔｏｐｈｔｏｒａ ｃａｃｔｏｒｕｍ；

【０６１８】
モモ病害：Ｍｏｎｉｌｉｎｉａ ｆｒｕｃｔｉｃｏｌａ、Ｃｌａｄｏｓｐｏｒｉｕｍ ｃａｒｐｏｐｈｉｌｕｍ、Ｐｈｏｍｏｐｓｉｓ ｓｐ．；

【０６１９】
ブドウ病害：Ｅｌｓｉｎｏｅ ａｍｐｅｌｉｎａ、Ｇｌｏｍｅｒｅｌｌａ ｃｉｎｇｕｌａｔａ、Ｕｎｉｎｕｌａ ｎｅｃａｔｏｒ、Ｐｈａｋｏｐｓｏｒａ ａｍｐｅｌｏｐｓｉｄｉｓ、Ｇｕｉｇｎａｒｄｉａ ｂｉｄｗｅｌｌｉｉ、Ｐｌａｓｍｏｐａｒａ ｖｉｔｉｃｏｌａ；

【０６２０】
カキ病害：Ｇｌｏｅｓｐｏｒｉｕｍ ｋａｋｉ、Ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ ｋａｋｉ、Ｍｙｃｏｓｐｈａｅｒｅｌａ ｎａｗａｅ；

【０６２１】
ウリ病害：Ｃｏｌｌｅｔｏｔｒｉｃｈｕｍ ｌａｇｅｎａｒｉｕｍ、Ｓｐｈａｅｒｏｔｈｅｃａ ｆｕｌｉｇｉｎｅａ、Ｍｙｃｏｓｐｈａｅｒｅｌｌａ ｍｅｌｏｎｉｓ、Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｏｘｙｓｐｏｒｕｍ、Ｐｓｅｕｄｏｐｅｒｏｎｏｓｐｏｒａ ｃｕｂｅｎ

sis、Phytophthora sp.、Pythium sp.；
【０６２２】
トマト病害：Alternaria solani、Cladosporium fulvum、Phytophthora infestans；Pseudomonas syringae pv. Tomato；Phytophthora capsici；Xanthomonas
【０６２３】
ナス病害：Phomopsis vexans、Erysiphe cichoracearum；
アブラナ科野菜病害：Alternaria japonica、Cercosporella brassicae、Plasmodiophora brassicae、Peronospora parasitica；
【０６２４】
ネギ病害：Puccinia allii、Peronospora destructor；
【０６２５】
ダイズ病害：Cercospora kikuchii、Elsinoe glycines、Diaporthe phaseolorum var. sojae、Septoria glycines、Cercospora sojina、Phakopsora pachyrhizi、Phytophthora sojae、Rhizoctonia solani、Corynespora casiicola、Sclerotinia sclerotiorum；
【０６２６】
インゲンマメ病害：Colletrichum lindemthianum；
【０６２７】
ピーナッツ病害：Cercospora personata、Cercospora arachidicola、Sclerotium rolfsii；
【０６２８】
インゲンマメ病害インゲンマメ：Erysiphe pisi；
【０６２９】
ジャガイモ病害：Alternaria solani、Phytophthora infestans、Phytophthora erythroseptica、Spongospora subterranean, f. sp. Subterranean；
【０６３０】
イチゴ病害：Sphaerotheca humuli、Glomerella cingulata；
【０６３１】
茶病害：Exobasidium reticulatum、Elsinoe leucospila、Pestalotiopsis sp.、Colletotrichum theae－sinensis；
【０６３２】
タバコ病害：Alternaria longipes、Erysiphe cichoracearum、Colletotrichum tabacum、Peronospora tabacina、Phytophthora nicotianae；
【０６３３】
ナタネ病害：Sclerotinia sclerotiorum、Rhizoctonia solani；
【０６３４】
ワタ病害：Rhizoctonia solani；

【０６３５】
ビート病害：Ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａ ｂｅｔｉｃｏｌａ、Ｔｈａｎａｔｅｐｈｏｒｕｓ ｃｕｃｕｍｅｒｉｓ、Ｔｈａｎａｔｅｐｈｏｒｕｓ ｃｕｃｕｍｅｒｉｓ、Ａｐｈａｎｏｍｙｃｅｓ ｃｏｃｈｌｉｏｉｄｅｓ；
【０６３６】
バラ病害：Ｄｉｐｌｏｃａｒｐｏｎ ｒｏｓａｅ、Ｓｐｈａｅｒｏｔｈｅｃａ ｐａｎｎｏｓａ、Ｐｅｒｏｎｏｓｐｏｒａ ｓｐａｒｓａ；
【０６３７】
キク属及びキク科の病害：Ｂｒｅｍｉａ ｌａｃｔｕｃａ、Ｓｅｐｔｏｒｉａ ｃｈｒｙｓａｎｔｈｅｍｉ－ｉｎｄｉｃｉ、Ｐｕｃｃｉｎｉａ ｈｏｒｉａｎａ；
【０６３８】
様々な植物の病害：Ｐｙｔｈｉｕｍ ａｐｈａｎｉｄｅｒｍａｔｕｍ、Ｐｙｔｈｉｕｍ ｄｅｂａｒｉａｎｕｍ、Ｐｙｔｈｉｕｍ ｇｒａｍｉｎｉｃｏｌａ、Ｐｙｔｈｉｕｍ ｉｒｒｅｇｕｌａｒｅ、Ｐｙｔｈｉｕｍ ｕｌｔｉｍｕｍ、Ｂｏｔｒｙｔｉｓ ｃｉｎｅｒｅａ、Ｓｃｌｅｒｏｔｉｎｉａ ｓｃｌｅｒｏｔｉｏｒｕｍ；
【０６３９】
ラディッシュ病害：Ａｌｔｅｒｎａｒｉａ ｂｒａｓｓｉｃｉｃｏｌａ；
【０６４０】
シバ属病害：Ｓｃｌｅｒｏｔｉｎｉａ ｈｏｍｅｏｃａｒｐａ、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎｉ；
【０６４１】
バナナ病害：Ｍｙｃｏｓｐｈａｅｒｅｌｌａ ｆｉｊｉｅｎｓｉｓ、Ｍｙｃｏｓｐｈａｅｒｅｌｌａ ｍｕｓｉｃｏｌａ；
【０６４２】
ヒマワリ病害：Ｐｌａｓｍｏｐａｒａ ｈａｌｓｔｅｄｉｉ；
【０６４３】
Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｓｐｐ.、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ ｓｐｐ.、Ｆｕｓａｒｉｕｍ ｓｐｐ.、Ｇｉｂｂｅｒｅｌｌａ ｓｐｐ.、Ｔｒｉｃｏｄｅｒｍａ ｓｐｐ.、Ｔｈｉｅｌａｖｉｏｐｓｉｓ ｓｐｐ.、Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ｓｐｐ.、Ｍｕｃｏｒ ｓｐｐ.、Ｃｏｒｔｉｃｉｕｍ ｓｐｐ.、Ｒｈｏｍａ ｓｐｐ.、Ｒｈｉｚｏｃｔｏｎｉａ ｓｐｐ.、Ｄｉｐｌｏｄｉａ ｓｐｐ.などにより引き起こされる様々な植物の種子病害または成長の初期段階における病害；
【０６４４】
Ｖｉｒｕｓ ｄｉｓｅａｓｅｓ ｏｆ ｖａｒｉｏｕｓ ｐｌａｎｔｓ ｍｅｄｉａｔｅｄ ｂｙ Ｐｏｌｙｍｉｘａ ｓｐｐ.、Ｏｌｐｉｄｉｕｍ ｓｐｐ.などにより媒介される様々な植物のウイルス病害。
【０６４５】
３．除草剤への耐性を付与する遺伝子の例：
【０６４６】
イミダゾリノンまたはスルホニル尿素のような成長点または分裂組織を阻害する除草剤への耐性、例えば、それぞれＬｅｅ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．７：１２４１（１９８８）、及びＭｉｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅｏｒ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎｅｔ．８０：４４９（１９９０）による。
【０６４７】
グリホサート耐性（例えば、それぞれ、変異体５－エノールピルビルシキメート－３－リン酸シンターゼ（ＥＰＳＰ）遺伝子、ａｒｏＡ遺伝子及びグリホサートアセチルトランスフェラーゼ（ＧＡＴ）遺伝子によって付与される耐性）、またはグルホシネートのような他のホスホノ化合物に対する耐性（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｈｙｇｒｏｓｃｏｐｉｃｕｓ及びＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｉｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓを含む、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ種からのホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ（ＰＡ

Ｔ）遺伝子）、ならびにＡＣＣａｓｅ阻害剤コード遺伝子によるピリジノキシ（ｐｙｒｉｄｉｎｏｘｙ）またはフェノキシプロピオン酸（ｐｈｅｎｏｘｙ ｐｒｏｐｒｉｏｎｉｃ ａｃｉｄ）及びシクロヘキソン（ｃｙｃｌｏｈｅｘｏｎｅ）に対する耐性。例えば、米国特許第４，９４０，８３５号及び米国特許第６，２４８，８７６号、米国特許第４，７６９，０６１号、ＥＰ第０ ３３３ ０３３号及び米国特許第４，９７５，３７４号。ＥＰ第０２４２２４６号、ＤｅＧｒｅｅｆ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ７：６１（１９８９）、Ｍａｒｓｈａｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅｏｒ．Ａｐｐｌ．Ｇｅｎｅｔ．８３：４３５（１９９２）、Ｃａｓｔｌｅ ｅｔ．ａｌ．へのＷＯ２００５０１２５１５及びＷＯ ２００５１０７４３７も参照されたい。

【０６４８】

Ｐｒｚｉｂｉｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ ３：１６９（１９９１）、米国特許第４，８１０，６４８号、及びＨａｙｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．２８５：１７３（１９９２）におけるトリアジン（ｐｓｂＡ及びｇｓ$^{+}$遺伝子）またはベンゾニトリル（ニトリラーゼ遺伝子）、及びグルタチオンＳ－トランスフェラーゼのような、光合成を阻害する除草剤への耐性。

【０６４９】

除草剤を解毒する酵素または阻害に耐性のある変異体グルタミンシンターゼ酵素をコードする遺伝子、例えばｎ米国特許出願第１１／７６０，６０２号。または解毒酵素は、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ種からのｂａｒまたはｐａｔタンパク質のような）をコードする酵素である。ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼは、例えば、米国特許第５，５６１，２３６号、同第５，６４８，４７７号、同第５，６４６，０２４号、同第５，２７３，８９４号、同第５，６３７，４８９号、同第５，２７６，２６８号、同第５，７３９，０８２号、同第５，９０８，８１０及び同第７，１１２，６６５号において説明される。

【０６５０】

ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（ＨＰＰＤ）阻害剤、天然型ＨＰＰＤ耐性酵素、またはＷＯ９６／３８５６７、ＷＯ９９／２４５８５、及びＷＯ９９／２４５８６、ＷＯ２００９／１４４０７９、ＷＯ２００２／０４６３８７、または米国特許第６，７６８，０４４号において説明されるような変異されたまたはキメラＨＰＰＤ酵素をコードする遺伝子。

【０６５１】

４．非生物的ストレス耐性に関与する遺伝子の例：

【０６５２】

ＷＯ００／０４１７３またはＷＯ／２００６／０４５６３３において説明される植物細胞または植部におけるポリ（ＡＤＰ－リボース）ポリメラーゼ（ＰＡＲＰ）遺伝子の発現及び／または活性を低減することができる導入遺伝子。

【０６５３】

例えば、ＷＯ２００４／０９０１４０において説明される、植物または植物細胞の遺伝子をコードするＰＡＲＧの発現及び／または活性を低減することができる導入遺伝子。

【０６５４】

例えば、ＥＰ０４０７７６２４．７、ＷＯ２００６／１３３８２７、ＰＣＴ／ＥＰ０７／００２，４３３、ＥＰ１９９９２６３、またはＷＯ２００７／１０７３２６において説明される、ニコチンアミダーゼ、ニコチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ、ニコチン酸モノヌクレオチドアデニルトランスフェラーゼ、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドシンセターゼまたはニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼを含むニコチンアミドアデニンジヌクレオチドサルベージ合成経路の植物機能的酵素をコードする導入遺伝子。

【０６５５】

炭水化物生合成に関与する酵素は、例えば、ＥＰ０５７１４２７、ＷＯ９５／０４８２６、ＥＰ０７１９３３８、ＷＯ９６／１５２４８、ＷＯ９６／１９５８１、ＷＯ９６／２

７６７４、ＷＯ９７／１１１８８、ＷＯ９７／２６３６２、ＷＯ９７／３２９８５、ＷＯ９７／４２３２８、ＷＯ９７／４４４７２、ＷＯ９７／４５５４５、ＷＯ９８／２７２１２、ＷＯ９８／４０５０３、ＷＯ９９／５８６８８、ＷＯ９９／５８６９０、ＷＯ９９／５８６５４、ＷＯ００／０８１８４、ＷＯ００／０８１８５、ＷＯ００／０８１７５、ＷＯ００／２８０５２、ＷＯ００／７７２２９、ＷＯ０１／１２７８２、ＷＯ０１／１２８２６、ＷＯ０２／１０１０５９、ＷＯ０３／０７１８６０、ＷＯ２００４／０５６９９９、ＷＯ２００５／０３０９４２、ＷＯ２００５／０３０９４１、ＷＯ２００５／０９５６３２、ＷＯ２００５／０９５６１７、ＷＯ２００５／０９５６１９、ＷＯ２００５／０９５６１８、ＷＯ２００５／１２３９２７、ＷＯ　２００６／０１８３１９、ＷＯ２００６／１０３１０７、ＷＯ２００６／１０８７０２、ＷＯ２００７／００９８２３、ＷＯ００／２２１４０、ＷＯ２００６／０６３８６２、ＷＯ２００６／０７２６０３、ＷＯ０２／０３４９２３、ＥＰ０６０９０１３４．５、ＥＰ０６０９０２２８．５、ＥＰ０６０９０２２７．７、ＥＰ０７０９０００７．１、ＥＰ０７０９０００９．７、ＷＯ０１／１４５６９、ＷＯ０２／７９４１０、ＷＯ０３／３３５４０、ＷＯ２００４／０７８９８３、ＷＯ０１／１９９７５、ＷＯ９５／２６４０７、ＷＯ９６／３４９６８、ＷＯ９８／２０１４５、ＷＯ９９／１２９５０、ＷＯ９９／６６０５０、ＷＯ９９／５３０７２、米国特許第６，７３４，３４１号、ＷＯ００／１１１９２、ＷＯ９８／２２６０４、ＷＯ９８／３２３２６、ＷＯ０１／９８５０９、ＷＯ０１／９８５０９、ＷＯ２００５／００２３５９、米国特許第５，８２４，７９０号、米国特許第６，０１３，８６１号、ＷＯ９４／０４６９３、ＷＯ９４／０９１４４、ＷＯ９４／１１５２０、ＷＯ９５／３５０２６もしくはＷＯ９７／２０９３６において説明されるものを含むか、またはＥＰ０６６３９５６、ＷＯ９６／０１９０４、ＷＯ９６／２１０２３、ＷＯ９８／３９４６０、及びＷＯ９９／２４５９３に開示される、ポリフルクトースの産生、特にイヌリン及びレバン型の産生に関与する酵素、ＷＯ９５／３１５５３、ＵＳ２００２０３１８２６、米国特許第６，２８４，４７９号、米国特許第５，７１２，１０７号、ＷＯ９７／４７８０６、ＷＯ９７／４７８０７、ＷＯ９７／４７８０８及びＷＯ００／１４２４９に開示されるアルファ－１，４－グルカンの産生、ＷＯ００／７３４２２に開示されるアルファ－１，６－分岐アルファ－１，４－グルカンの産生、例えば、ＷＯ００／４７７２７、ＷＯ００／７３４２２、ＥＰ０６０７７３０１．７、米国特許第５，９０８，９７５号及びＥＰ０７２８２１３に開示されるアルテルナンの産生、例えば、ＷＯ２００６／０３２５３８、ＷＯ２００７／０３９３１４、ＷＯ２００７／０３９３１５、ＷＯ２００７／０３９３１６、ＪＰ２００６３０４７７９、及びＷＯ２００５／０１２５２９に開示されるヒアルロナカンの産生を含む。

【０６５６】

乾燥耐性を向上する遺伝子。例えば、ＷＯ２０１３１２２４７２は、機能的ユビキチンタンパク質リガーゼタンパク質（ＵＰＬ）タンパク質、より具体的にはＵＰＬ３の不在または低減したレベルが、該植物の水に対する減少した必要性または向上した乾燥への耐性を引き起こすことを開示する。増加した乾燥耐性を有するトランスジェニック植物の他の例は、例えば、ＵＳ２００９／０１４４８５０、ＵＳ２００７／０２６６４５３、及びＷＯ２００２／０８３９１１において開示される。ＵＳ２００９／０１４４８５０は、ＤＲ０２核酸の改変された発現による乾燥耐性表現型を示す植物を説明する。ＵＳ２００７／０２６６４５３は、Ｄｒ０３核酸の改変された発現による乾燥耐性表現型を示す植物を説明し、ＷＯ２００２／０８３９１１は、孔辺細胞において発現されるＡＢＣトランスポーターの低減した活性による増加した乾燥耐性を有する植物を説明する。別の例は、トランスジェニック植物におけるＤＲＥＢ１　ＡをコードするｃＤＮＡの過剰発現が、正常な成長条件下で多くのストレス耐性遺伝子の発現を活性化し、乾燥、塩分負荷、及び凍結への向上した耐性もたらしたことを説明するＫａｓｕｇａ及び共著者ら（１９９９）による研究である。しかし、ＤＲＥＢ１Ａの発現は、正常な成長条件下で重度の成長遅滞ももたらした（Ｋａｓｕｇａ（１９９９）Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１７（３）２８７－２９１）。

【０６５７】
さらなる特定の実施形態では、作物植物は、特定の植物形質に影響を与えることによって改良され得る。例えば、農薬耐性植物を開発すること、植物における耐病性を向上させること、植物の虫及び線虫耐性を向上させること、寄生雑草に対する植物の耐性を向上させること、植物の乾燥耐性を向上させること、植物の栄養価を向上させること、植物のストレス耐性を向上させること、自家受粉を回避すること、植物飼料消化性バイオマス、穀物収量などによる。いくつかの特定の非限定的な例が、以下に提供される。
【０６５８】
単一の遺伝子の標的化された変異に加え、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、複数の遺伝子の標的化された変異、染色体断片の欠失、導入遺伝子の部位特異的統合、インビボでの部位特異的変異誘発、及び植物における正確な遺伝子置き換えまたは対立遺伝子交換を可能にするよう設計され得る。したがって、本明細書に記載される方法は、遺伝子の発見及び検証、変異及びシスジェニック育種、ならびにハイブリッド育種において広範な用途を有する。これらの用途は、除草剤耐性、耐病性、非生物的ストレス耐性、高収量、及び優れた品質のような様々な改良された農学的形質を有する新しい世代の遺伝子組換え作物の生産を促進する。
【０６５９】
雄性不稔植物を作成するためのＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの使用
ハイブリッド植物は、典型的には、近交植物と比較して有利な農学的形質を有する。しかし、自家受粉植物については、ハイブリッドの生成は困難であり得る。異なる植物の型において、植物の稔性、より具体的には雄性稔性のために重要な遺伝子が特定されている。例えば、トウモロコシにおいて、少なくとも２つの遺伝子が、稔性において重要であることが特定されている（Ａｍｉｔａｂｈ Ｍｏｈａｎｔｙ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ ｏｎ Ｎｅｗ Ｐｌａｎｔ Ｂｒｅｅｄｉｎｇ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ Ａｎｄ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ，Ｏｃｔ ９－１０，２０１４，Ｊａｉｐｕｒ，Ｉｎｄｉａ、Ｓｖｉｔａｓｈｅｖ ｅｔ ａｌ．Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．２０１５ Ｏｃｔ；１６９（２）：９３１－４５、Ｄｊｕｋａｎｏｖｉｃ ｅｔ ａｌ．ＰｌａｎｔＪ．２０１３ Ｄｅｃ；７６（５）：８８８－９９）。本明細書に提供される方法及びシステムは、ハイブリッドを生成するために容易に交雑され得る雄性不稔植物を生成するために雄性稔性のために必要な遺伝子を標的化するために使用され得る。特定の実施形態では、本明細書に提供されるＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、シトクロムＰ４５０様遺伝子（ＭＳ２６）またはメガヌクレアーゼ遺伝子（ＭＳ４５）の標的化された変異誘発のために使用され、それによって、トウモロコシ植物に雄性不稔性を付与する。したがって遺伝学的に改変されたトウモロコシ植物は、ハイブリッド育種プログラムにおいて使用され得る。
【０６６０】
植物の稔性段階を増加させる
特定の実施形態では、本明細書に提供される方法及びシステムは、イネ植物のような植物の稔性段階を延長するために使用される。例えば、Ｅｈｄ３のようなイネの稔性段階遺伝子は遺伝子において変異を生成するために標的化され得、小植物は延長された再生植物の稔性段階のために選択され得る（ＣＮ １０４００４７８２において説明されるように）。
【０６６１】
目的の作物における遺伝子変異を生成するためのＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの使用
作物植物における野生型遺伝資源の利用可能性及び遺伝的変異は作物改良プログラムの鍵であるが、作物植物からの遺伝資源において利用可能な多様性は限定される。本発明は、目的の遺伝資源における多様な遺伝的変異を生成するための方法を想定する。ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムのこの用途では、植物ゲノムにおける異なる位置を標的化するガイドＲＮＡのライブラリは、提供され、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及びアデノシン

デアミナーゼと共に植物細胞に導入される。このように、ゲノムスケールの点変異及び遺伝子ノックアウトの集合は、生成され得る。特定の実施形態では、方法は、そのように得られた細胞から植物部分または植物を生成することと、目的の形質について細胞をスクリーニングすることとを含む。標的遺伝子は、コード領域及び非コード領域の両方を含むことができる。特定の実施形態では、形質はストレス耐性であり、方法はストレス耐性作物品種の生成のための方法である。

【０６６２】

果実登熟に影響するＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲの使用

登熟は果物及び野菜の成熟プロセスの正常な相である。登熟が始まった後わずか数日で、登熟は果物または野菜を食べられないようにしてしまう。このプロセスは、農家及び消費者の両方に著しい損失をもたらす。特定の実施形態では、本発明の方法は、エチレン産生を低減させるために使用される。このことは、以下のうち１つ以上を確実にすることによって確実にされる。ａ．ＡＣＣシンターゼ遺伝子発現の抑制ＡＣＣ（１－アミノシクロプロパン－１－カルボン酸）シンターゼは、Ｓ－アデノシルメチオニン（ＳＡＭ）のＡＣＣへの転換を担う酵素であり、エチレン生合成における第２から最後のステップである。シンターゼ遺伝子のアンチセンス（「鏡像」）または切断されたコピーが植物のゲノムに挿入される際、酵素発現は阻害される。ｂ．ＡＣＣデアミナーゼ遺伝子の挿入酵素についての遺伝子コードは、一般的な非病原性土壌細菌であるＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｃｈｌｏｒａｐｈｉｓから得られる。それはＡＣＣを異なる化合物に変換し、それによってエチレン産生のために利用可能なＡＣＣの量を低減させる。ｃ．ＳＡＭヒドロラーゼ遺伝子の挿入。このアプローチはＡＣＣデアミナーゼと同様であり、その前駆代謝産物の量が低減する際、エチレン産生が阻害され、この場合、ＳＡＭはホモセリンに変換される。酵素の遺伝子コードは、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｔ３バクテリオファージから得られ、ｄ．ＡＣＣオキシダーゼ遺伝子発現の抑制ＡＣＣオキシダーゼは、エチレン生体合成経路の最後のステップであるＡＣＣのエチレンへの酸化を触媒する酵素である。本明細書に記載の方法を使用して、ＡＣＣオキシダーゼ遺伝子の下方調節は、エチレン産生の抑制をもたらし、それによって果実の登熟を遅延させる。特定の実施形態では、上記に記載の修飾に対して追加的または代替的に、本明細書に記載の方法は、エチレン受容体を修飾するために使用され、果実によって得られるエチレンシグナルに干渉する。特定の実施形態では、エチレン結合タンパク質をコードするＥＴＲ１遺伝子の発現が修飾され、より具体的には抑制される。特定の実施形態では、上記に記載の修飾に対して追加的または代替的に、本明細書に記載の方法は、植物細胞壁の完全性を維持する物質であるペクチンの分解を担う酵素であるポリガラクツロナーゼ（ＰＧ）をコードする遺伝子の発現を修飾するために使用される。ペクチンの分解は、登熟プロセスの開始時に起こり、果実の軟化をもたらす。したがって、特定の実施形態では、本明細書に記載される方法は、ＰＧ酵素の量を低減させ、それによってペクチン分解を遅延させるために、ＰＧ遺伝子において変異を導入するためか、またはＰＧ遺伝子の活性化を抑制するために使用される。

【０６６３】

したがって、特定の実施形態では、方法は、上記に記載される植物細胞のゲノムの１つ以上の修飾を確実にするためのＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの使用と、それから植物を再生することとを含む。特定の実施形態では、植物は、トマト植物である。

【０６６４】

植物の貯蔵寿命を増加させる

特定の実施形態では、本発明の方法は、植物または植物部分の貯蔵寿命に影響する化合物の産生に関わる遺伝子を修飾するために使用される。より具体的には、修飾は、ジャガイモ塊茎における還元糖の蓄積を防ぐ遺伝子における。高温処理時には、これらの還元糖は遊離アミノ酸と反応し、褐色で苦味のある産物と、潜在的な発がん性物質であるアクリルアミドの上昇したレベルをもたらす。特定の実施形態では、本明細書に提供される方法は、ショ糖をグルコース及びフルクトースに分解するタンパク質をコードする液胞インベルターゼ遺伝子（ＶＩｎｖ）の発現を低減または阻害するために使用される（Ｃｌａｓｅ

ｎ ｅ ｔ ａ ｌ．ＤＯＩ：１０．１１１１／ｐｂｉ．１２３７０）。
【０６６５】
価値付加形質を確実にするためのＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの使用
特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、栄養的に改良された農作物を生産するために使用される。特定の実施形態では、本明細書に提供される方法は、「機能的食品」、すなわち、それが含有する従来の栄養素を超えて健康利益を提供し得る修飾された食品もしくは食品成分、及びまたは「栄養補強食品」、すなわち、食品もしくは食品の一部と考えられ得、疾患の予防及び治療を含む健康利益を提供する物質を生成するように適合される。特定の実施形態では、栄養補強食品は、本発明及び／またはがん、糖尿病、心血管疾患、及び高血圧のうちの１つ以上の予防及び／または治療において有用である。
【０６６６】
栄養的に改良された作物の例は以下を含む（Ｎｅｗｅｌｌ－ＭｃＧｌｏｕｇｈｌｉｎ，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ，Ｊｕｌｙ ２００８，Ｖｏｌ．１４７，ｐｐ．９３９－９５３）：
【０６６７】
バヒアグラス（Ｌｕｃｉａｎｉ ｅｔ ａｌ．２００５，Ｆｌｏｒｉｄａ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ Ｐｏｓｔｅｒ）、キャノーラ（Ｒｏｅｓｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ １１３ ７５－８１）、トウモロコシ（Ｃｒｏｍｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ，１９６７，１９６９ Ｊ Ａｎｉｍ Ｓｃｉ ２６ １３２５－１３３１、Ｏ’Ｑｕｉｎ ｅｔ ａｌ．２０００ Ｊ Ａｎｉｍ Ｓｃｉ ７８ ２１４４－２１４９、Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．２００２，Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｒｅｓ １１ １１－２０、Ｙｏｕｎｇ ｅｔ ａｌ．２００４，Ｐｌａｎｔ Ｊ ３８ ９１０－９２２）、ジャガイモ（Ｙｕ Ｊ ａｎｄ Ａｏ，１９９７ Ａｃｔａ Ｂｏｔ Ｓｉｎ ３９ ３２９－３３４、Ｃｈａｋｒａｂｏｒｔｙ ｅｔ ａｌ．２０００，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９７ ３７２４－３７２９、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．２００１）Ｃｈｉｎ Ｓｃｉ Ｂｕｌｌ ４６ ４８２－４８４、イネ（Ｋａｔｓｕｂｅ ｅｔ ａｌ．１９９９，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ １２０ １０６３－１０７４）、ダイズ（Ｄｉｎｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ．２００１，Ｒａｐｐ ２００２，Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖ Ｂｉｏｌ Ｐｌａｎｔ ３７ ７４２－７４７）、サツマイモ（Ｅｇｎｉｎ ａｎｄ Ｐｒａｋａｓｈ １９９７，Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖ Ｂｉｏｌ ３３ ５２Ａ）について説明されているような修飾されたタンパク質の質、含有量、及び／またはアミノ酸組成物。
【０６６８】
キャノーラ（Ｆａｌｃｏ ｅｔ ａｌ．１９９５，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １３ ５７７－５８２）、ルピナス（Ｗｈｉｔｅ ｅｔ ａｌ．２００１，Ｊ Ｓｃｉ Ｆｏｏｄ Ａｇｒｉｃ ８１ １４７－１５４）、トウモロコシ（Ｌａｉ ａｎｄ Ｍｅｓｓｉｎｇ，２００２，Ａｇｂｉｏｓ ２００８ ＧＭ ｃｒｏｐ ｄａｔａｂａｓｅ（Ｍａｒｃｈ １１，２００８））、ジャガイモ（Ｚｅｈ ｅｔ ａｌ．２００１，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ １２７ ７９２－８０２）、ソルガム（Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．２００３，Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｄｏｒｄｒｅｃｈｔ，Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ，ｐｐ４１３－４１６）、ダイズ（Ｆａｌｃｏ ｅｔ ａｌ．１９９５ Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １３ ５７７－５８２、Ｇａｌｉｌｉ ｅｔ ａｌ．２００２ Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｐｌａｎｔ Ｓｃｉ ２１ １６７－２０４）について説明されているような必須アミノ酸含有量。
【０６６９】
キャノーラ（Ｄｅｈｅｓｈ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｌａｎｔ Ｊ ９ １６７－１７２［ＰｕｂＭｅｄ］、Ｄｅｌ Ｖｅｃｃｈｉｏ（１９９６）ＩＮＦＯＲＭ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｎｅｗｓ ｏｎ Ｆａｔｓ，Ｏｉｌｓ ａｎｄ Ｒｅｌａｔｅｄ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ ７ ２３０－２４３、Ｒｏｅｓｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９７）

Plant Physiol 113 75－81［PMC free article］［PubMed］、Froman and Ursin（2002, 2003）Abstracts of Papers of the American Chemical Society 223 U35、James et al.（2003）Am J Clin Nutr 77 1140－1145［PubMed］、Agbios（2008、上記）、coton（Chapman et al.（2001）. J Am Oil Chem Soc 78 941－947、Liu et al.（2002）J Am Coll Nutr 21 205S－211S［PubMed］、O'Neill（2007）Australian Life Scientist. http://www.biotechnews.com.au/index.php/id;86694817;fp;4;fpid;2（June 17, 2008）、亜麻仁（Abbadi et al., 2004, Plant Cell 16：2734－2748）、トウモロコシ（Young et al., 2004, Plant J 38 910－922）、アブラヤシ（Jalani et al. 1997, J Am Oil Chem Soc 74 1451－1455、Parveez, 2003, AgBiotechNet 113 1－8）、イネ（Anai et al., 2003, Plant Cell Rep 21 988－992）、ダイズ（Reddy and Thomas, 1996, Nat Biotechnol 14 639－642、Kinney and Kwolton, 1998, Blackie Academic and Professional, London, pp193－213）、ヒマワリ（Arcadia, Biosciences 2008）についてのような油及び脂肪酸

【0670】

チコリー（Smeekens（1997）Trends Plant Sci 2 286－287、Sprenger et al.（1997）FEBS Lett 400 355－358、Sevenier et al.（1998）Nat Biotechnol 16 843－846）、トウモロコシ（Caimi et al.（1996）Plant Physiol 110 355－363）、ジャガイモ（Hellwege et al., 1997 Plant J 12 1057－1065）、テンサイ（Smeekens et al. 1997、上記）について説明されるフルクタンのような炭水化物、ジャガイモ（Hellewege et al. 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97 8699－8704）について説明されるようなイヌリン、イネ（Schwall et al.（2000）Nat Biotechnol 18 551－554、Chiang et al.（2005）Mol Breed 15 125－143）について説明されるようなデンプン、

【0671】

キャノーラ（Shintani and DellaPenna（1998）Science 282 2098－2100、トウモロコシ（Rocheford et al.（2002）. J Am Coll Nutr 21 191S－198S、Cahoon et al.（2003）Nat Biotechnol 21 1082－1087、Chen et al.（2003）Proc Natl Acad Sci USA 100 3525－3530）、マスタードシード（Shewmaker et al.（1999）Plant J 20 401－412、ジャガイモ（Ducreux et al., 2005, J Exp Bot 56 81－89）、イネ（Ye et al.（2000）Science 287 303－305、イチゴ（Agius et al.（2003）, Nat Biotechnol 21 177－181）、トマト（Rosati et al.（2000）Plant J 24 413－419、Fraser et al.（2001）J Sci Food Agric 81 822－827、Mehta et al.（2002）Nat Biotechnol 20 613－618、Diaz de la Garza et al.（2004）Proc Natl Acad Sci USA 101 13720－137

２５、Ｅｎｆｉｓｓｉ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ ３ １７－２７、ＤｅｌｌａＰｅｎｎａ（２００７）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １０４ ３６７５－３６７６について説明されるようなビタミン及びカロテノイド。

【０６７２】

リンゴ（ｓｔｉｌｂｅｎｅｓ、Ｓｚａｎｋｏｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐ ２２：１４１－１４９）、アルファルファ（レスベラトロール、Ｈｉｐｓｋｉｎｄ ａｎｄ Ｐａｉｖａ（２０００）Ｍｏｌ Ｐｌａｎｔ Ｍｉｃｒｏｂｅ Ｉｎｔｅｒａｃｔ １３ ５５１－５６２）、キウイ（レスベラトロール、Ｋｏｂａｙａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐ １９ ９０４－９１０）、トウモロコシ及びダイズ（フラボノイド、Ｙｕ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ １２４ ７８１－７９４）、ジャガイモ（アントシアニン及びアルカロイドグリコシド、Ｌｕｋａｓｚｅｗｉｃｚ ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｊ Ａｇｒｉｃ Ｆｏｏｄ Ｃｈｅｍ ５２ １５２６－１５３３）、イネ（フラボノイド及びレスベラトロール、Ｓｔａｒｋ－Ｌｏｒｅｎｚｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐ １６ ６６８－６７３、Ｓｈｉｎ ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ ４ ３０３－３１５）、トマト（＋レスベラトロール、クロロゲン酸、フラボノイド、スチルベン、Ｒｏｓａｔｉ ｅｔ ａｌ．（２０００）上記、Ｍｕｉｒ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ １９ ４７０－４７４、Ｎｉｇｇｅｗｅｇ ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２２ ７４６－７５４、Ｇｉｏｖｉｎａｚｚｏ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｊ ３ ５７－６９）、コムギ（コーヒー酸及びフェルラ酸、レスベラトロール、Ｕｎｉｔｅｄ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ（２００２））について説明されるような機能的二次代謝産物、ならびに

【０６７３】

アルファルファ（フィターゼ、Ａｕｓｔｉｎ－Ｐｈｉｌｌｉｐｓ ｅｔ ａｌ．（１９９９）ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｍｏｌｅｃｕｌａｒｆａｒｍｉｎｇ．ｃｏｍ／ｎｏｎｍｅｄｉｃａｌ．ｈｔｍｌ）、レタス（Ｇｏｔｏ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｔｈｅｏｒ Ａｐｐｌ Ｇｅｎｅｔ １００ ６５８－６６４）、イネ（鉄、Ｌｕｃｃａ ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｊ Ａｍ Ｃｏｌｌ Ｎｕｔｒ ２１ １８４Ｓ－１９０Ｓ）、トウモロコシ、ダイズ、及びコムギ（ｗｈｅａｔｅ）（フィターゼ、Ｄｒａｋａｋａｋｉ ｅｔ ａｌ．（２００５）Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ５９ ８６９－８８０、Ｄｅｎｂｏｗ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｐｏｕｌｔ Ｓｃｉ ７７ ８７８－８８１、Ｂｒｉｎｃｈ－Ｐｅｄｅｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｍｏｌ Ｂｒｅｅｄ ６ １９５－２０６）について説明されるような無機物利用可能性。

【０６７４】

特定の実施形態では、価値付加形質は、植物において存在する化合物の想定された健康利益に関する。例えば、特定の実施形態では、付加価値作物は、本発明の方法を適用することによって、以下の化合物の１つ以上の修飾を確実にするか、または以下の化合物の１つ以上の合成を誘導／増加させることによって得られる。

・細胞に損傷を与えることができるフリーラジカルを中和するニンジンに存在するα－カロテン、またはフリーラジカルを中和する様々な果物や野菜に存在するβ－カロテンのようなカロテノイド；

・健康な視力の維持に貢献する緑色野菜に存在するルテイン；

・前立腺がんのリスクを低減すると考えられるトマト、トマト製品に存在するリコペン；

・健康な視力の維持に貢献する柑橘類やトウモロコシに存在するゼアキサンチン

・乳癌及び／または大腸癌のリスクを低減することができるコムギふすまに存在する不溶性繊維、及びエンバクに存在するβ－グルカン、心血管疾患（ＣＶＤ）のリスクを低減することができるサイリウム（Ｐｓｙｌｉｕｍ）及び全穀粒に存在する可溶性繊維のよう

な食物繊維；
・ＣＶＤのリスクを低減させ、精神機能及び視覚機能を向上させることができるω－３脂肪酸、体組成を向上させることができる共役リノール酸のような脂肪酸は、ある特定のがんのリスクを減少させることができ、がん及びＣＶＤの炎症リスクを低減させることができるＧＬＡは、体組成を向上させることができる；
・抗酸化剤様活性を有するコムギに存在するヒドロキシ桂皮酸塩のようなフラボノイドは変性疾患のリスクを低減することができ、フリーラジカルを中和しがんのリスクを低減することができる果物及び野菜に存在するフラボノイド、カテキン及びタンニン；
・フリーラジカルを中和するアブラナ科野菜（ブロッコリー、ケール）、セイヨウワサビに存在するスルフォラファンのようなグルコシノレート、インドール、イソチオシアネートは、がんのリスクを低減することができる；
・変性疾患、心臓疾患、及びがんのリスクを低減することができるブドウに存在するスチルベンのようなフェノール類は寿命効果を有することができ、抗酸化剤様活性を有する野菜及び柑橘類に存在するコーヒー酸及びフェルラ酸は変性疾患、心臓疾患、及び眼疾患のリスクを低減することができ、抗酸化剤様活性を有するカカオに存在するエピカテキンは変性疾患及び心臓疾患のリスクを低減することができる；
・血液コレステロールを低下させることにより冠動脈疾患のリスクを低減させることができるトウモロコシ、ダイズ、コムギ、及び木製の油（ｗｏｏｄｅｎ　ｏｉｌ）に存在する植物スタノール／ステロール
・胃腸の健康を向上させることができるキクイモ、シャロット、タマネギ粉末に存在するフルクタン、イヌリン、フルクトオリゴ糖；
・ＬＤＬコレステロールを低下させることができるダイズに存在するサポニン；
・心臓疾患のリスクを低減させることができるダイズに存在するダイズタンパク質；
・ホットフラッシュのような更年期症状を低減することができるダイズに存在するイソフラボンのような植物エストロゲンは骨粗鬆症及びＣＶＤを低減することができ、心臓疾患及びいくつかのがんに対して保護することができるアマ、ライムギ及び野菜に存在するリグナンはＬＤＬコレステロール、総コレステロールを低下させることができる。；
・タマネギ、ニンニク、オリーブ、リーキ及びスカロン（ｓｃａｌｌｏｎ）に存在する硫化ジアリルのような硫化物及びチオール、ならびにＬＤＬコレステロールを低下させることができるアブラナ科の野菜に存在するアリルメチルトリスルフィド、ジチオールチオンは、健康な免疫システムの維持に役立つ；そして
・尿路の健康を向上することができるクランベリー、ココアに存在するプロアントシアニジンのようなタンニンは、ＣＶＤ及び高血圧のリスクを低減させることができる。

【０６７５】
加えて、本発明の方法は、タンパク質／デンプンの機能性、保存寿命、味覚／審美性、繊維の質、及びアレルゲン、抗栄養素、及び毒素還元形質を修飾することも想定する。

【０６７６】
したがって、本発明は、栄養付加価値を有する植物を生産するための方法を包含し、該方法は、本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを使用して、付加栄養価値の成分の産生に関与する酵素をコードする遺伝子を植物細胞に導入することと、該植物細胞から植物を再生することと、を含み、該植物は、付加栄養価値の該成分の増加発現に特徴付けられる。特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、間接的にこれらの化合物の内因性合成を修飾するために使用され、例えば、この化合物の代謝を制御する１つ以上の転写因子を修飾することによる。目的の遺伝子を植物細胞に導入する方法及び／またはＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを使用して内因性遺伝子を修飾する方法は、上記の本明細書に記載される。

【０６７７】
価値付加形質を付与するために修飾されている植物における修飾のいくつかの具体例は、例えば、ステアリル－ＡＣＰ不飽和化酵素のアンチセンス遺伝子を有する植物を形質転換して、植物のステアリン酸含有量を増加させることによって、修飾された脂肪酸代謝を

有する植物である。Ｋｎｕｌｔｚｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８９：２６２４（１９９２）を参照されたい。別の例は、例えば、クローニングによってフィチン酸の含有量を減少させることと、次いで、低レベルのフィチン酸により特徴付けられるトウモロコシ変異体を担い得る単一の対立遺伝子に関連するＤＮＡを再導入することと、を伴う。Ｒａｂｏｙ ｅｔ ａｌ，Ｍａｙｄｉｃａ ３５：３８３（１９９０）を参照されたい。

【０６７８】

同様に、強力なプロモーターの制御下でトウモロコシ糊粉層におけるフラボノイドの産生を調節するトウモロコシ（Ｚｅａ ｍａｙｓ）Ｔｆｓ Ｃ１及びＲの発現は、おそらく経路全体を活性化することによって、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ ｔｈａｌｉａｎａ）におけるアントシアニンの高い蓄積率をもたらした（Ｂｒｕｃｅ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ １２：６５－８０）。ＤｅｌｌａＰｅｎｎａ（Ｗｅｌｓｃｈ ｅｔ ａｌ．，２００７ Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｐｌａｎｔ Ｂｉｏｌ ５７：７１１－７３８）は、Ｔｆ ＲＡＰ２．２及びその相互作用パートナーＳＩＮＡＴ２が、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ葉におけるカロテノイド生合成を増加させることを発見した。Ｔｆ Ｄｏｆ１を発現させることは、炭素骨格産生のための酵素をコードする遺伝子の上方調節、アミノ酸含有量の顕著な増加、及びトランスジェニックＡｒａｂｉｄｏｐｓｉｓにおけるＧｌｃレベルの低減を誘導し（Ｙａｎａｇｉｓａｗａ，２００４ Ｐｌａｎｔ Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ ４５：３８６－３９１）ＤＯＦ Ｔｆ ＡｔＤｏｆ１．１（ＯＢＰ２）は、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓにおけるグルコシノレート生合成経路の全てのステップを上方調節した（Ｓｋｉｒｙｃｚ ｅｔ ａｌ．，２００６ Ｐｌａｎｔ Ｊ ４７：１０－２４）。

【０６７９】

植物におけるアレルゲンを低減させる

特定の実施形態では、本明細書に提供される方法は、低減されたレベルのアレルゲンを有する植物を生成するために使用され、消費者にとってそれらをより安全にする。特定の実施形態では、方法は、植物アレルゲンの産生を担う１つ以上の遺伝子の発現を修飾することを含む。例えば、特定の実施形態では、本方法は、ライグラス植物細胞等の植物細胞におけるＬｏｌ ｐ５遺伝子の発現を下方調節することと、そこから植物を再生して、該植物の花粉のアレルゲン性を低減することと、を含む（Ｂｈａｌｌａ ｅｔ ａｌ．１９９９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ Ｖｏｌ．９６：１１６７６－１１６８０）。

【０６８０】

ピーナッツアレルギーや豆類アレルギーは、一般的に本当に深刻な健康の問題である。本発明のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、かかる豆類のアレルゲンタンパク質をコードする遺伝子を特定し、次いで変異させるために使用され得る。かかる遺伝子及びタンパク質に限定しないが、Ｎｉｃｏｌａｏｕ ｅｔ ａｌ．は、ピーナッツ、ダイズ、レンズマメ、エンドウマメ、ルピナス、サヤインゲン、及びリョクトウにおけるアレルゲンタンパク質を特定する。例えば、Ｎｉｃｏｌａｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ａｌｌｅｒｇｙ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２０１１；１１（３）：２２２）を参照されたい。

【０６８１】

目的の内因性遺伝子のスクリーニング方法

本明細書に提供される方法は、さらに、付加栄養価の成分の生成に関わる酵素をコードする価値のある遺伝子、または一般的に、目的の農学的形質に影響する遺伝子を、種、門、及び植物界にわたって特定することを可能にする。本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ系を使用して、例えば、植物における代謝経路の酵素をコードする遺伝子を選択的に標的化することによって、植物の特定の栄養的態様を担う遺伝子を特定することができる。同様に、望ましい農学的形質に影響し得る遺伝子を選択的に標的化することによって、関連する遺伝子を特定することができる。したがって、本発明は、特定の栄養価及び／

または農学的形質を有する化合物の生成に関わる酵素をコードする遺伝子のスクリーニング方法を包含する。

【０６８２】

植物及び酵母におけるＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムのさらなる適用

バイオ燃料生成におけるＡＤ官能価ＣＲＩＳＰＲシステムの使用

本明細書で使用される用語「バイオ燃料」は、植物由来及び植物由来の資源から作製される代替燃料である。再生可能なバイオ燃料は、炭素固定プロセスによってエネルギーが得られた、またはバイオマスの使用もしくは変換によって作製された有機物から抽出することができる。このバイオマスは、バイオ燃料に直接使用することができるか、または熱変換、化学変換、及び生化学変換によって便利なエネルギー含有物質に変換することができる。このバイオマス変換は、固体、液体、またはガス形態の燃料をもたらすことができる。バイオエタノール及びバイオディーゼルの２つの種類のバイオ燃料が存在する。バイオエタノールは、主に、大半がメイズおよびサトウキビに由来するセルロース（でんぷん）の糖発酵プロセスによって生成される。一方で、バイオディーゼルは、主に、レイプシード、ヤシ、及び大豆などの油作物から生成される。バイオ燃料は、主に、輸送に使用される。

【０６８３】

バイオ燃料生成のためのプラント特性の強化

特定の実施形態では、本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを使用する方法は、発酵のための糖のより効率的な放出のための重要な加水分解剤によるアクセスを容易にするために、細胞壁の特性を変更するために使用される。特定の実施形態では、セルロース及び／またはリグニンの生合成は修飾されている。セルロースは、細胞壁の主成分である。セルロース及びリグニンの生合成は共調節される。植物におけるリグニンの割合を低減することで、セルロースの割合を増加することができる。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、発酵性炭水化物を増加させるために、植物におけるリグニン生合成を下方制御するために使用される。より具体的には、本明細書に記載の方法は、ＷＯ２００８０６４２８９Ａ２に開示されるように、４－クマル酸３－ヒドロキシラーゼ（Ｃ３Ｈ）、フェニルアラニンアンモニア－リアーゼ（ＰＡＬ）、シンナメート４－ヒドロキシラーゼ（Ｃ４Ｈ）、ヒドロキシシシンナモイルトランスフェラーゼ（ＨＣＴ）、カフェイン酸Ｏ－メチルトランスフェラーゼ（ＣＯＭＴ）、カフェオイルＣｏＡ３－Ｏ－メチルトランスフェラーゼ（ＣＣｏＡＯＭＴ）、フェルレート５－ヒドロキシラーゼ（Ｆ５Ｈ）、シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ（ＣＡＤ）、シンナモイルＣｏＡ－リダクターゼ（ＣＣＲ）、４－クマル酸－ＣｏＡリガーゼ（４ＣＬ）、モノリグノリノール－リグニン特異的グリコシルトランスフェラーゼ、及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ＡＬＤＨ）からなる群から選択される少なくとも第１のリグニン生合成遺伝子を下方制御するために使用される。

【０６８４】

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、発酵中により低いレベルの酢酸を生成する植物量を生成するために使用される（ＷＯ２０１００９６４８８もまた参照されたい）。より具体的には、本明細書に開示される方法は、Ｃａｓｌ Ｌへの相同体における変異を生成し、多糖類アセチル化を低減するために使用される。

【０６８５】

バイオ燃料生成のための酵母の修飾

特定の実施形態では、本明細書に提供されるＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、組換え微生物によるバイオエタノール生成に使用される。例えば、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを使用して、酵母などの微生物を操作して、発酵性糖からバイオ燃料またはバイオポリマーを生成し、任意選択で、農業廃棄物に由来する植物由来リグノセルロースを発酵性糖の源として分解することができる。いくつかの実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、バイオ燃料生成経路と競合する内因性代謝経路を修飾するために使用される。

【０６８６】
したがって、より特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、以下のように微生物を修飾するために使用される：該宿主細胞内の代謝経路における酵素をコードする少なくとも１つの核酸を修飾するために使用され、該経路は、ピルビン酸塩からのアセトアルデヒドまたはアセトアルデヒドからのエタノール以外の代謝産物を生成し、該修飾は、該代謝産物の低減された生成をもたらすか、あるいは該酵素の阻害剤をコードする少なくとも１つの核酸を導入するために使用される。
【０６８７】
植物油またはバイオ燃料の生成のための藻及び植物の修飾
トランスジェニック藻またはレイプなどの他の植物は、例えば、植物油またはアルコールなどのバイオ燃料（特にメタノール及びエタノール）の生成に特に有用であり得る。これらは、石油またはバイオ燃料産業における使用のための高レベルの石油またはアルコールを発現または過剰発現するように設計され得る。
【０６８８】
本発明の特定の実施形態によれば、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを使用して、バイオ燃料生成に有用な、脂質の豊富な珪藻を生成する。
【０６８９】
特定の実施形態では、脂質の量及び／または藻細胞によって生成される脂質の質の修飾に関与する遺伝子を特異的に修飾することが想定される。脂肪酸合成の経路に関与する酵素をコードする遺伝子の例は、例えば、アセチル－ＣｏＡカルボキシラーゼ、脂肪酸シンターゼ、３－ケトアシル＿アシル－担体タンパク質シンターゼＩＩＩ、グリセロール－３－ホスペートデスヒドロゲナーゼ（Ｇ３ＰＤＨ）、エノイル－アシル担体タンパク質リダクターゼ（エノイル－ＡＣＰ－リダクターゼ）、グリセロール－３－リン酸アシルトランスフェラーゼ、リソホスファチジンアシルトランスフェラーゼもしくはジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ、リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ、ホスファチジン酸ホスファターゼ、パルミトイタンパク質チオエステラーゼなどの脂肪酸チオエステラーゼ、またはリンゴ酸酵素活性を有するタンパク質をコードすることができる。さらなる実施形態では、増加された脂肪蓄積を有する珪藻を生成することが想定される。これは、脂質の分解を減少させる遺伝子を標的化することによって達成され得る。本発明の方法における使用に特に関心があるのは、トリアシルグリセロール及び遊離脂肪酸の両方の活性化に関与する遺伝子、ならびにアシル－ＣｏＡシンテターゼ、３－ケトアシル－ＣｏＡチオラーゼ、アシル－ＣｏＡオキシダーゼ活性及びホスホグルコムターゼなどの脂肪酸のβ－酸化に直接関与する遺伝子である。本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステム及び方法を使用して、それらの脂質含有量を増加させるように珪藻土中のかかる遺伝子を特異的に活性化することができる。
【０６９０】
合成生物学には微小藻類などの生物が広く使用される。Ｓｔｏｖｉｃｅｋ ｅｔ ａｌ．（Ｍｅｔａｂ．Ｅｎｇ．Ｃｏｍｍ．，２０１５；２：１３）は、工業用酵母、例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓａｅのゲノム編集を説明し、工業用生成のためのロバストな株を効率的に生成する。Ｓｔｏｖｉｃｅｋは、酵母にコドン最適化されたＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９システムを使用して、内因性遺伝子の両方の対立遺伝子を同時に破壊し、異種遺伝子をノックした。Ｃａｓ９およびガイドＲＮＡは、ゲノムまたはエピソーム２μベースのベクター位置から発現された。著者らはまた、Ｃａｓ９のレベルの最適化及びＲＮＡ発現の誘導によって遺伝子破壊効率が改善され得ることを示した。Ｈｌａｖｏｖａ ｅｔ ａｌ．（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ａｄｖ．２０１５）は、は、挿入変異誘発及びスクリーニングのために核遺伝子及びクロロプラスト遺伝子を標的にするためのＣＲＩＳＰＲなどの技術を使用した微小藻類の種または株の開発について論じている。
【０６９１】
ＵＳ８９４５８３９は、Ｃａｓ９を使用して微細藻類（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ細胞）種）を操作するための方法を記載している。同様のツール

を使用すると、本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの方法は、Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ種及び他の藻類に適用され得る。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質（例えば、Ｃａｓ１３）、アデノシンデアミナーゼ（ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質またはアプタマー結合アダプタータンパク質に融合され得る）、及びガイドＲＮＡは、Ｈｓｐ７０Ａ－Ｒｂｃ　Ｓ２またはＢｅｔａ２－チューブリンなどの構成的プロモーターの制御下で、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓタンパク質及び任意選択的にアデノシンデアミナーゼを発現するベクターを使用して発現される藻類中に導入される。ガイドＲＮＡは、Ｔ７プロモーターを含むベクターを使用して送達される。あるいは、ｍＲＮＡ及びインビトロで転写されたガイドＲＮＡは、藻類細胞に送達され得る。電気穿孔プロトコルは、ＧｅｎｅＡｒｔ　Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ操作キットからの標準的な推奨プロトコルに従う。

【０６９２】

脂肪酸生成が可能な微生物の生成におけるＡＤ官能性ＣＲＩＳＰＲシステムの使用

特定の実施形態では、本発明の方法は、脂肪酸メチルエステル（「ＦＡＭＥ」）及び脂肪酸エチルエステル（「ＦＡＥＥ」）などの脂肪エステルの生成が可能な遺伝子操作された微生物の生成に使用され、

【０６９３】

典型的には、宿主細胞は、チオエステラーゼをコードする遺伝子、アシル－ＣｏＡシンターゼをコードする遺伝子、及びエステルシンターゼをコードする遺伝子の発現または過剰発現によって、培地に存在するアルコールなどの炭素源から脂肪エステルを生成するように操作され得る。したがって、本明細書に提供される方法は、チオエステラーゼ遺伝子、アシル－ＣｏＡシンターゼをコードする遺伝子、及びエステルシンターゼをコードする遺伝子を過剰発現または導入するように微生物を修飾するために使用される。特定の実施形態では、チオエステラーゼ遺伝子は、ｔｅｓＡ、’ｔｅｓＡ、ｔｅｓＢ、ｆａｔＢ、ｆａｔＢ２、ｆａｔＢ３、ｆａｔＡｌ、またはｆａｔＡから選択される。特定の実施形態では、アシル－ＣｏＡシンターゼをコードする遺伝子は、ｆａｄＤＪａｄＫ、ＢＨ　３１０３、ｐｆｌ　－４３５４、ＥＡＶ　１５０２３、ｆａｄＤｌ、ｆａｄＤ　２、ＲＰＣ＿４０７４、ｆａｄＤＤ　３５、ｆａｄＤＤ　２２、ｆａａ　３９、または同じ特性を有する酵素をコードする特定の遺伝子から選択される。特定の実施形態では、エステルシンターゼをコードする遺伝子は、シンターゼ／アシル－ＣｏＡ：Ｓｉｍｍｏｎｄｓｉａ　ｃｈｉｎｅｎｓｉｓ、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．ＡＤＰ、Ａｌｃａｎｉｖｏｒａｘ　ｂｏｒｋｕｍｅｎｓｉｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｆｕｎｄｉｂａｃｔｅｒ　ｊａｄｅｎｓｉｓ、Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ｔｈａｌｉａｎａ、もしくはＡｌｋａｌｉｇｅｎｅｓ　ｅｕｔｒｏｐｈｕｓ、またはそれらのバリアントからのシアシルグリセリルアシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。

さらにまたは代替的に、本明細書に提供される方法は、アシル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、外膜タンパク質受容体をコードする遺伝子、及び脂肪酸生合成の転写調節因子をコードする遺伝子のうちの少なくとも１つの該微生物における発現を減少させるために使用される。特定の実施形態では、これらの遺伝子のうちの１つ以上は、変異の導入などによって不活性化される。

特定の実施形態では、アシル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、ｆａｄＥである。特定の実施形態では、脂肪酸生合成の転写調節因子をコードする遺伝子は、ＤＮＡ転写抑制因子、例えば、ｆａｂＲをコードする。

【０６９４】

さらにまたは代替的に、該微生物は、ピルビン酸ギ酸リアーゼをコードする遺伝子、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、または両方のうちの少なくとも１つの発現を低減するように修飾される。特定の実施形態では、ピルビン酸ギ酸リアーゼをコードする遺伝子は、ｐｆｌＢである。特定の実施形態では、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、ＩｄｈＡである。特定の実施形態では、これらの遺伝子のうちの１つ以上は、その中の変異の導入などによって不活性化される。

【０６９５】
特定の実施形態では、微生物は、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓｙｎｅｃｈｏｙｓｔｉｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ、Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ、Ｆｕｓａｒｉｕｍ、Ｈｕｍｉｃｏｌａ、Ｒｈｉｚｏｍｕｃｏｒ、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ、Ｐｉｃｈｉａ、Ｍｕｃｏｒ、Ｍｙｃｅｌｉｏｐｈｔｏｒａ、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ、Ｐｈａｎｅｒｏｃｈａｅｔｅ、Ｐｌｅｕｒｏｔｕｓ、Ｔｒａｍｅｔｅｓ、Ｃｈｒｙｓｏｓｐｏｒｉｕｍ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｓｔｅｎｏｔｒｏｐｈａｍｏｎａｓ、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｙａｒｒｏｗｉａ、またはＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ属から選択される。

【０６９６】
有機酸生成が可能な微生物の生成におけるＡＤ官能性ＣＲＩＳＰＲシステムの使用
本明細書に提供される方法は、有機酸生成が可能な微生物、より具体的にはペントース糖またはヘキソース糖を操作するためにさらに使用される。特定の実施形態では、方法は、微生物に外因性ＬＤＨ遺伝子を導入することを含む。特定の実施形態では、該微生物における有機酸生成は、目的の有機酸以外の代謝産物を生成する内因性代謝経路に関与するタンパク質をコードする内因性遺伝子を不活性化することによって、追加的または代替的に増加され、かつ／または内因性代謝経路は、有機酸を消費する。特定の実施形態では、修飾は、目的の有機酸以外の代謝産物の生成が低減されることを確実にする。特定の実施形態によれば、方法は、有機酸が消費される内因性経路または目的の有機酸以外の代謝産物を生成する内因性経路に関与する生成物をコードする遺伝子の少なくとも１つの操作された遺伝子欠失及び／または不活性化を導入するために使用される。特定の実施形態では、少なくとも１つの操作された遺伝子欠失または不活性化は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ｐｄｃ）、フマル酸リダクターゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ（ａｄｈ）、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（ｐｐｃ）、Ｄ－乳酸デヒドロゲナーゼ（ｄ－ｌｄｈ）、Ｌ－乳酸デヒドロゲナーゼ（ｌ－ｌｄｈ）、乳酸２－モノオキシゲナーゼからなる群から選択される酵素をコードする１つ以上の遺伝子にある。さらなる実施形態では、少なくとも１つの操作された遺伝子欠失及び／または不活性化は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ｐｄｃ）をコードする内因性遺伝子にある。

【０６９７】
さらなる実施形態では、微生物は、乳酸を生成するように操作され、少なくとも１つの操作された遺伝子欠失及び／または不活性化は、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする内因性遺伝子にある。さらにまたは代替的に、微生物は、細胞色素Ｂ２依存性Ｌ－乳酸デヒドロゲナーゼなどの細胞色素依存性乳酸デヒドロゲナーゼをコードする内因性遺伝子の少なくとも１つの操作された遺伝子欠失または不活性化を含む。

【０６９８】
酵母株を利用した改善されたキシロースまたはセロビオースの生成におけるＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの使用
特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを適用して、酵母株を利用した改善されたキシロースまたはセロビオースを選択してもよい。エラーが発生しやすいＰＣＲを使用して、キシロース利用またはセロビオース利用経路に関与する１つ（またはそれ以上）の遺伝子を増幅することができる。キシロース利用経路及びセロビオース利用経路に関与する遺伝子の例としては、限定することなく、Ｈａ，Ｓ．Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．（２０１１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１０８（２）：５０４－９及びＧａｌａｚｋａ，Ｊ．Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．（２０１０）Ｓｃｉｅｎｃｅ　３３０（６０００）：８４－６に記載されるものが挙げられ得る。そのような選択された遺伝子内にランダム変異をそれぞれ含む二本鎖ＤＮＡ分子の結果として生じるライブラリは、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの成分と酵母株（例えば、Ｓ２８８Ｃ）に共形質転換され得、株は、ＷＯ２０１５１３８８５５に記載されるように、増強されたキシロースまたはセロビ

オース利用能力で選択され得る。

【０６９９】

イソプレノイド生合成において使用するための改善された酵母株の生成におけるＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの使用

Ｔａｄａｓ Ｊａｋｏｃｉｕｎａｓ ｅｔ ａｌ．は、産業的に重要なイソプレノイド生合成経路の重要な中間体であるメバロン酸塩生成を有する株をもたらす、ベーカー酵母Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ（Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ Ｖｏｌｕｍｅ ２８，Ｍａｒｃｈ ２０１５，Ｐａｇｅｓ２１３－２２２）における１つの形質転換ステップにおいて、最大５つの異なるゲノム遺伝子座のゲノム工学のための多重ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９システムの成功した適用を説明した。特定の実施形態では、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、イソプレノイド合成において使用するための追加的な高生成酵母株を特定するために、本明細書に記載されるような多重ゲノム工学法で適用され得る。

【０７００】

植物および酵母細胞の改善

本発明はまた、本明細書に提供される方法によって得ることができるおよび得られる植物及び酵母細胞を提供する。本明細書に記載の方法によって得られる改善された植物は、例えば、植物害虫、除草剤、干ばつ、低温または高温、過剰な水などに対する耐性を確保する遺伝子の発現により、食品または飼料生産に有用であり得る。

【０７０１】

本明細書に記載の方法によって得られる改善された植物、特に作物及び藻類は、例えば、野生型において通常見られるよりも高いタンパク質、炭水化物、栄養素、またはビタミンレベルの発現により、食品または飼料生産に有用であり得る。これに関して、改善された植物、特にパルス及び塊根が好ましい。

【０７０２】

例えば、藻類またはレイプなどの他の植物の改良は、植物油またはアルコールなどのバイオ燃料（特にメタノール及びエタノール）の生成に特に有用であり得る。これらは、石油またはバイオ燃料産業における使用のための高レベルの石油またはアルコールを発現または過剰発現するように設計され得る。

【０７０３】

本発明はまた、植物の改善された部分を提供する。植物部分としては、これらに限定されないが、葉、茎、根、塊根、種子、内胚葉、卵巣、及び花粉が挙げられる。本明細書で想定されるような植物部分は、生存可能、生存不可能、再生可能、及び／または再生不可能であり得る。

【０７０４】

本発明の方法に従って生成された植物細胞及び植物を提供することも本明細書に包含される。伝統的な飼育方法によって生成される遺伝子修飾を含む植物の配子、種子、胚、接合体または体細胞のいずれか、子孫またはハイブリッドもまた、本発明の範囲内に含まれる。かかる植物は、標的配列に挿入された、または標的配列の代わりに挿入された異種または外来ＤＮＡ配列を含み得る。あるいは、かかる植物は、１つ以上のヌクレオチドにおける変化（変異、欠失、挿入、置換）のみを含み得る。したがって、そのような植物は、特定の修飾の存在によってそれらの祖先植物と異なるだけであろう。

【０７０５】

したがって、本発明は、本方法によって生成される植物、動物もしくは細胞、またはそれらの子孫を提供する。子孫は、生成された植物または動物のクローンであってもよく、または同じ種の他の個体と交差して、それら子孫にさらに望ましい形質を取り込むことによって性的生殖に起因してもよい。細胞は、多細胞生物、特に動物または植物の場合、インビボまたはエクスビボであり得る。

【０７０６】

本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを使用したゲノム編集方法を使用し

て、本質的に任意の植物、藻類、真菌、酵母などに所望の形質を付与することができる。多種多様な植物、藻類、真菌、酵母など及び植物藻類、真菌、酵母細胞または組織系は、本開示の核酸構築物及び上述の様々な形質転換方法を使用して、本明細書に記載の所望の生理学的及び農学的特性のために操作され得る。

【０７０７】

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、植物のゲノム内の外来ＤＮＡの存在を回避するために、ＣＲＩＳＰＲ成分をコードするものを含む任意の外来遺伝子の植物、藻類、真菌、酵母などのゲノム内の永続的な導入なしで、内因性遺伝子を修飾するか、またはそれらの発現を修飾するために使用される。非トランスジェニック植物に対する規制要件があまり厳密でないため、このことは興味深くあり得る。

【０７０８】

本明細書に記載される方法は、一般に、それらが野生型植物と比較して１つ以上の望ましい形質を有する点で、「改良された植物、藻類、真菌、酵母など」の生成をもたらす。特定の実施形態では、植物の細胞のいずれかのゲノム内に外因性ＤＮＡ配列が組み込まれないことから、非トランスジェニック遺伝子修飾された植物、藻類、真菌、酵母などの部分または細胞が得られる。そのような実施形態では、改善された植物、藻類、真菌、酵母などは、非トランスジェニックである。内因性遺伝子の修飾のみが確保され、植物、藻類、真菌、酵母などのゲノムに外来遺伝子が導入または維持されていない場合、得られた遺伝子修飾された作物は外来遺伝子を含まず、したがって、基本的に非トランスジェニックと見なすことができる。植物、藻類、真菌、酵母などのゲノム編集に対するＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの異なる用途としては、これらに限定されないが、目的の農業形質を付与するための内因性遺伝子の編集が挙げられる。農学的形質を付与する例示的な遺伝子としては、これらに限定されないが、害虫または疾患に対する耐性を付与する遺伝子、ＷＯ２０１３０４６２４７に列挙されるものなどの植物疾患に関与する遺伝子、除草剤、殺菌剤などに対する耐性を付与する遺伝子、（非生物的）ストレス耐性に関与する遺伝子が挙げられる。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの使用の他の態様としては、これらに限定されないが、（雄）無菌植物を作製すること、植物／藻類などにおける繁殖段階を増加させること、目的の作物における遺伝的変異を生成すること、果実の成熟に影響すること、植物／藻類などの貯蔵寿命を増加させること、植物／藻類などにおけるアレルゲンを低減させること、付加価値形質（例えば、栄養改善）を確保すること、目的の内因性遺伝子のスクリーニング方法、バイオ燃料、脂肪酸、有機酸などの生成が挙げられる。

【０７０９】

非ヒト生物において使用され得るＡＤ官能価ＣＲＩＳＰＲシステム

ある態様では、本発明は、記載の実施形態のいずれかによる真核宿主細胞を含む、非ヒト真核生物、好ましくは多細胞真核生物を提供する。他の態様では、本発明は、記載の実施形態のいずれかによる真核宿主細胞を含む、真核生物、好ましくは多細胞真核生物を提供する。これらの態様のいくつかの実施形態では、生物は、動物、例えば哺乳動物であってもよい。また、生物は、昆虫などの節足動物であってもよい。本発明はまた、例えば、農場動物及び生産動物などの他の農業用途にも拡張され得る。例えば、ブタは、特に再生医療において、バイオメディカルモデルとして魅力的となる多くの機能を有する。特に、重症複合免疫不全（ＳＣＩＤ）を有するブタは、再生医療、異種移植（本明細書の他の箇所でも議論される）、及び腫瘍発達のための有用なモデルを提供し得、ヒトＳＣＩＤ患者のための治療法の開発を支援する。Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．（Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２０１４ Ｍａｙ ２０；１１１（２０）：７２６０－５）は、レポーター誘導転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）システムを利用して、両方の対立遺伝子に影響するいくつかを含む、高効率で体細胞における組換え活性遺伝子（ＲＡＧ）２の標的修飾を生成した。ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムは、同様のシステムに適用され得る。

【０７１０】

Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．（Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２０１

４　Ｍａｙ　２０；１１１（２０）：７２６０－５）の方法は、以下のように本発明に類似して適用されてもよい。変異したブタは、胎児線維芽細胞におけるＲＡＧ２の標的修飾、続いてＳＣＮＴ及び胚移植によって生成される。ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ及びレポーターをコードする構築物は、胎児由来線維芽細胞に電気穿孔される。４８時間後、緑色蛍光タンパク質を発現するトランスフェクトされた細胞を、１ウェル当たり単一細胞の推定希釈で９６ウェルプレートの個々のウェルに選別する。ＲＡＧ２の標的修飾は、任意のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ切断部位に隣接するゲノムＤＮＡ断片を増幅し、続いてＰＣＲ産物をシークエンシングすることによってスクリーニングされる。スクリーニング及びオフサイト変異の欠如を確保した後、ＲＡＧ２の標的修飾を担持する細胞をＳＣＮＴに使用する。極性体は、メタ相ＩＩプレートを含有すると推定される卵巣の隣接細胞質の一部とともに除去され、ドナー細胞がペリビテリン中に配置される。次いで、再構築された胚を電気的に穿孔して、ドナー細胞を卵母細胞と融合させ、次いで化学的に活性化する。活性化された胚を、０．５μＭのスクリプタイド（Ｓ７８１７；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）とともに豚接合子用培地３（ＰＺＭ３）で１４～１６時間インキュベートする。次いで、胚を洗浄してスクリプタイドを除去し、それらが代理豚の卵管に移植されるまでＰＺＭ３で培養する。

【０７１１】

本発明はまた、ウシなどの他の動物のＳＮＰを修飾することにも適用可能である。Ｔａｎ　ｅｔ　ａｌ．（Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ．２０１３　Ｏｃｔ　８；１１０（４１）：１６５２６－１６５３１）は、家畜遺伝子編集ツールボックスを拡大して、転写活性化因子様（ＴＡＬ）エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）－と、プラスミド、ｒＡＡＶ、及びオリゴヌクレオチドテンプレートを使用して、クラスター化され規則的に間隔の短い回文繰り返し（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９－刺激相同指向修復（ＨＤＲ）とを含んだ。遺伝子特異的ガイドＲＮＡ配列を、それらの方法に従って、Ｃｈｕｒｃｈ　ｌａｂガイドＲＮＡベクター（Ａｄｄｇｅｎｅ　ＩＤ：４１８２４）にクローン化した（Ｍａｌｉ　Ｐ，ｅｔ　ａｌ．（２０１３）ＲＮＡ－Ｇｕｉｄｅｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　ｖｉａ　Ｃａｓ９．Ｓｃｉｅｎｃｅ　３３９（６１２１）：８２３－８２６）。Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、ｈＣａｓ９プラスミド（Ａｄｄｇｅｎｅ　ＩＤ：４１８１５）またはＲＣＩＳｃｒｉｐｔ－ｈＣａｓ９から合成されたｍＲＮＡの共トランスフェクションのいずれかによって提供された。このＲＣＩＳｃｒｉｐｔ－ｈＣａｓ９は、ｈＣａｓ９プラスミド（ｈＣａｓ９　ｃＤＮＡを包含する）からＲＣＩＳｃｒｉｐｔプラスミドにＸｂａＩ－ＡｇｅＩ断片をサブクローニングすることによって構築された。

【０７１２】

Ｈｅｏ　ｅｔ　ａｌ．（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ　Ｄｅｖ．２０１５　Ｆｅｂ　１；２４（３）：３９３－４０２．ｄｏｉ：１０．１０８９／ｓｃｄ．２０１４．０２７８．Ｅｐｕｂ　２０１４　Ｎｏｖ　３）は、ウシ多能性細胞を使用したウシゲノムにおける高効率な遺伝子標的化と、クラスター化され規則的に間隔の短い回文繰り返し（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９ヌクレアーゼとを報告した。まず、Ｈｅｏ　ｅｔ　ａｌ．は、山中因子及びＧＳＫ３β及びＭＥＫ阻害剤（２ｉ）処置の異所性発現によって、ウシ体線維芽細胞から誘導多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）を生成する。Ｈｅｏ　ｅｔ　ａｌ．は、これらのウシｉＰＳＣが、奇形腫における遺伝子発現及び発達可能性に関して天然多能性幹細胞と非常に類似していることを観察した。さらに、ウシＮＡＮＯＧ遺伝子座に特異的であったＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、ウシｉＰＳＣ及び胚におけるウシゲノムの高効率な編集を示した。

【０７１３】

Ｉｇｅｎｉｔｙ（登録商標）は、ウシなどの動物のプロファイル分析を提供し、枝肉構成、枝肉の質、母性および生殖性形質、ならびに１日の平均増体量などの、経済的重要性の経済的形質の形質を実行および伝達する。包括的なＩｇｅｎｉｔｙ（登録商標）プロファイルの分析は、ＤＮＡマーカー（最も多くの場合、単一のヌクレオチド多型またはＳＮ

Ｐ）の発見から始まる。Ｉｇｅｎｉｔｙ（登録商標）プロファイルの背後にある全てのマーカーは、大学、研究組織、及びＵＳＤＡなどの政府機関を含む研究機関で独立した科学者によって発見された。次いで、マーカーをＩｇｅｎｉｔｙ（登録商標）で、検証集団で分析する。Ｉｇｅｎｉｔｙ（登録商標）は、様々な生産環境及び生物学的種類を表す複数の資源集団を使用し、しばしば、牛肉産業の原種、仔牛、飼料、及び／またはパッキングセグメントの産業パートナーと協力して、一般に入手可能ではない表現型を収集する。ウシゲノムデータベースは、幅広く利用可能であり、例えば、ＮＡＧＲＰ Ｃａｔｔｌｅ Ｇｅｎｏｍｅ Ｃｏｏｒｄｉｎａｔｉｏｎ Ｐｒｏｇｒａｍ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ａｎｉｍａｌｇｅｎｏｍｅ．ｏｒｇ／ｃａｔｔｌｅ／ｍａｐｓ／ｄｂ．ｈｔｍｌ）を参照されたい。したがって、本発明は、ウシＳＮＰを標的とするために適用され得る。当業者は、例えば、ＳＮＰを標的化するために上記のプロトコルを利用し、Ｔａｎ ｅｔ ａｌ．またはＨｅｏ ｅｔ ａｌ．によって説明されるようなウシＳＮＰにそれらを適用し得る。

【０７１４】

Ｑｉｎｇｊｉａｎ Ｚｏｕ ｅｔ ａｌ．（２０１５年１０月１２日に発行されたＪｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ａｄｖａｎｃｅ Ａｃｃｅｓｓ）は、イヌミオスタチン（ＭＳＴＮ）遺伝子（骨格筋肉量の負の調節因子）の第１のエキソンを標的化することによって、イヌの筋肉量が増加したことを実証した。まず、ＳｇＲＮＡの効率を、Ｃａｓ９ベクターを用いたＭＳＴＮを標的化するｓｇＲＮＡのイヌ胚性線維芽細胞（ＣＥＦ）へのコトランスフェクションを使用して検証した。その後、ＭＳＴＮ ＫＯイヌを、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ及びＭＳＴＮ ｓｇＲＮＡの混合物を用いた正常な形態を有する微小注入胚と、同じ雌のイヌの卵管への接合体の自己移植によって生成した。ノックアウトした仔犬は、その野生型のリッターメイトの妹と比較して、大腿に明らかな筋肉の表現型を示した。これはまた、本明細書に提供されるＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲシステムを使用して実行され得る。

【０７１５】

家畜－ブタ

家畜におけるウイルス標的としては、いくつかの実施形態では、例えば、ブタマクロファージ上のブタＣＤ１６３が挙げられ得る。ＣＤ１６３は、ＰＲＲＳｖ（動脈ウイルスであるブタ生殖及び呼吸器症候群ウイルス）による感染（ウイルス細胞の侵入を介していると考えられる）に関連する。ＰＲＲＳｖによる感染、特にブタ肺胞マクロファージ（肺に見られる）による感染は、家庭用ブタの生殖不全、体重減少、及び高い死亡率を含む苦痛を引き起こす、以前は不治のブタ症候群（「謎のブタ病」または「青耳病」）をもたらす。マクロファージ活性の損失による免疫不全により、流行性肺炎、髄膜炎、及び耳水腫などの日和見感染がしばしば見られる。それはまた、増加された抗生物質の使用及び財政的損失（推定年間６億６，０００万ドル）による重大な経済的及び環境的影響を有する。

【０７１６】

ミズーリ大学で、Ｇｅｎｕｓ Ｐｌｃと共同で、Ｋｒｉｓｔｉｎ Ｍ Ｗｈｉｔｗｏｒｔｈ及びＤｒ．Ｒａｎｄａｌｌ Ｐｒａｔｈｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０１５年１２月７日にオンラインで公開されたＮａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ ３４３４）によって報告されているように、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９を使用してＣＤ１６３を標的とし、編集されたブタの子孫は、ＰＲＲＳｖに曝露されると耐性があった。両方がＣＤ１６３のエキソン７において変異を有した創業者の雄１匹及び創業者の雌１匹を繁殖させて子孫を生成した。創始者の雄は、一方の対立遺伝子上のエキソン７における１１－ｂｐの欠失を有し、これは、ドメイン５におけるアミノ酸４５におけるフレームシフト変異及びミスセンス翻訳、ならびにその後のアミノ酸６４における未成熟停止コドンをもたらす。他方の対立遺伝子は、エキソン７における２－ｂｐの付加及び先行するイントロンにおける３７７－ｂｐの欠失を有し、それはドメイン５の最初の４９個のアミノ酸の発現、続いてアミノ酸８５における未成熟停止コードをもたらすと予測された。ソウは、翻訳すると、ドメイン５の最初の４８個のアミノ酸、続いてアミノ酸７０での未成熟停止コドンを発現すると予測された

一方の対立遺伝子に７ｂｐの付加を有した。ソウの他の対立遺伝子は増幅できなかった。選択された子孫は、ヌル動物（ＣＤ１６３－／－）、すなわち、ＣＤ１６３ノックアウトであると予測された。

【０７１７】

したがって、いくつかの実施形態では、ブタ肺胞マクロファージは、ＣＲＩＳＰＲタンパク質によって標的化され得る。いくつかの実施形態では、ブタＣＤ１６３は、ＣＲＩＳＰＲタンパク質によって標的化され得る。いくつかの実施形態では、ブタＣＤ１６３は、ＤＳＢの誘導、または挿入もしくは欠失、例えば、上に記載のもののうちの１つ以上を含むエキソン７の欠失もしくは修飾を標的化することによって、または遺伝子の他の領域では、例えば、エキソン５の欠失もしくは修飾によってノックアウトされてもよい。

【０７１８】

編集されたブタ及びその子孫はまた、例えば、ＣＤ１６３がブタを倒すことも想定される。これは、家畜、繁殖、またはモデリング目的（すなわち、ブタモデル）のためのであり得る。遺伝子ノックアウトを含む精液もまた提供される。

【０７１９】

ＣＤ１６３は、スカベンジャー受容体システイン豊富（ＳＲＣＲ）スーパーファミリーのメンバーである。インビトロ研究に基づいて、タンパク質のＳＲＣＲドメイン５は、ウイルスゲノムのアンパッケージング及び放出に関与するドメインである。したがって、他のウイルスに対する耐性を評価するために、ＳＲＣＲスーパーファミリーの他のメンバーもまた標的とされ得る。ＰＲＲＳＶはまた、マウス乳酸デヒドロゲナーゼ上昇ウイルス、サル出血熱ウイルス、及びウマ動脈炎ウイルスも含む哺乳類動脈ウイルス群のメンバーである。動脈ウイルスは、マクロファージトロピズムと重症疾患及び持続性感染の両方を引き起こす能力とを含む重要な病原性特性を共有する。したがって、動脈ウイルス、特にマウス乳酸デヒドロゲナーゼ上昇ウイルス、サル出血熱ウイルス、及びウマ動脈炎ウイルスは、例えば、他の種におけるブタＣＤ１６３またはそのホモログを通じて標的とされてもよく、マウス、サル、及びウマモデルならびにノックアウトも提供される。

【０７２０】

実際に、このアプローチは、インフルエンザＣ、ならびにＨ１Ｎ１、Ｈ１Ｎ２、Ｈ２Ｎ１、Ｈ３Ｎ１、Ｈ３Ｎ２、及びＨ２Ｎ３として知られるインフルエンザＡのサブタイプを含むブタインフルエンザウイルス（ＳＩＶ）株、ならびに上述の肺炎、髄膜炎、及び浮腫など、ヒトに伝染し得る他の家畜疾患を引き起こすウイルスまたは細菌に拡張され得る。

【０７２１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＡＤ官能価ＣＲＩＳＰＲシステムを使用して、ブタゲノムを遺伝子修飾し、１つ以上のブタ内因性レトロウイルス（ＰＥＲＶ）遺伝子座を不活性化し、ブタからヒトへの異種移植の臨床応用を容易にすることができる。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　３５０（６２６４）：１１０１－１１０４（２０１５）を参照されたい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを使用して、任意の活性ブタ内因性レトロウイルス（ＰＥＲＶ）座位を含まない遺伝子修飾されたブタを生成することができる。

【０７２２】

ＡＤ機能化ＣＲＩＳＰＲシステムによる治療標的化

明らかになるように、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを使用して、目的の任意のポリヌクレオチド配列を標的とすることができることが想定される。本発明は、インビボ、エクスビボ、またはインビトロで標的細胞の修飾に使用するために、非天然に存在するか、もしくは操作された組成物、または該組成物の成分をコードする１つ以上のポリヌクレオチド、または該組成物の成分をコードする１つ以上のポリヌクレオチドを含むベクターもしくは送達系を提供し、かつ、一度修飾されるとＣＲＩＳＰＲ修飾細胞の子孫もしくは細胞株が変化した表現型を保持するように細胞を変化させる方法で行われ得る。修飾された細胞及び子孫は、所望の細胞型へのＣＲＩＳＰＲシステムのエクスビボまたはインビボ適

用での、植物または動物などの多細胞生物の一部であり得る。ＣＲＩＳＰＲ発明は、治療の治療的方法であってもよい。治療的方法は、遺伝子もしくはゲノム編集、または遺伝子治療を含んでよい。

【０７２３】

養子細胞療法

本発明はまた、養子療法のための細胞を修飾するための本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムの使用も企図する。したがって、本発明の態様は、腫瘍関連抗原などの選択された抗原に特異的なＴ細胞などの免疫系細胞の養子移植を含む（Ｍａｕｓ ｅｔ ａｌ．，２０１４，Ａｄｏｐｔｉｖｅ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ ｏｒ Ｖｉｒｕｓｅｓ，Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．３２：１８９－２２５；Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ａｎｄ Ｒｅｓｔｉｆｏ，２０１５，Ａｄｏｐｔｉｖｅ ｃｅｌｌ ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｓ ｐｅｒｓｏｎａｌｉｚｅｄ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ ｈｕｍａｎ ｃａｎｃｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｖｏｌ．３４８ ｎｏ．６２３０ ｐｐ．６２－６８；及びＲｅｓｔｉｆｏ ｅｔ ａｌ．，２０１５，Ａｄｏｐｔｉｖｅ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ ｃａｎｃｅｒ：ｈａｒｎｅｓｓｉｎｇ ｔｈｅ Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｓｐｏｎｓｅ．Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２（４）：２６９－２８１；及びＪｅｎｓｏｎ ａｎｄ Ｒｉｄｄｅｌｌ，２０１４，Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ ｉｍｐｌｅｍｅｎｔａｔｉｏｎ ｏｆ ａｄｏｐｔｉｖｅ ｔｈｅｒａｐｙ ｗｉｔｈ ｃｈｉｍｅｒｉｃ ａｎｔｉｇｅｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｔ ｃｅｌｌｓ．Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｒｅｖ．２５７（１）：１２７－１４４を参照されたい）。様々な戦略は、例えば、例えば選択されたペプチド特異性を有する新しいＴＣＲ α鎖及びβ鎖を導入することによって、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）の特異性を変化させることによってＴ細胞を遺伝子修飾するために用いられ得る（米国特許第８，６９７，８５４号、ＰＣＴ特許公開：ＷＯ２００３０２０７６３、ＷＯ２００４０３３６８５、ＷＯ２００４０４４００４、ＷＯ２００５１１４２１５、ＷＯ２００６０００８３０、ＷＯ２００８０３８００２、ＷＯ２００８０３９８１８、ＷＯ２００４０７４３２２、ＷＯ２００５１１３５９５、ＷＯ２００６１２５９６２、ＷＯ２０１３１６６３２１、ＷＯ２０１３０３９８８９、ＷＯ２０１４０１８８６３、ＷＯ２０１４０８３１７３、米国特許第８，０８８，３７９号を参照されたい）。

【０７２４】

ＴＣＲ修飾の代替として、またはＴＣＲ修飾への追加として、悪性細胞などの選択された標的に特異的なＴ細胞などの免疫応答性細胞を生成するために、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）が、記載されている多種多様な受容体キメラ構築物とともに使用され得る（米国特許第５，８４３，７２８号、第５，８５１，８２８号、第５，９１２，１７０号、第６，００４，８１１号、第６，２８４，２４０号、第６，３９２，０１３号、第６，４１０，０１４号、第６，７５３，１６２号、第８，２１１，４２２号、及びＰＣＴ公開ＷＯ９２１５３２２を参照されたい）。代替的なＣＡＲ構築物は、継続的世代に属するとして特徴付けられ得る。第１世代ＣＡＲは、典型的には、抗原に特異的な抗体の一本鎖可変断片からなり、例えば、可撓性リンカー、例えば、ＣＤ８αヒンジドメイン及びＣＤ ８α膜貫通ドメインによって、ＣＤ３ζまたはＦｃＲγのいずれかの膜貫通及び細胞内シグナル伝達ドメイン（ｓｃＦｖ－ＣＤ３ζまたはｓｃＦｖ－ＦｃＲγ；米国特許第７，７４１，４６５号；米国特許第５，９１２，１７２号；米国特許第５，９０６，９３６号を参照されたい）に連結された、特異的抗体のＶＨに連結されたＶＬを含む。第２世代ＣＡＲは、エンドドメイン（例えば、ｓｃＦｖ－ＣＤ２８／ＯＸ４０／４－１ＢＢ－ＣＤ３ζ；米国特許第８，９１１，９９３号；第８，９１６，３８１号；第８，９７５，０７１号；第９，１０１，５８４号；第９，１０２，７６０号；第９，１０２，７６１号）内のＣＤ２８、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）、または４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）などの１つ以上の共刺激分子の細胞内ドメインを組み込む。第３世代ＣＡＲは、ＣＤ３ζ鎖、ＣＤ９７、ＧＤＩ ｌａ－ＣＤ１８、ＣＤ２、ＩＣＯＳ、ＣＤ２７、ＣＤ１５４、ＣＤＳ、ＯＸ４０、４－１ＢＢ、またはＣＤ２８シグナル伝達ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ－ＣＤ２８－４－１ＢＢ－Ｃ

Ｄ３ζまたはｓｃＦｖ－ＣＤ２８－ＯＸ４０－ＣＤ３ζ；米国特許第８，９０６，６８２号；米国特許第８，３９９，６４５号；米国特許第５，６８６，２８１号；ＰＣＴ公開第ＷＯ２０１４１３４１６５号；ＰＣＴ公開第ＷＯ２０１２０７９０００号を参照されたい）などの共茂樹エンドドメインの組み合わせを含む。あるいは、共刺激は、例えば、プロフェッショナル抗原提示細胞上の抗原によって、付随する共刺激とともに、それらのナイーブαβＴＣＲの結合後に活性化及び拡大されるように選択された、抗原特異的Ｔ細胞においてＣＡＲを発現することによって組織化され得る。加えて、例えば、Ｔ細胞攻撃の標的化を改善し、及び／または副作用を最小化するために、追加の操作された受容体を免疫反応答性細胞上に提供してもよい。

【０７２５】

代替技術を使用して、プロトプラスト融合、リポフェクション、トランスフェクション、または電気穿孔などの標的免疫応答性細胞を形質転換することができる。レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、プラスミド、またはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポソンなどのトランスポソン（米国特許第６，４８９，４５８号；第７，１４８，２０３号；第７，１６０，６８２号；第７，９８５，７３９号；第８，２２７，４３２号を参照されたい）などの多種多様なベクターは、例えば、ＣＤ３ζを介した第２世代抗原特異的ＣＡＲシグナル伝達及びＣＤ２８またはＣＤ１３７のいずれかを使用して、ＣＡＲを導入するために使用され得る。ウイルスベクターは、例えば、ＨＩＶ、ＳＶ４０、ＥＢＶ、ＨＳＶ、またはＢＰＶに基づくベクターを含み得る。

【０７２６】

形質転換のために標的とされる細胞としては、例えば、Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、制御性Ｔ細胞、ヒト胚性幹細胞、腫瘍浸潤性リンパ球（ＴＩＬ）、またはリンパ球が分化され得る多能性幹細胞が挙げられ得る。所望のＣＡＲを発現するＴ細胞は、例えば、がん抗原及び共刺激分子を共発現するγ照射活性化細胞及び増殖細胞（ＡａＰＣ）との共培養を通じて選択され得る。操作されたＣＡＲ　Ｔ細胞は、例えば、ＩＬ－２及びＩＬ－２１などの可溶性因子の存在下で、ＡａＰＣ上で共培養することによって拡大され得る。この拡大は、例えば、メモリーＣＡＲ＋Ｔ細胞（例えば、非酵素デジタルアレイ及び／またはマルチパネルフローサイトメトリーによってアッセイされ得る）を提供するように行われてもよい。このように、抗原担持腫瘍に対して特異的細胞傷害活性を有するＣＡＲＴ細胞が提供され得る（任意選択で、インターフェロン－γなどの所望のケモカインの生成と併せて）。この種のＣＡＲ　Ｔ細胞は、例えば、動物モデルにおいて、例えば、腫瘍異種移植片を脅かすために使用され得る。

【０７２７】

上記のようなアプローチは、例えば、選択された抗原と結合する抗原認識受容体を含む有効量の免疫応答性細胞を投与することによって、腫瘍などの疾患を有する対象の治療及び／または生存期間の増加方法を提供するように適合されてよく、結合は、免疫応答性細胞を活性化し、それによって疾患（腫瘍、病原体感染、自己免疫障害、または同種異系移植反応など）を治療または予防する。ＣＡＲ　Ｔ細胞療法における投与は、リンパ球枯渇の経過を伴うかまたは伴わない、例えばシクロホスファミドでの１０６～１０９個の細胞／ｋｇの投与を伴うことができる。

【０７２８】

一実施形態では、治療は、免疫抑制治療を受ける患者に投与され得る。細胞または細胞の集団は、そのような免疫抑制剤の受容体をコードする遺伝子の不活性化に起因して、少なくとも１つの免疫抑制剤に耐性を持たせることができる。理論によって拘束されることなく、免疫抑制治療は、患者内の本発明による免疫応答性細胞またはＴ細胞の選択及び拡大を助けるべきである。

【０７２９】

本発明による細胞または細胞の集団の投与は、エアゾル吸入、注射、摂取、輸血、移植（ｉｍｐｌａｎｔａｔｉｏｎ）、または移植（ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ）を含む

任意の好都合な方法で行われ得る。細胞または細胞の集団は、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、髄内、筋肉内、静脈内もしくはリンパ内注射、または腹腔内によって患者に投与され得る。一実施形態において、本発明の細胞組成物は、好ましくは静脈内注射によって投与される。

【０７３０】

細胞または細胞の集団の投与は、１ｋｇ体重当たり１０４～１０９個の細胞、好ましくは１０５～１０６個の細胞／ｋｇ体重（それらの範囲内の細胞数の全ての整数値を含む）の投与からなり得る。ＣＡＲ Ｔ細胞療法における投薬は、リンパ球枯渇の経過を伴うかまたは伴わない、例えばシクロホスファミドでの１０６～１０９個の細胞／ｋｇの投与を伴うことができる。細胞または細胞の集団は、１つ以上の用量で投与され得る。別の実施形態では、有効量の細胞は、単回用量として投与される。別の実施形態では、有効量の細胞は、一定期間にわたって２回以上の用量として投与される。投与のタイミングは、管理医師の判断の範囲内であり、患者の臨床状態に依存する。細胞または細胞の集団は、血液バンクまたはドナーなどの任意の供給源から得ることができる。個々のニーズは異なるが、特定の疾患または状態に対する所与の細胞型の有効量の最適範囲の決定は、当業者の技術範囲内である。有効量とは、治療上または予防上の利益を提供する量を意味する。投与される用量は、レシピエントの年齢、健康、及び体重、同時治療の種類（ある場合）、治療の頻度、ならびに所望の効果の性質に依存する。

【０７３１】

別の実施形態では、それらの細胞を含む細胞または組成物の有効量は、非経口投与される。投与は、静脈内投与であり得る。投与は、腫瘍内での注射によって直接行うことができる。

【０７３２】

考えられる有害反応を防ぐために、操作された免疫応答性細胞は、特定のシグナルへの曝露を容易にする導入遺伝子の形態で、導入遺伝子安全スイッチを備えてもよい。例えば、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ＴＫ）遺伝子は、例えば、幹細胞移植後にドナーリンパ球注入として使用される同種異系Ｔリンパ球に導入することによって、このように使用され得る（Ｇｒｅｃｏ，ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｐｒｏｖｉｎｇ ｔｈｅ ｓａｆｅｔｙ ｏｆ ｃｅｌｌ ｔｈｅｒａｐｙ ｗｉｔｈ ｔｈｅ ＴＫ－ｓｕｉｃｉｄｅ ｇｅｎｅ．Ｆｒｏｎｔ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２０１５；６：９５）。かかる細胞において、ガンシクロビルまたはアシクロビルなどのヌクレオシドプロドラッグの投与は、細胞死を引き起こす。代替的な安全スイッチ構築物としては、誘導性カスパーゼ９が挙げられ、例えば、２つの非機能性Ｉｃａｓｐ９分子を一緒にして活性酵素を形成する小分子二量体の投与によって誘発される。細胞増殖制御を実施するための多種多様な代替アプローチが記載されている（米国特許公開第２０１３００７１４１４号、ＰＣＴ特許公開ＷＯ２０１１１４６８６２、ＰＣＴ特許公開ＷＯ２０１４０１１９８７、ＰＣＴ特許公開ＷＯ２０１３０４０３７１、Ｚｈｏｕ ｅｔ ａｌ．ＢＬＯＯＤ，２０１４，１２３／２５：３８９５－３９０５、Ｄｉ Ｓｔａｓｉ ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０１１；３６５：１６７３－１６８３、Ｓａｄｅｌａｉｎ Ｍ，Ｔｈｅ Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ２０１１；３６５：１７３５－１７３、Ｒａｍｏｓ ｅｔ ａｌ．，Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ ２８（６）：１１０７－１５（２０１０）を参照されたい）。

【０７３３】

養子療法のさらなる洗練において、ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムでのゲノム編集は、免疫応答性細胞を代替実装に適合されるために使用されてもよく、例えば、ＣＡＲ Ｔ細胞（Ｐｏｉｒｏｔ ｅｔ ａｌ．，２０１５，Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ ｇｅｎｏｍｅ ｅｄｉｔｅｄ Ｔ－ｃｅｌｌ ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ ｐｌａｔｆｏｒｍ ｆｏｒ”ｏｆｆ－ｔｈｅ－ｓｈｅｌｆ”ａｄｏｐｔｉｖｅ Ｔ－ｃｅｌｌ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｉｅｓ，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ７５（１８）：３８５３を参照されたい）。例えば、免疫応答性細胞は、ＨＬＡ ＩＩ型及び／またはＩ型分子のクラスの一部また

は全ての発現を欠失させるか、またはＰＤ１遺伝子などの所望の免疫応答を阻害し得る選択された遺伝子をノックアウトするように編集されてもよい。

【０７３４】

細胞は、本明細書に記載のＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲシステムを使用して編集され得る。ＡＤ官能化ＣＲＩＳＰＲ系は、本明細書に記載の任意の方法によって免疫細胞に送達され得る。好ましい実施形態では、細胞は、エクスビボ編集され、それを必要とする対象に移植される。免疫応答性細胞、ＣＡＲ－Ｔ細胞、または養子細胞移植に使用される任意の細胞を編集してもよい。編集は、潜在的なアロ反応性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）を排除し、化学療法剤の標的を破壊し、免疫チェックポイントを遮断し、Ｔ細胞を活性化し、及び／または機能的に疲労したまたは機能不全ＣＤ８＋Ｔ細胞の分化及び／または増殖を増加させるために行われ得る（ＰＣＴ特許公開：ＷＯ２０１３１７６９１５、ＷＯ２０１４０５９１７３、ＷＯ２０１４１７２６０６、ＷＯ２０１４１８４７４４、及びＷＯ２０１４１９１１２８を参照されたい）。編集は、遺伝子の不活性化をもたらし得る。

【０７３５】

Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）は、抗原の提示に応答してＴ細胞の活性化に参加する細胞表面受容体である。ＴＣＲは、一般に、ヘテロ二量体を形成するように組み立てられ、ＣＤ３形質導入サブユニットと会合して、細胞表面上に存在するＴ細胞受容体複合体を形成する、α及びβの２つの鎖から作製される。ＴＣＲの各α鎖及びβ鎖は、免疫グロブリン様Ｎ末端可変（Ｖ）及び定常（Ｃ）領域、疎水性膜貫通ドメイン、ならびに短い細胞質領域からなる。免疫グロブリン分子については、α鎖及びβ鎖の可変領域は、Ｖ（Ｄ）Ｊ組換えによって生成され、Ｔ細胞の集団内に広く多様な抗原特異性を生成する。しかしながら、インタクトな抗原を認識する免疫グロブリンとは対照的に、Ｔ細胞は、ＭＨＣ分子と関連する処理されたペプチド断片によって活性化され、ＭＨＣ制限として知られるＴ細胞による抗原認識に余分な次元を導入する。Ｔ細胞受容体を介したドナーとレシピエントとの間のＭＨＣ格差の認識は、Ｔ細胞増殖及び移植片対宿主疾患（ＧＶＨＤ）の潜在的発症をもたらす。ＴＣＲαまたはＴＣＲβの不活性化は、Ｔ細胞の表面からのＴＣＲの排除をもたらし、アロ抗原、したがってＧＶＨＤの認識を妨げ得る。しかしながら、ＴＣＲ破壊は、一般に、ＣＤ３シグナル伝達成分の排除をもたらし、さらなるＴ細胞拡大の手段を変化させる。

【０７３６】

同種異系細胞は、宿主免疫系によって急速に拒絶される。非照射血液製品に存在する同種異系白血球が、５～６日間以下持続することが実証されている（Ｂｏｎｉ，Ｍｕｒａｎｓｋｉ ｅｔ ａｌ．２００８ Ｂｌｏｏｄ １；１１２（１２）：４７４６－５４）。したがって、同種異系細胞の拒絶を防ぐためには、宿主の免疫系は通常、ある程度抑制されなければならない。しかしながら、養子細胞移植の場合、免疫抑制薬の使用は、導入された治療Ｔ細胞にも有害な影響を有する。したがって、これらの状態で養子免疫療法アプローチを有効に使用するためには、導入された細胞は、免疫抑制治療に対して耐性である必要があるであろう。したがって、特定の実施形態において、本発明は、好ましくは、免疫抑制剤の標的をコードする少なくとも１つの遺伝子を不活性化することによって、Ｔ細胞を免疫抑制剤に耐性を持たせるように修飾するステップをさらに含む。免疫抑制剤は、いくつかの作用機構のうちの１つによって免疫機能を抑制する薬剤である。免疫抑制剤は、これらに限定されないが、カルシニューリン阻害剤、ラパマイシンの標的、インターロイキン－２受容体α鎖遮断剤、イノシン一リン酸デヒドロゲナーゼの阻害剤、ジヒドロ葉酸リダクターゼの阻害剤、コルチコステロイド、または免疫抑制性代謝物であり得る。本発明は、Ｔ細胞における免疫抑制剤の標的を不活性化することによって、免疫療法のためのＴ細胞に対する免疫抑制耐性を付与することを可能にする。非限定的な例として、免疫抑制剤の標的は、ＣＤ５２、グルココルチコイド受容体（ＧＲ）、ＦＫＢＰファミリー遺伝子メンバー、及びシクロフィリンファミリー遺伝子メンバーなどの免疫抑制剤の受容体であり得る。

【０７３７】

免疫チェックポイントは、免疫反応を減速または停止し、かつ免疫細胞の制御されていない活性から過剰な組織損傷を防ぐ阻害経路である。ある特定の実施形態では、標的とする免疫チェックポイントは、プログラムされた死亡－１（ＰＤ－１またはＣＤ２７９）遺伝子（ＰＤＣＤ１）である。他の実施形態では、標的とする免疫チェックポイントは、細胞傷害性Ｔリンパ球関連抗原（ＣＴＬＡ－４）である。追加的な実施形態では、標的とする免疫チェックポイントは、ＢＴＬＡ、ＬＡＧ３、ＩＣＯＳ、ＰＤＬ１、またはＫＩＲなどのＣＤ２８及びＣＴＬＡ４　Ｉｇスーパーファミリーの別のメンバーである。さらなる追加的な実施形態では、標的とする免疫チェックポイントは、ＣＤ４０、ＯＸ４０、ＣＤ１３７、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７、またはＴＩＭ－３などのＴＮＦＲスーパーファミリーのメンバーである。

【０７３８】

追加的な免疫チェックポイントとしては、ＳＲＣ相同性２ドメイン含有タンパク質チロシンホスファターゼ１（ＳＨＰ－１）（Ｗａｔｓｏｎ　ＨＡ，ｅｔ　ａｌ．，ＳＨＰ－１：ｔｈｅ　ｎｅｘｔ　ｃｈｅｃｋｐｏｉｎｔ　ｔａｒｇｅｔ　ｆｏｒ　ｃａｎｃｅｒ　ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ？Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｓｏｃ　Ｔｒａｎｓ．２０１６　Ａｐｒ　１５；４４（２）：３５６－６２）が挙げられる。ＳＨＰ－１は、広く発現される阻害タンパク質チロシンホスファターゼ（ＰＴＰ）である。Ｔ細胞において、それは、抗原依存性活性化及び増殖の陰性調節因子である。それは細胞質タンパク質であり、したがって抗体媒介療法には適さないが、活性化及び増殖におけるその役割により、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞などの養子移植戦略における遺伝子操作の魅力的な標的となる。免疫チェックポイントには、Ｉｇ及びＩＴＩＭドメイン（ＴＩＧＩＴ／Ｖｓｔｍ３／ＷＵＣＡＭ／ＶＳＩＧ９）を有するＴ細胞免疫受容体、ならびにＶＩＳＴＡ（Ｌｅ　Ｍｅｒｃｉｅｒ　Ｉ，ｅｔ　ａｌ．，（２０１５）Ｂｅｙｏｎｄ　ＣＴＬＡ－４　ａｎｄ　ＰＤ－１，ｔｈｅ　ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　Ｚ　ｏｆ　ｎｅｇａｔｉｖｅ　ｃｈｅｃｋｐｏｉｎｔ　ｒｅｇｕｌａｔｏｒｓ．Ｆｒｏｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：４１８）も含まれ得る。

【０７３９】

ＷＯ２０１４１７２６０６は、疲労したＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖及び／または活性を増加させ、ＣＤ８＋Ｔ細胞の疲労を減少させる（例えば、機能的に疲労したまたは非応答性のＣＤ８＋免疫細胞を減少させる）ためのＭＴ１及び／またはＭＴ１阻害剤の使用に関する。ある特定の実施形態では、メタロチオネインは、養子移植されたＴ細胞における遺伝子編集によって標的化される。

【０７４０】

ある特定の実施形態では、遺伝子編集の標的は、免疫チェックポイントタンパク質の発現に関与する少なくとも１つの標的座位であり得る。かかる標的には、これらに限定されないが、ＣＴＬＡ４、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、ＰＤＬ１、ＫＩＲ、ＬＡＧ３、ＨＡＶＣＲ２、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４（２Ｂ４）、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＴＧＦＢＲＩＩ、ＴＧＦＲＢＲＩ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＶＩＳＴＡ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＭＴ１、ＭＴ２、ＣＤ４０、ＯＸ４０、ＣＤ１３７、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７、ＳＨＰ－１、またはＴＩＭ－３が挙げられ得る。好ましい実施形態では、ＰＤ－１またはＣＴＬＡ－４遺伝子に関与する遺伝子座位が標的となる。他の好ましい実施形態では、これらに限定されないが、ＰＤ－１及びＴＩＧＩＴなどの遺伝子の組み合わせが標的となる。

【０７４１】

他の実施形態では、少なくとも２つの遺伝子が編集される。遺伝子の対としては、これらに限定されないが、ＰＤ１及びＴＣＲα、ＰＤ１及びＴＣＲβ、ＣＴＬＡ－４及びＴＣ

Ｒα、ＣＴＬＡ－４及びＴＣＲβ、ＬＡＧ３及びＴＣＲα、ＬＡＧ３及びＴＣＲβ、Ｔｉｍ３及びＴＣＲα、Ｔｉｍ３及びＴＣＲβ、ＢＴＬＡ及びＴＣＲα、ＢＴＬＡ及びＴＣＲβ、ＢＹ５５及びＴＣＲα、ＢＹ５５及びＴＣＲβ、ＴＩＧＩＴ及びＴＣＲα、ＴＩＧＩＴ及びＴＣＲβ、Ｂ７Ｈ５及びＴＣＲα、Ｂ７Ｈ５及びＴＣＲβ、ＬＡＩＲ１及びＴＣＲα、ＬＡＩＲ１及びＴＣＲβ、ＳＩＧＬＥＣ１０及びＴＣＲα、ＳＩＧＬＥＣ１０及びＴＣＲβ、２Ｂ４及びＴＣＲα、２Ｂ４及びＴＣＲβが挙げられ得る。

【０７４２】

Ｔ細胞の遺伝子修飾の前または後にかかわらず、Ｔ細胞は、一般に、例えば、米国特許第６，３５２，６９４、６，５３４，０５５、６，９０５，６８０、５，８５８，３５８、６，８８７，４６６、６，９０５，６８１、７，１４４，５７５、７，２３２，５６６、７，１７５，８４３、５，８８３，２２３、６，９０５，８７４、６，７９７，５１４、６，８６７，０４１、及び７，５７２，６３１に記載されているような方法を使用して活性化及び拡大され得る。Ｔ細胞は、インビトロまたはインビボで拡大され得る。

【０７４３】

本発明の実践は、免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクス、及び組換えＤＮＡの分野で既知の技術を用いており、これらは当該技術分野の範囲内である。ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９）（Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ）、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，４ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１２）（Ｇｒｅｅｎ ａｎｄ Ｓａｍｂｒｏｏｋ）、ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ（１９８７）（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．）；ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＥＮＺＹＭＯＬＯＧＹ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）、ＰＣＲ ２：Ａ ＰＲＡＣＴＩＣＡＬ ＡＰＰＲＯＡＣＨ（１９９５）（Ｍ．Ｊ．ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ，Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｇ．Ｒ．Ｔａｙｌｏｒ ｅｄｓ．）、ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ，Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ（１９８８）（Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，ｅｄｓ．）、ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１３）（Ｅ．Ａ．Ｇｒｅｅｎｆｉｅｌｄ ｅｄ．）、及びＡＮＩＭＡＬ ＣＥＬＬ ＣＵＬＴＵＲＥ（１９８７）（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，ｅｄ．）を参照されたい。

【０７４４】

疾患関連変異及び病原性ＳＮＰの矯正

一態様では、本明細書に記載の本発明は、Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ点変異または病原性単一ヌクレオチド多型（ＳＮＰ）によって引き起こされる、または引き起こされる可能性が高い疾患状態の是正及び／または予防を目的として、標的座位におけるアデノシン残基を修飾するための方法を提供する。

【０７４５】

脳及び中枢神経系に影響する疾患

これらに限定されないが、アルツハイマー病、パーキンソン病、自閉症、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、統合失調症、アドレノイキジストロフィー、エカルディ・グティエール症候群、ファブリー病、レッシュ・ナイハン症候群、及びメンケス病を含む、脳および中枢神経系に影響する様々な疾患に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告され、表Ａに開示される。したがって、本発明の態様は、以下で議論される通り、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正する方法に関する。

【０７４６】

アルツハイマー病

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、アルツハイマー病に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、ＰＳＥＮ１、ＰＳＥＮ２

、及びＡＰＰから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在し、少なくとも以下を含む。
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．７９６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２６６Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００４８４．３（ＡＰＰ）：ｃ．２０１７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ６７３Ｔｈｒ）
ＮＭ＿０００４８４．３（ＡＰＰ）：ｃ．２１４９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ７１７Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００４８４．３（ＡＰＰ）：ｃ．２１３７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ７１３Ｔｈｒ）
ＮＭ＿０００４８４．３（ＡＰＰ）：ｃ．２１４３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ７１５Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００４８４．３（ＡＰＰ）：ｃ．２１４１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ７１４Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．４３８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｍｅｔ１４６Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．１２２９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ４１０Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．４８７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｈｉｓ１６３Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．７９９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ２６７Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．２３６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ７９Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．５０９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ１７０Ｐｈｅ）
ＮＭ＿０００４４７．２（ＰＳＥＮ２）：ｃ．１２８９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ４３０Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００４４７．２（ＰＳＥＮ２）：ｃ．７１７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｍｅｔ２３９Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００４４７．２（ＰＳＥＮ２）：ｃ．２５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ８５Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００００２１．３（ＰＳＥＮ１）：ｃ．８０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２６９Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００４８４．３（ＡＰＰ）：ｃ．２０１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ６７３Ｖａｌ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＰＳＥＮ１、ＰＳＥＮ２、及びＡＰＰから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、アルツハイマー病を治療または予防するための方法に関する。

【０７４７】

パーキンソン病

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、パーキンソン病に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＳＮＣＡ、ＰＬＡ２Ｇ６、ＦＢＸＯ７、ＶＰＳ３５、ＥＩＦ４Ｇ１、ＤＮＡＪＣ６、ＰＲＫＮ、ＳＹＮＪ１、ＣＨＣＨＤ２、ＰＩＮＫ１、ＰＡＲＫ７、ＬＲＲＫ２、ＡＴＰ１３Ａ２、及びＧＢＡから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。
ＮＭ＿０００３４５．３（ＳＮＣＡ）：ｃ．１５７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ５３Ｔｈｒ）
ＮＭ＿０００３４５．３（ＳＮＣＡ）：ｃ．１５２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ５１Ａｓｐ）
ＮＭ＿００３５６０．３（ＰＬＡ２Ｇ６）：ｃ．２２２２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ７４１Ｇｌｎ）
ＮＭ＿００３５６０．３（ＰＬＡ２Ｇ６）：ｃ．２２３９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７４７Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００３５６０．３（ＰＬＡ２Ｇ６）：ｃ．１９０４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ６３５Ｇｌｎ）
ＮＭ＿００３５６０．３（ＰＬＡ２Ｇ６）：ｃ．１３５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４５２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１２１７９．３（ＦＢＸＯ７）：ｃ．１４９２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１２１７９．３（ＦＢＸＯ７）：ｃ．６５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ２２Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０１８２０６．５（ＶＰＳ３５）：ｃ．１８５８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ６２０Ａｓｎ）
ＮＭ＿１９８２４１．２（ＥＩＦ４Ｇ１）：ｃ．３６１４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１２０５Ｈｉｓ）

ＮＭ＿１９８２４１．２（ＥＩＦ４Ｇ１）：ｃ．１５０５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ５０２Ｖａｌ）
ＮＭ＿００１２５６８６５．１（ＤＮＡＪＣ６）：ｃ．２２００Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７３４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１２５６８６５．１（ＤＮＡＪＣ６）：ｃ．２３２６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７７６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４５６２．２（ＰＲＫＮ）：ｃ．９３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４５６２．２（ＰＲＫＮ）：ｃ．１３５８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４５３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４５６２．２（ＰＲＫＮ）：ｃ．６３５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ２１２Ｔｙｒ）
ＮＭ＿２０３４４６．２（ＳＹＮＪ１）：ｃ．７７３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２５８Ｇｌｎ）
ＮＭ＿００１３２０３２７．１（ＣＨＣＨＤ２）：ｃ．１８２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ６１Ｉｌｅ）
ＮＭ＿００１３２０３２７．１（ＣＨＣＨＤ２）：ｃ．４３４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１４５Ｇｌｎ）
ＮＭ＿００１３２０３２７．１（ＣＨＣＨＤ２）：ｃ．３００＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０３２４０９．２（ＰＩＮＫ１）：ｃ．９２６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ３０９Ａｓｐ）
ＮＭ＿０３２４０９．２（ＰＩＮＫ１）：ｃ．１３１１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４３７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３２４０９．２（ＰＩＮＫ１）：ｃ．７３６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２４６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３２４０９．２（ＰＩＮＫ１）：ｃ．８３６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２７９Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０３２４０９．２（ＰＩＮＫ１）：ｃ．９３８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ３１３Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０３２４０９．２（ＰＩＮＫ１）：ｃ．１３６６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４５６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２６２．４（ＰＡＲＫ７）：ｃ．７８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｍｅｔ２６Ｉｌｅ）
ＮＭ＿１９８５７８．３（ＬＲＲＫ２）：ｃ．４３２１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１４４１Ｃｙｓ）
ＮＭ＿１９８５７８．３（ＬＲＲＫ２）：ｃ．４３２２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１４４１Ｈｉｓ）
ＮＭ＿１９８５７８．３（ＬＲＲＫ２）：ｃ．１２５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ４１９Ｖａｌ）
ＮＭ＿１９８５７８．３（ＬＲＲＫ２）：ｃ．６０５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２０１９Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０２２０８９．３（ＡＴＰ１３Ａ２）：ｃ．１３０６＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０２２０８９．３（ＡＴＰ１３Ａ２）：ｃ．２６２９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ８７７Ａｒｇ）
ＮＭ＿０２２０８９．３（ＡＴＰ１３Ａ２）：ｃ．４９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６４Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００１００５７４１．２（ＧＢＡ）：ｃ．１４４４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ４８２Ａｓｎ）
ｍ．１５９５０Ｇ＞Ａ

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＳＮＣＡ、ＰＬＡ２Ｇ６、ＦＢＸＯ７、ＶＰＳ３５、ＥＩＦ４Ｇ１、ＤＮＡＪＣ６、ＰＲＫＮ、ＳＹＮＪ１、ＣＨＣＨＤ２、ＰＩＮＫ１、ＰＡＲＫ７、ＬＲＲＫ２、ＡＴＰ１３Ａ２、及びＧＢＡから選択される少なくとも１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の少なくとも１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、パーキンソン病を治療または予防するための方法に関する。

【０７４８】

自閉症

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、自閉症に

関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＭＥＣＰ２、ＮＬＧＮ３、ＳＬＣ９Ａ９、ＥＨＭＴ１、ＣＨＤ８、ＮＬＧＮ４Ｘ、ＧＳＰＴ２、及びＰＴＥＮから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。

ＮＭ＿００１１１０７９２．１（ＭＥＣＰ２）：ｃ．９１６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３０６Ｔｅｒ）

ＮＭ＿００４９９２．３（ＭＥＣＰ２）：ｃ．４７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１５８Ｍｅｔ）

ＮＭ＿０１８９７７．３（ＮＬＧＮ３）：ｃ．１３５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４５１Ｃｙｓ）

ＮＭ＿１７３６５３．３（ＳＬＣ９Ａ９）：ｃ．１２６７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４２３Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０２４７５７．４（ＥＨＭＴ１）：ｃ．３４１３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１１３８Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０２０９２０．３（ＣＨＤ８）：ｃ．２８７５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９５９Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０２０９２０．３（ＣＨＤ８）：ｃ．３１７２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０５８Ｔｅｒ）

ＮＭ＿１８１３３２．２（ＮＬＧＮ４Ｘ）：ｃ．３０１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０１Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０１８０９４．４（ＧＳＰＴ２）：ｃ．１０２１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ３４１Ｉｌｅ）

ＮＭ＿０００３１４．６（ＰＴＥＮ）：ｃ．３９２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１３１Ｉｌｅ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＭＥＣＰ２、ＮＬＧＮ３、ＳＬＣ９Ａ９、ＥＨＭＴ１、ＣＨＤ８、ＮＬＧＮ４Ｘ、ＧＳＰＴ２、及びＰＴＥＮから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、自閉症を治療または予防するための方法に関する。

【０７４９】

筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、ＡＬＳに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＳＯＤ１、ＶＣＰ、ＵＢＱＬＮ２、ＥＲＢＢ４、ＨＮＲＮＰＡ１、ＴＵＢＡ４Ａ、ＳＯＤ１、ＴＡＲＤＢＰ、ＦＩＧ４、ＯＰＴＮ、ＳＥＴＸ、ＳＰＧ１１、ＦＵＳ、ＶＡＰＢ、ＡＮＧ、ＣＨＣＨＤ１０、ＳＱＳＴＭ１、及びＴＢＫ１から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００４５４．４（ＳＯＤ１）：ｃ．２８９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ９７Ａｓｎ）

ＮＭ＿００７１２６．３（ＶＣＰ）：ｃ．１７７４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ５９２Ａｓｎ）

ＮＭ＿００７１２６．３（ＶＣＰ）：ｃ．４６４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１５５Ｈｉｓ）

ＮＭ＿００７１２６．３（ＶＣＰ）：ｃ．５７２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１９１Ｇｌｎ）

ＮＭ＿０１３４４４．３（ＵＢＱＬＮ２）：ｃ．１４８９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ４９７Ｓｅｒ）

ＮＭ＿０１３４４４．３（ＵＢＱＬＮ２）：ｃ．１５２５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ５０９Ｓｅｒ）

ＮＭ＿０１３４４４．３（ＵＢＱＬＮ２）：ｃ．１５７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ５２５Ｓｅｒ）

ＮＭ＿０１３４４４．３（ＵＢＱＬＮ２）：ｃ．１４９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ４９７Ｌｅｕ）

ＮＭ＿００５２３５．２（ＥＲＢＢ４）：ｃ．２７８０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ９２７Ｇｌｎ）

NM_005235.2(ERBB4):c.3823C>T(p.Arg1275Trp)
NM_031157.3(HNRNPA1):c.940G>A(p.Asp314Asn)
NM_006000.2(TUBA4A):c.643C>T(p.Arg215Cys)
NM_006000.2(TUBA4A):c.958C>T(p.Arg320Cys)
NM_006000.2(TUBA4A):c.959G>A(p.Arg320His)
NM_006000.2(TUBA4A):c.1220G>A(p.Trp407Ter)
NM_006000.2(TUBA4A):c.1147G>A(p.Ala383Thr)
NM_000454.4(SOD1):c.112G>A(p.Gly38Arg)
NM_000454.4(SOD1):c.124G>A(p.Gly42Ser)
NM_000454.4(SOD1):c.125G>A(p.Gly42Asp)
NM_000454.4(SOD1):c.14C>T(p.Ala5Val)
NM_000454.4(SOD1):c.13G>A(p.Ala5Thr)
NM_000454.4(SOD1):c.436G>A(p.Ala146Thr)
NM_000454.4(SOD1):c.64G>A(p.Glu22Lys)
NM_000454.4(SOD1):c.404G>A(p.Ser135Asn)
NM_000454.4(SOD1):c.49G>A(p.Gly17Ser)
NM_000454.4(SOD1):c.217G>A(p.Gly73Ser)
NM_007375.3(TARDBP):c.892G>A(p.Gly298Ser)
NM_007375.3(TARDBP):c.943G>A(p.Ala315Thr)
NM_007375.3(TARDBP):c.883G>A(p.Gly295Ser)
NM_007375.3(TARDBP):c.*697G>A
NM_007375.3(TARDBP):c.1144G>A(p.Ala382Thr)
NM_007375.3(TARDBP):c.859G>A(p.Gly287Ser)
NM_014845.5(FIG4):c.547C>T(p.Arg183Ter)
NM_001008211.1(OPTN):c.1192C>T(p.Gln398Ter)
NM_015046.5(SETX):c.6407G>A(p.Arg2136His)
NM_015046.5(SETX):c.8C>T(p.Thr3Ile)
NM_025137.3(SPG11):c.118C>T(p.Gln40Ter)
NM_025137.3(SPG11):c.267G>A(p.Trp89Ter)
NM_025137.3(SPG11):c.5974C>T(p.Arg1992Ter)
NM_004960.3(FUS):c.1553G>A(p.Arg518Lys)
NM_004960.3(FUS):c.1561C>T(p.Arg521Cys)
NM_004960.3(FUS):c.1562G>A(p.Arg521His)
NM_004960.3(FUS):c.1520G>A(p.Gly507Asp)
NM_004960.3(FUS):c.1483C>T(p.Arg495Ter)

ＮＭ＿００４９６０．３（ＦＵＳ）：ｃ．６１６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２０６Ｓｅｒ）
ＮＭ＿００４９６０．３（ＦＵＳ）：ｃ．６４６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２１６Ｃｙｓ）
ＮＭ＿００４７３８．４（ＶＡＰＢ）：ｃ．１６６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ５６Ｓｅｒ）
ＮＭ＿００４７３８．４（ＶＡＰＢ）：ｃ．１３７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ４６Ｉｌｅ）
ＮＭ＿００１１４５．４（ＡＮＧ）：ｃ．１６４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ５５Ｌｙｓ）
ＮＭ＿００１１４５．４（ＡＮＧ）：ｃ．１５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｓｅｒ５２Ａｓｎ）
ＮＭ＿００１１４５．４（ＡＮＧ）：ｃ．４０７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ１３６Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００１１４５．４（ＡＮＧ）：ｃ．４０９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ１３７Ｉｌｅ）
ＮＭ＿００１３０１３３９．１（ＣＨＣＨＤ１０）：ｃ．２３９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ８０Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００１３０１３３９．１（ＣＨＣＨＤ１０）：ｃ．１７６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ５９Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００１１４２２９８．１（ＳＱＳＴＭ１）：ｃ．－４７－１９２４Ｃ＞Ｔ
ＮＭ＿００３９００．４（ＳＱＳＴＭ１）：ｃ．１１６０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ３８７Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００３９００．４（ＳＱＳＴＭ１）：ｃ．１１７５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ３９２Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０１３２５４．３（ＴＢＫ１）：ｃ．１３４０＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０１３２５４．３（ＴＢＫ１）：ｃ．２０８６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ６９６Ｌｙｓ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＳＯＤ１、ＶＣＰ、ＵＢＱＬＮ２、ＥＲＢＢ４、ＨＮＲＮＰＡ１、ＴＵＢＡ４Ａ、ＳＯＤ１、ＴＡＲＤＢＰ、ＦＩＧ４、ＯＰＴＮ、ＳＥＴＸ、ＳＰＧ１１、ＦＵＳ、ＶＡＰＢ、ＡＮＧ、ＣＨＣＨＤ１０、ＳＱＳＴＭ１、及びＴＢＫ１から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、ＡＬＳを治療または予防するための方法に関する。

【０７５０】

統合失調症

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、統合失調症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＰＲＯＤＨ、ＳＥＴＤ１Ａ、及びＳＨＡＮＫ３から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０１６３３５．４（ＰＲＯＤＨ）：ｃ．１２９２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ４３１Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０１６３３５．４（ＰＲＯＤＨ）：ｃ．１３９７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ４６６Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０１４７１２．２（ＳＥＴＤ１Ａ）：ｃ．２２０９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７３７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３３５１７．１（ＳＨＡＮＫ３）：ｃ．３３４９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１１１７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３３５１７．１（ＳＨＡＮＫ３）：ｃ．１６０６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５３６Ｔｒｐ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＰＲＯＤＨ、ＳＥＴＤ１Ａ、及びＳＨＡＮＫ３から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって統合失調症を治療または予防するための方法に関する。

【０７５１】

アドレノイキジストロフィー

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、アドレノイキジストロフィーに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＡＢＣＤ１遺伝子に存在する。
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．４２１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ１４１Ｔｈｒ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．７９６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２６６Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１２５２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４１８Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１５５２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５１８Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１８５０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ６１７Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１３９６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４６６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１５５３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ５１８Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１６７９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ５６０Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１７７１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５９１Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１８０２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ６０１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．３４６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１１６Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．４０６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１６６１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ５５４Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１８２５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ６０９Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１２８８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４３０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１７８１－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．５２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１７７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００３３．３（ＡＢＣＤ１）：ｃ．１８６６－１０Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には少なくともＡＢＣＤ１遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、アドレノイルジストロフィーを治療または予防する方法に関する。

【０７５２】

エカルディ・グティエール症候群

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、エカルディ・グティエール症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＴＲＥＸ１、ＲＮＡＳＥＨ２Ｃ、ＡＤＡＲ、及びＩＦＩＨ１から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。
ＮＭ＿０１６３８１．５（ＴＲＥＸ１）：ｃ．７９４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２６５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３３６２９．４（ＴＲＥＸ１）：ｃ．５２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ１８Ａｓｎ）
ＮＭ＿０３３６２９．４（ＴＲＥＸ１）：ｃ．４９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３２１９３．３（ＲＮＡＳＥＨ２Ｃ）：ｃ．２０５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６９Ｔｒｐ）

ＮＭ＿００１１１１．４（ＡＤＡＲ）：ｃ．３０１９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１００７Ａｒｇ）
ＮＭ＿０２２１６８．３（ＩＦＩＨ１）：ｃ．２３３６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ７７９Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０２２１６８．３（ＩＦＩＨ１）：ｃ．２３３５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７７９Ｃｙｓ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＴＲＥＸ１、ＲＮＡＳＥＨ２Ｃ、ＡＤＡＲ、及びＩＦＩＨ１から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、エカルディ・グティエール症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０７５３】

ファブリー病

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、ファブリー病に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＧＬＡ遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．１０２４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３４２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．１０６６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３５６Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．１０２５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３４２Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．２８１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ９４Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．６７７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２２６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．７３４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２４５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．７４８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２５０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．６５８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２２０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．７３０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ２４４Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．３６９＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．３３５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１１２Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．４８５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１６２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．６６１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２２１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．９１６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３０６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．１０７２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ３５８Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．１０８７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３６３Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．１０８８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３６３Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．６０５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ２０２Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．８３０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２７７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．９７９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３２７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．４２２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１４１Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．２８５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ９５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．７３５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２４５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．６３９＋９１９Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．６８０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２２７Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．６７９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２２７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．２４２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ８１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．９０１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３０１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．９７４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ３２５Ａｓｐ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．８４７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２８３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．４６９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１５７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１６９．２（ＧＬＡ）：ｃ．１１１８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ３７３Ａｓｐ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には少なくともＧＬＡ遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、ファブリー病を治療または予防する方法に関する。

【０７５４】

レッシュ・ナイハン症候群

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、レッシュ・ナイハン症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＨＰＲＴ１遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００１９４．２（ＨＰＲＴ１）：ｃ．１５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５１Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００１９４．２（ＨＰＲＴ１）：ｃ．３８４＋１Ｇ＞Ａ

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には少なくともＨＰＲＴ１遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、レッシュ・ナイハン症候群を治療または予防する方法に関する。

【０７５５】

メンケス病

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、メンケス病に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＡＴＰ７Ａ遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．６０１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０１Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．２９３８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９８０Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．３０５６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１０１９Ａｓｐ）

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．５９８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２００Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．１２２５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４０９Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．１５４４－１Ｇ＞Ａ

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．１６３９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５４７Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．１９３３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６４５Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．１９４６＋５Ｇ＞Ａ

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．１９５０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ６５０Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．２１７９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ７２７Ａｒｇ）

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．２１８７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７２９Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．２３８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７９５Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．２４９９－１Ｇ＞Ａ

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．２５５５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ８５２Ｌｅｕ）

ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．２９５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９８６Ｔｅｒ

）
ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．３１１２－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．３４６６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１５６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．３５０２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１６８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．３７６４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１２５５Ｇｌｕ）
ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．３９４３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１３１５Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．４１２３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００５２．６（ＡＴＰ７Ａ）：ｃ．４２２６＋５Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的には少なくともＡＴＰ７Ａ遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、メンケス病を治療または予防する方法に関する。

【０７５６】

眼疾患

これらに限定されないが、シュタルガルト病、バルデー・ビードル症候群、錐体桿体ジストロフィー、先天性停在性夜盲、Ｕｓｈｅｒ症候群、Ｌｅｂｅｒ先天性黒内障、網膜色素変性症、及び色覚異常を含む、様々な眼疾患に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告され、表Ａに開示される。したがって、本発明の態様は、以下で議論される通り、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正する方法に関する。

【０７５７】

シュタルガルト病

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、シュタルガルト病に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＡＢＣＡ４遺伝子に存在する。
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４４２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４７７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６６４７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ２２１６Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．５３１２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．５１８９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１７３０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４３５２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４２５３＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．３８７１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１２９１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．３８１３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ１２７１＝）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．１２９３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４３１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．２０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ６９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．３３２２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１１０８Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．１８０４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６０２Ｔｒｐ）

ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．１９３７＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．２５６４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ８５５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４２３４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４１２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４４５７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ１４８６Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４５９４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ１５３２Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４９１９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１６４０Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．５１９６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６３１６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２１０６Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．３０５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１０１９Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．５２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１８Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．１２２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．１９０３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６３５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．１９４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ６５Ｇｌｕ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．３０８５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１０２９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４１９５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ１３９９Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１５２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４６１０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１５３７Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６１１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０３８Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６１１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０４０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６３４２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ２１１４＝）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６６５８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２２２０Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＡＢＣＡ４遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、シュタルガルト病を治療または予防する方法に関する。

【０７５８】

バルデー・ビードル症候群

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、バルデー・ビードル症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＢＢＳ１、ＢＢＳ２、ＢＢＳ７、ＢＢＳ９、ＢＢＳ１０、ＢＢＳ１２、ＬＺＴＦＬ１、及びＴＲＩＭ３２から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０２４６４９．４（ＢＢＳ１）：ｃ．４１６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１３９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２４６４９．４（ＢＢＳ１）：ｃ．８７１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２９１Ｔｅｒ）

ＮＭ＿１９８４２８．２（ＢＢＳ９）：ｃ．２６３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００１１７８００７．１（ＢＢＳ１２）：ｃ．１７０４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５６８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１２７６３７８．１（ＬＺＴＦＬ１）：ｃ．２７１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３１８８５．３（ＢＢＳ２）：ｃ．１８６４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６２２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１９８４２８．２（ＢＢＳ９）：ｃ．１７５９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５８７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１９８４２８．２（ＢＢＳ９）：ｃ．１７８９＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０２４６４９．４（ＢＢＳ１）：ｃ．４３２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１７６８２４．２（ＢＢＳ７）：ｃ．６３２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ２１１Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０１２２１０．３（ＴＲＩＭ３２）：ｃ．３８８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ１３０Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０３１８８５．３（ＢＢＳ２）：ｃ．８２３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２７５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２４６８５．３（ＢＢＳ１０）：ｃ．１４５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９Ｔｒｐ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＢＢＳ１、ＢＢＳ２、ＢＢＳ７、ＢＢＳ９、ＢＢＳ１０、ＢＢＳ１２、ＬＺＴＦＬ１、及びＴＲＩＭ３２から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、バルデー・ビードル症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０７５９】
錐体桿体ジストロフィー
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、錐体桿体ジストロフィーに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＲＰＧＲＩＰ１、ＤＲＡＭ２、ＡＢＣＡ４、ＡＤＡＭ９、及びＣＡＣＮＡ１Ｆから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。
ＮＭ＿０２０３６６．３（ＲＰＧＲＩＰ１）：ｃ．１５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１７８４５４．５（ＤＲＡＭ２）：ｃ．４９４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１６５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１７８４５４．５（ＤＲＡＭ２）：ｃ．１３１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｓｅｒ４４Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．１６１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ５４Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．５７１４＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．８８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６０７９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｌｅｕ２０２７Ｐｈｅ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．３１１３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ１０３８Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６３４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２１２Ｃｙｓ）
ＮＭ＿００３８１６．２（ＡＤＡＭ９）：ｃ．４９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００５１８３．３（ＣＡＣＮＡ１Ｆ）：ｃ．２４４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８２Ｔｅｒ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＲＰＧＲＩＰ１、ＤＲＡＭ２、ＡＢＣＡ４、ＡＤＡＭ９、及びＣＡＣＮＡ１Ｆから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、錐体桿体ジストロフィーを治療または予防するための方法に関する。

【０７６０】
先天性停在性夜盲

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、先天性停在性夜盲に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＧＲＭ６、ＴＲＰＭ１、ＧＰＲ１７９、及びＣＡＣＮＡ１Ｆから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００８４３．３（ＧＲＭ６）：ｃ．１４６２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４８８Ｔｅｒ）

ＮＭ＿００２４２０．５（ＴＲＰＭ１）：ｃ．２９９８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０００Ｔｅｒ）

ＮＭ＿００１００４３３４．３（ＧＰＲ１７９）：ｃ．６７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２２５Ｔｅｒ）

ＮＭ＿００５１８３．３（ＣＡＣＮＡ１Ｆ）：ｃ．２５７６＋１Ｇ＞Ａ

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＧＲＭ６、ＴＲＰＭ１、ＧＰＲ１７９、及びＣＡＣＮＡ１Ｆから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、先天性停在性夜盲を治療または予防するための方法に関する。

【０７６１】

Ｕｓｈｅｒ症候群

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、Ｕｓｈｅｒ症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＭＹＯ７Ａ、ＵＳＨ１Ｃ、ＣＤＨ２３、ＰＣＤＨ１５、ＵＳＨ２Ａ、ＡＤＧＲＶ１、ＷＨＲＮ、及びＣＬＲＮ１から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．６４０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２１４Ａｒｇ）

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．１２００＋１Ｇ＞Ａ

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．１４１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４７Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．１５５６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ５１９Ａｓｐ）

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．１９００Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６３４Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．１９６３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６５５Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．２０９４＋１Ｇ＞Ａ

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．４２９３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１４３１Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．５１０１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１７０１Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．５６１７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１８７３Ｔｒｐ）

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．５６６０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ１８８７Ｌｅｕ）

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．６０７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０２４Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．４７０＋１Ｇ＞Ａ

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．５９６８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１９９０Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．３７１９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１２４０Ｇｌｎ）

ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．４９４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１６５Ｍｅｔ）

NM_000260.3(MYO7A):c.5392C>T(p.Gln1798Ter)
NM_000260.3(MYO7A):c.5648G>A(p.Arg1883Gln)
NM_000260.3(MYO7A):c.448C>T(p.Arg150Ter)
NM_000260.3(MYO7A):c.700C>T(p.Gln234Ter)
NM_000260.3(MYO7A):c.635G>A(p.Arg212His)
NM_000260.3(MYO7A):c.1996C>T(p.Arg666Ter)
NM_005709.3(USH1C):c.216G>A(p.Val72=)
NM_022124.5(CDH23):c.7362+5G>A
NM_022124.5(CDH23):c.3481C>T(p.Arg1161Ter)
NM_022124.5(CDH23):c.3628C>T(p.Gln1210Ter)
NM_022124.5(CDH23):c.5272C>T(p.Gln1758Ter)
NM_022124.5(CDH23):c.5712+1G>A
NM_022124.5(CDH23):c.5712G>A(p.Thr1904=)
NM_022124.5(CDH23):c.5923+1G>A
NM_022124.5(CDH23):c.6049+1G>A
NM_022124.5(CDH23):c.7776G>A(p.Trp2592Ter)
NM_022124.5(CDH23):c.9556C>T(p.Arg3186Ter)
NM_022124.5(CDH23):c.3706C>T(p.Arg1236Ter)
NM_022124.5(CDH23):c.4309C>T(p.Arg1437Ter)
NM_022124.5(CDH23):c.6050-9G>A
NM_033056.3(PCDH15):c.3316C>T(p.Arg1106Ter)
NM_033056.3(PCDH15):c.7C>T(p.Arg3Ter)
NM_033056.3(PCDH15):c.1927C>T(p.Arg643Ter)
NM_001142772.1(PCDH15):c.400C>T(p.Arg134Ter)
NM_033056.3(PCDH15):c.3358C>T(p.Arg1120Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.11048-1G>A
NM_206933.2(USH2A):c.1143+1G>A
NM_206933.2(USH2A):c.11954G>A(p.Trp3985Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.12868C>T(p.Gln4290Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.14180G>A(p.Trp4727Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.14911C>T(p.Arg4971Ter)
NM_206933.2(USH2A):c.5788C>T(p.Arg1930Te

ｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．５８５８－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．６２２４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２０７５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．８２０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２７４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．８９８１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２９９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．９３０４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３１０２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．１３０１０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ４３３７Ｍｅｔ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．１４２４８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４７５０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．６３９８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２１３３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．６３２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．６６０１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２２０１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．１３３１６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ４４３９Ｉｌｅ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．４４０５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４６９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．９５７０＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．８７４０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９１４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．８６８１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．１０００Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３３４Ｔｒｐ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．１４１７５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４７２５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．９３９０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３１３０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．９０８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３０３Ｈｉｓ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．５７７６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．１１１５６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３７１９Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０３２１１９．３（ＡＤＧＲＶ１）：ｃ．２３９８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８００Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３２１１９．３（ＡＤＧＲＶ１）：ｃ．７４０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２４６９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３２１１９．３（ＡＤＧＲＶ１）：ｃ．１２６３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４２１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３２１１９．３（ＡＤＧＲＶ１）：ｃ．７１２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２３７７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３２１１９．３（ＡＤＧＲＶ１）：ｃ．１４８８５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４９６２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１５４０４．３（ＷＨＲＮ）：ｃ．１２６７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４２３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１７４８７８．２（ＣＬＲＮ１）：ｃ．６１９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０７Ｔｅｒ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＭＹＯ７Ａ、ＵＳＨ１Ｃ、ＣＤＨ２３、ＰＣＤＨ１５、Ｕ

ＳＨ２Ａ、ＡＤＧＲＶ１、ＷＨＲＮ、及びＣＬＲＮ１から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、増強されたＵｓｈｅｒ症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０７６２】

Ｌｅｂｅｒ先天性黒内障

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、Ｌｅｂｅｒ先天性黒内障に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＴＵＬＰ１、ＲＰＥ６５、ＳＰＡＴＡ７、ＡＩＰＬ１、ＣＲＢ１、ＮＭＮＡＴ１、及びＰＥＸ１から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。

ＮＭ＿００３３２２．５（ＴＵＬＰ１）：ｃ．１４９５＋１Ｇ＞Ａ

ＮＭ＿０００３２９．２（ＲＰＥ６５）：ｃ．１１＋５Ｇ＞Ａ

ＮＭ＿０１８４１８．４（ＳＰＡＴＡ７）：ｃ．３２２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０８Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０１４３３６．４（ＡＩＰＬ１）：ｃ．７８４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２６２Ｓｅｒ）

ＮＭ＿２０１２５３．２（ＣＲＢ１）：ｃ．１５７６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５２６Ｔｅｒ）

ＮＭ＿２０１２５３．２（ＣＲＢ１）：ｃ．３３０７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１１０３Ａｒｇ）

ＮＭ＿２０１２５３．２（ＣＲＢ１）：ｃ．２８４３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ９４８Ｔｙｒ）

ＮＭ＿０２２７８７．３（ＮＭＮＡＴ１）：ｃ．７６９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ２５７Ｌｙｓ）

ＮＭ＿０００４６６．２（ＰＥＸ１）：ｃ．２５２８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ８４３Ａｓｐ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＴＵＬＰ１、ＲＰＥ６５、ＳＰＡＴＡ７、ＡＩＰＬ１、ＣＲＢ１、ＮＭＮＡＴ１、及びＰＥＸ１から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、Ｌｅｂｅｒ先天性黒内障を治療または予防するための方法に関する。

【０７６３】

網膜色素変性症

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、網膜色素変性症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＣＲＢ１、ＩＦＴ１４０、ＲＰ１、ＩＭＰＤＨ１、ＰＲＰＦ３１、ＲＰＧＲ、ＡＢＣＡ４、ＲＰＥ６５、ＥＹＳ、ＮＲＬ、ＦＡＭ１６１Ａ、ＮＲ２Ｅ３、ＵＳＨ２Ａ、ＲＨＯ、ＰＤＥ６Ｂ、ＫＬＨＬ７、ＰＤＥ６Ａ、ＣＮＧＢ１、ＢＥＳＴ１、Ｃ２ｏｒｆ７１、ＰＲＰＨ２、ＣＡ４、ＣＥＲＫＬ、ＲＰＥ６５、ＰＤＥ６Ｂ、及びＡＤＧＲＶ１から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。

ＮＭ＿００１２５７９６５．１（ＣＲＢ１）：ｃ．２７１１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ９０４Ｔｙｒ）

ＮＭ＿０１４７１４．３（ＩＦＴ１４０）：ｃ．３８２７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１２７６Ｇｌｕ）

ＮＭ＿００６２６９．１（ＲＰ１）：ｃ．２０２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６７７Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００８８３．３（ＩＭＰＤＨ１）：ｃ．９３１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ３１１Ａｓｎ）

ＮＭ＿０１５６２９．３（ＰＲＰＦ３１）：ｃ．１２７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４２５Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０１５６２９．３（ＰＲＰＦ３１）：ｃ．１０７３＋１Ｇ＞Ａ

ＮＭ＿０００３２８．２（ＲＰＧＲ）：ｃ．１３８７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４６３Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．４５７７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１５２６Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００３５０．２（ＡＢＣＡ４）：ｃ．６２２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０７７Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００３２９．２（ＲＰＥ６５）：ｃ．２７１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９１Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００１１４２８００．１（ＥＹＳ）：ｃ．２１９４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７３２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１１４２８００．１（ＥＹＳ）：ｃ．４９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００６１７７．３（ＮＲＬ）：ｃ．１５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ５１Ｓｅｒ）
ＮＭ＿００１２０１５４３．１（ＦＡＭ１６１Ａ）：ｃ．１５６７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５２３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１４２４９．３（ＮＲ２Ｅ３）：ｃ．１６６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ５６Ａｒｇ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．２２０９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７３７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．１４８０３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９３５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．１００７３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ３３５８Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００５３９．３（ＲＨＯ）：ｃ．５４１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ１８１Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００２８３．３（ＰＤＥ６Ｂ）：ｃ．８９２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２９８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１０３１７１０．２（ＫＬＨＬ７）：ｃ．４５８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ１５３Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００４４０．２（ＰＤＥ６Ａ）：ｃ．１９２６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００１２９７．４（ＣＮＧＢ１）：ｃ．２１２８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７１０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１２９７．４（ＣＮＧＢ１）：ｃ．９５２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３１８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４１８３．３（ＢＥＳＴ１）：ｃ．６８２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ２２８Ａｓｎ）
ＮＭ＿００１０２９８８３．２（Ｃ２ｏｒｆ７１）：ｃ．１８２８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６１０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３２２．４（ＰＲＰＨ２）：ｃ．６４７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ２１６Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００７１７．４（ＣＡ４）：ｃ．４０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１４Ｔｒｐ）
ＮＭ＿２０１５４８．４（ＣＥＲＫＬ）：ｃ．７６９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２５７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３２９．２（ＲＰＥ６５）：ｃ．１１８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ４０Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００３２２．４（ＰＲＰＨ２）：ｃ．４９９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１６７Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００５３９．３（ＲＨＯ）：ｃ．４０３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１３５Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００２８３．３（ＰＤＥ６Ｂ）：ｃ．２１９３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０３２１１９．３（ＡＤＧＲＶ１）：ｃ．６９０１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２３０１Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＣＲＢ１、ＩＦＴ１４０、ＲＰ１、ＩＭＰＤＨ１、ＰＲＰＦ３１、ＲＰＧＲ、ＡＢＣＡ４、ＲＰＥ６５、ＥＹＳ、ＮＲＬ、ＦＡＭ１６１Ａ、ＮＲ２Ｅ３、ＵＳＨ２Ａ、ＲＨＯ、ＰＤＥ６Ｂ、ＫＬＨＬ７、ＰＤＥ６Ａ、ＣＮＧＢ１、ＢＥＳＴ１、Ｃ２ｏｒｆ７１、ＰＲＰＨ２、ＣＡ４、ＣＥＲＫＬ、ＲＰＥ６５、ＰＤＥ６Ｂ、及びＡＤＧＲＶ１から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、網膜色素変性症を治療または予防するための方法に関する。

【０７６４】

色覚異常

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、色覚異常に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＣＮＧＡ３、ＣＮＧＢ３、及びＡＴＦ６から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。
ＮＭ＿００１２９８．２（ＣＮＧＡ３）：ｃ．８４７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２８３Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００１２９８．２（ＣＮＧＡ３）：ｃ．１０１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００１２９８．２（ＣＮＧＡ３）：ｃ．１５８５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ５２９Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０１９０９８．４（ＣＮＧＢ３）：ｃ．１５７８＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０１９０９８．４（ＣＮＧＢ３）：ｃ．６０７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２０３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１９０９８．４（ＣＮＧＢ３）：ｃ．１１１９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３７３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７３４８．３（ＡＴＦ６）：ｃ．９７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３２４Ｃｙｓ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＣＮＧＡ３、ＣＮＧＢ３、及びＡＴＦ６から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、色覚異常を治療または予防するための方法に関する。

【０７６５】

聴覚に影響する疾患

これらに限定されないが、聴覚消失及び非症候群性難聴を含む、聴覚に影響する様々な疾患に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告され、表Ａに開示される。したがって、本発明の態様は、以下で議論される通り、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正する方法に関する。

【０７６６】

聴覚消失

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、聴覚消失に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＦＧＦ３、ＭＹＯ７Ａ、ＳＴＲＣ、ＡＣＴＧ１、ＳＬＣ１７Ａ８、ＴＭＣ１、ＧＪＢ２、ＭＹＨ１４、ＣＯＣＨ、ＣＤＨ２３、ＵＳＨ１Ｃ、ＧＪＢ２、ＭＹＯ７Ａ、ＰＣＤＨ１５、ＭＹＯ１５Ａ、ＭＹＯ３Ａ、ＷＨＲＮ、ＤＦＮＢ５９、ＴＭＣ１、ＬＯＸＨＤ１、ＴＭＰＲＳＳ３、ＯＴＯＧＬ、ＯＴＯＦ、ＪＡＧ１、及びＭＡＲＶＥＬＤ２から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。
ＮＭ＿００５２４７．２（ＦＧＦ３）：ｃ．２８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９５Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．６５２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ２１８Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００２６０．３（ＭＹＯ７Ａ）：ｃ．６８９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ２３０Ｖａｌ）
ＮＭ＿１５３７００．２（ＳＴＲＣ）：ｃ．４０５７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３５３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１６１４．３（ＡＣＴＧ１）：ｃ．７２１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ２４１Ｌｙｓ）
ＮＭ＿１３９３１９．２（ＳＬＣ１７Ａ８）：ｃ．６３２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ２１１Ｖａｌ）
ＮＭ＿１３８６９１．２（ＴＭＣ１）：ｃ．１７１４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ５７２Ａｓｎ）
ＮＭ＿００４００４．５（ＧＪＢ２）：ｃ．５９８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２００Ａｒｇ）
ＮＭ＿００４００４．５（ＧＪＢ２）：ｃ．７１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００４．５（ＧＪＢ２）：ｃ．４１６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｓｅｒ１３９Ａｓｎ）
ＮＭ＿００４００４．５（ＧＪＢ２）：ｃ．２２４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ７５Ｇｌｎ）
ＮＭ＿００４００４．５（ＧＪＢ２）：ｃ．９５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３２Ｈｉｓ）
ＮＭ＿００４００４．５（ＧＪＢ２）：ｃ．２５０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ８４Ｍｅｔ）

NM_004004.5(GJB2):c.428G>A(p.Arg143Gln)
NM_004004.5(GJB2):c.551G>A(p.Arg184Gln)
NM_004004.5(GJB2):c.223C>T(p.Arg75Trp)
NM_024729.3(MYH14):c.359C>T(p.Ser120Leu)
NM_004086.2(COCH):c.151C>T(p.Pro51Ser)
NM_022124.5(CDH23):c.4021G>A(p.Asp1341Asn)
NM_153700.2(STRC):c.4701+1G>A
NM_153676.3(USH1C):c.496+1G>A
NM_004004.5(GJB2):c.131G>A(p.Trp44Ter)
NM_004004.5(GJB2):c.283G>A(p.Val95Met)
NM_004004.5(GJB2):c.298C>T(p.His100Tyr)
NM_004004.5(GJB2):c.427C>T(p.Arg143Trp)
NM_004004.5(GJB2):c.109G>A(p.Val37Ile)
NM_004004.5(GJB2):c.-23+1G>A
NM_004004.5(GJB2):c.148G>A(p.Asp50Asn)
NM_004004.5(GJB2):c.134G>A(p.Gly45Glu)
NM_004004.5(GJB2):c.370C>T(p.Gln124Ter)
NM_004004.5(GJB2):c.230G>A(p.Trp77Ter)
NM_004004.5(GJB2):c.231G>A(p.Trp77Ter)
NM_000260.3(MYO7A):c.5899C>T(p.Arg1967Ter)
NM_000260.3(MYO7A):c.2005C>T(p.Arg669Ter)
NM_033056.3(PCDH15):c.733C>T(p.Arg245Ter)
NM_016239.3(MYO15A):c.3866+1G>A
NM_016239.3(MYO15A):c.6178-1G>A
NM_016239.3(MYO15A):c.8714-1G>A
NM_017433.4(MYO3A):c.2506-1G>A
NM_015404.3(WHRN):c.1417-1G>A
NM_001042702.3(DFNB59):c.499C>T(p.Arg167Ter)
NM_138691.2(TMC1):c.100C>T(p.Arg34Ter)
NM_138691.2(TMC1):c.1165C>T(p.Arg389Ter)
NM_144612.6(LOXHD1):c.2008C>T(p.Arg670Ter)
NM_144612.6(LOXHD1):c.4714C>T(p.Arg1572Ter)
NM_144612.6(LOXHD1):c.4480C>T(p.Arg1494Ter)
NM_024022.2(TMPRSS3):c.325C>T(p.Arg109Trp)
NM_173591.3(OTOGL):c.3076C>T(p.Gln1026Ter)
NM_194248.2(OTOF):c.4483C>T(p.Arg1495Ter)
NM_194248.2(OTOF):c.2122C>T(p.Arg708Ter)
NM_194248.2(OTOF):c.2485C>T(p.Gln829Ter)
NM_001038603.2(MARVELD2):c.1498C>T(p.Arg

５００Ｔｅｒ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＦＧＦ３、ＭＹＯ７Ａ、ＳＴＲＣ、ＡＣＴＧ１、ＳＬＣ１７Ａ８、ＴＭＣ１、ＧＪＢ２、ＭＹＨ１４、ＣＯＣＨ、ＣＤＨ２３、ＵＳＨ１Ｃ、ＧＪＢ２、ＭＹＯ７Ａ、ＰＣＤＨ１５、ＭＹＯ１５Ａ、ＭＹＯ３Ａ、ＷＨＲＮ、ＤＦＮＢ５９、ＴＭＣ１、ＬＯＸＨＤ１、ＴＭＰＲＳＳ３、ＯＴＯＧＬ、ＯＴＯＦ、ＪＡＧ１、及びＭＡＲＶＥＬＤ２から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、聴覚消失を治療または予防するための方法に関する。

【０７６７】
非症候群性難聴
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、非症候群性難聴に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＧＪＢ２、ＰＯＵ３Ｆ４、ＭＹＯ１５Ａ、ＴＭＰＲＳＳ３、ＬＯＸＨＤ１、ＯＴＯＦ、ＭＹＯ６、ＯＴＯＡ、ＳＴＲＣ、ＴＲＩＯＢＰ、ＭＡＲＶＥＬＤ２、ＴＭＣ１、ＴＥＣＴＡ、ＯＴＯＧＬ、及びＧＩＰＣ３から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。
ＮＭ＿００４００４．５（ＧＪＢ２）：ｃ．１６９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３０７．４（ＰＯＵ３Ｆ４）：ｃ．４９９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１６２３９．３（ＭＹＯ１５Ａ）：ｃ．８７６７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９２３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２４０２２．２（ＴＭＰＲＳＳ３）：ｃ．３２３－６Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０２４０２２．２（ＴＭＰＲＳＳ３）：ｃ．９１６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ３０６Ｔｈｒ）
ＮＭ＿１４４６１２．６（ＬＯＸＨＤ１）：ｃ．２４９７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８３３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１９４２４８．２（ＯＴＯＦ）：ｃ．２１５３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７１８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１９４２４８．２（ＯＴＯＦ）：ｃ．２８１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９４０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１９４２４８．２（ＯＴＯＦ）：ｃ．４７９９＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４９９９．３（ＭＹＯ６）：ｃ．８２６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２７６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１４４６７２．３（ＯＴＯＡ）：ｃ．１８８０＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１５３７００．２（ＳＴＲＣ）：ｃ．５１８８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１７３０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１５３７００．２（ＳＴＲＣ）：ｃ．３６７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１２２４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１５３７００．２（ＳＴＲＣ）：ｃ．４４０２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１４６８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２４０２２．２（ＴＭＰＲＳＳ３）：ｃ．１１９２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３９８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１０３９１４１．２（ＴＲＩＯＢＰ）：ｃ．６５９８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２２００Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１６２３９．３（ＭＹＯ１５Ａ）：ｃ．７８９３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０１６２３９．３（ＭＹＯ１５Ａ）：ｃ．５５３１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０１６２３９．３（ＭＹＯ１５Ａ）：ｃ．６０４６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１４４６１２．６（ＬＯＸＨＤ１）：ｃ．３１６９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０５７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１０３８６０３．２（ＭＡＲＶＥＬＤ２）：ｃ．１３３１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１３８６９１．２（ＴＭＣ１）：ｃ．１６７６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５５９Ｔｅｒ）

ＮＭ＿１３８６９１．２（ＴＭＣ１）：ｃ．１６７７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５５９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００５４２２．２（ＴＥＣＴＡ）：ｃ．５９７７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１９９３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１７３５９１．３（ＯＴＯＧＬ）：ｃ．４９８７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６６３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１５３７００．２（ＳＴＲＣ）：ｃ．３４９３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１６５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１５３７００．２（ＳＴＲＣ）：ｃ．３２１７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０７３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１６２３９．３（ＭＹＯ１５Ａ）：ｃ．５８９６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１９６６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３３２６１．２（ＧＩＰＣ３）：ｃ．４１１＋１Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＧＪＢ２、ＰＯＵ３Ｆ４、ＭＹＯ１５Ａ、ＴＭＰＲＳＳ３、ＬＯＸＨＤ１、ＯＴＯＦ、ＭＹＯ６、ＯＴＯＡ、ＳＴＲＣ、ＴＲＩＯＢＰ、ＭＡＲＶＥＬＤ２、ＴＭＣ１、ＴＥＣＴＡ、ＯＴＯＧＬ、及びＧＩＰＣ３から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、非症候群性難聴を治療または予防するための方法に関する。

【０７６８】

血液障害

これらに限定されないが、ベーターサラセミア、血友病Ａ、血友病Ｂ、血友病Ｃ、及びウィスコット・アルドリッチ症候群を含む、様々な血液障害に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告され、表Ａに開示される。したがって、本発明の態様は、以下で議論される通り、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正する方法に関する。

【０７６９】

ベーターサラセミア

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、ベーターサラセミアに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＨＢＢ遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．－１３７Ｃ＞Ｔ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．－５０－８８Ｃ＞Ｔ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．－１４０Ｃ＞Ｔ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．３１６－１９７Ｃ＞Ｔ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．９３－２１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．１１４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．１１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．９２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．３１５＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．９２＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．－５０－１０１Ｃ＞Ｔ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＨＢＢ遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、ベーターサラセミアを治療または予防する方法に関する。

【０７７０】

血友病Ａ

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、血友病Ａに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＦ８遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００１３２．３（Ｆ８）：ｃ．３１６９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ１０５７Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００１３２．３（Ｆ８）：ｃ．９０２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３０１Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００１３２．３（Ｆ８）：ｃ．１８３４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６１２Ｃｙｓ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＦ８遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、血友病Ａを治療または予防する方法に関する。

【０７７１】

第Ｖ因子ライデン

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、第Ｖ因子ライデン変異を矯正するために使用される。この疾患を引き起こす単一点変異（Ｇ１７４６－＞Ａ）は、白人集団における遺伝性多因子血栓症における最も豊富な遺伝的危険因子を表す。点変異により、血液凝固因子Ｆ５のタンパク質Ｃ依存性タンパク質分解切断部位（Ｒ５３３Ｒ５３４）に単一アミノ酸置換（Ｒ５３４［右矢印］Ｑ）が現れる。ヘテロ接合欠陥は、血栓症リスクのわずかな増加（約８倍）を伴うのに対し、ホモ接合欠陥は、はるかにより顕著な効果を有する（＞８０倍の増加リスク）。１９指向性ＲＮＡ編集は、ＲＮＡレベルでのその修復によって、この遺伝子欠陥を補う可能性を有する。

【０７７２】

血友病Ｂ

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、血友病Ｂに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＦ９遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００１３３．３（Ｆ９）：ｃ．８３５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ２７９Ｔｈｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＦ９遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、血友病Ｂを治療または予防する方法に関する。

【０７７３】

血友病Ｃ

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、血友病Ｃに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＦ１１遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００１２８．３（Ｆ１１）：ｃ．４００Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１２８．３（Ｆ１１）：ｃ．１４３２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ４７８Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００１２８．３（Ｆ１１）：ｃ．１２８８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ４３０Ｔｈｒ）
ＮＭ＿０００１２８．３（Ｆ１１）：ｃ．３２６－１Ｇ＞Ａ

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＦ１１遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、血友病Ｃを治療または予防する方法に関する。

【０７７４】

ウィスコット・アルドリッチ症候群

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、ウィスコット・アルドリッチ症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ

を矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＷＡＳ遺伝子に存在する。
ＮＭ＿０００３７７．２（ＷＡＳ）：ｃ．３７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００３７７．２（ＷＡＳ）：ｃ．２５７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ８６Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００３７７．２（ＷＡＳ）：ｃ．７７７＋１Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＷＡＳ遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、ウィスコット・アルドリッチ症候群を治療または予防する方法に関する。

【０７７５】
肝疾患
これらに限定されないが、トランスサイレチンアミロイドーシス、アルファ－１－アンチトリプシン欠乏症、ウィルソン病、及びフェニルケトン尿症を含む、様々な肝疾患に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告され、表Ａに開示される。したがって、本発明の態様は、以下で議論される通り、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正する方法に関する。

【０７７６】
トランスサイレチンアミロイドーシス
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、トランスサイレチンアミロイドーシスに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＴＴＲ遺伝子に存在する。
ＮＭ＿０００３７１．３（ＴＴＲ）：ｃ．４２４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ１４２Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００３７１．３（ＴＴＲ）：ｃ．１４８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ５０Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００３７１．３（ＴＴＲ）：ｃ．１１８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ４０Ｉｌｅ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＴＴＲ遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、トランスサイレチンアミロイドーシスを治療または予防する方法に関する。

【０７７７】
アルファ－１－アンチトリプシン欠乏症
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、アルファ－１－アンチトリプシン欠乏症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＳＥＲＰＩＮＡ１遺伝子に存在する。
ＮＭ＿０００２９５．４（ＳＥＲＰＩＮＡ１）：ｃ．５３８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１８０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１１２７７０１．１（ＳＥＲＰＩＮＡ１）：ｃ．１１７８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ３９３Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００１１２７７０１．１（ＳＥＲＰＩＮＡ１）：ｃ．２３０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ７７Ｐｈｅ）
ＮＭ＿００１１２７７０１．１（ＳＥＲＰＩＮＡ１）：ｃ．１０９６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ３６６Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００２９５．４（ＳＥＲＰＩＮＡ１）：ｃ．１１７７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ３９３Ｓｅｒ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＳＥＲＰＩＮＡ１遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→

ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、アルファ－１－アンチトリプシン欠乏症を治療または予防する方法に関する。

【０７７８】

ウィルソン病

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、ウィルソン病に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＡＴＰ７Ｂ遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２２９３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ７６５Ａｓｎ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．３９５５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１３１９Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２８６５＋１Ｇ＞Ａ

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．３７９６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１２６６Ａｒｇ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２６２１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ８７４Ｖａｌ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２０７１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ６９１Ａｒｇ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２１２８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ７１０Ｓｅｒ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２３３６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７７９Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．４０２１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１３４１Ｓｅｒ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．３１８２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１０６１Ｇｌｕ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．４１１４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３７２Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．１７０８－１Ｇ＞Ａ

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．８６５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２８９Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２９３０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ９７７Ｍｅｔ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．３６５９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ１２２０Ｍｅｔ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２６０５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ８６９Ａｒｇ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２９７５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ９９２Ｌｅｕ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２５１９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ８４０Ｌｅｕ）

ＮＭ＿０００００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２９０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ９６９Ｇｌｎ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＡＴＰ７Ｂ遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、ウィルソン病を治療または予防する方法に関する。

【０７７９】

フェニルケトン尿症

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、フェニルケトン尿症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＰＡＨ遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１３１５＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１２２２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４０８Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．８３８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ２８０Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．３３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７８２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２６１Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２５２Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．４７３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１５８Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７２７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２４３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．８４２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ２８１Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７２８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２４３Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１０６６－１１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７８１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２６１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１２２３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ４０８Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１１６２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ３８８Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１０６６－３Ｃ＞Ｔ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１２０８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ４０３Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．８９０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２９７Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．９２６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ３０９Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．４４１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．５２６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１７６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．６８８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ２３０Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７２１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２４１Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７４５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｌｅｕ２４９Ｐｈｅ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．４４２－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．８４２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７７６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ２５９Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１２００－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．９１２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．１０６５＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．４７２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１５８Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．７５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２５２Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００２７７．１（ＰＡＨ）：ｃ．８０９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２７０Ｌｙｓ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＰＡＨ遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、フェニルケトン尿症を治療または予防する方法に関する。

【０７８０】

腎疾患

これらに限定されないが、常染色体劣性多発性嚢胞腎疾患及び腎カルニチン輸送欠陥を含む、様々な腎臓疾患に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告され、表Ａに開示される。したがって、本発明の態様は、以下で議論される通り、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正する方法に関する。

【０７８１】

常染色体劣性多発性嚢胞腎疾患

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、常染色体劣性多発性嚢胞腎疾患に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＰＫＨＤ１遺伝子に存在する。

ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．１０４４４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３４８２Ｃｙｓ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．９３１９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３１０７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．１４８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．７０７＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．１４８６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．８３０３－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．２８５４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ９５２Ａｒｇ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．７１９４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２３９８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．１０２１９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３４０７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．１０７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ３６Ｍｅｔ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．８８２４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９４２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．９８２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３２８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．４８７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６２４Ｔｒｐ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．１６０２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．１６９４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．２３４１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７８１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．２４０７＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．２４５２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８１８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．５２３６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．６４９９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２１６７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．２７２５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９０９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．３７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１２４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１３８６９４．３（ＰＫＨＤ１）：ｃ．２８１０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ９３７Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＰＫＨＤ１遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、常染色体劣性多発性嚢胞腎疾患を治療または予防する方法に関する。

【０７８２】

腎カルニチン輸送欠陥

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、腎カルニ

チン輸送欠陥に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＳＬＣ２２Ａ５遺伝子に存在する。
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．７６０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２５４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．３９６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１３２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．８４４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２８２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．５０５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６９Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．１３１９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ４４０Ｍｅｔ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．１１９５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３９９Ｔｒｐ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．６９５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ２３２Ｍｅｔ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．８４５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２８２Ｇｌｎ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．１１９３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ３９８Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．１４６３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ４８８Ｈｉｓ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．３３８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１１３Ｔｙｒ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．１３６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ４６Ｓｅｒ）
ＮＭ＿００３０６０．３（ＳＬＣ２２Ａ５）：ｃ．５０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１６９Ｇｌｎ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＳＬＣ２２Ａ５遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、腎カルニチン輸送欠陥を治療または予防する方法に関する。

【０７８３】

筋疾患

これらに限定されないが、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型筋ジストロフィー、肢体型筋ジストロフィー、エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー、及び顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを含む、様々な筋肉疾患に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告され、表Ａに開示される。したがって、本発明の態様は、以下で議論される通り、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正する方法に関する。

【０７８４】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む少なくともＤＭＤ遺伝子において存在する。
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２７９７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９３３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４８７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１６２４Ｔｅｒ）

ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５５５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１８５１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３１８８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１０６３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８３５７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２７８６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７８１７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２６０６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７７５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２５８５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５９１７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１９７３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５６４１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１８８１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５１３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１７１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４２４０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４１４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３４２７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１４３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２４０７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８０３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２３６８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７９０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１６８３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５６１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１６６３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５５５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１３８８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４６３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１３３１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１３２４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４４２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３５５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５５０６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１８３６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１５０４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５０２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５０３２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１６７８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４５７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１５３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１５９４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５３２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１１５０－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．６２２３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２０７５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３７４７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１２４９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２８６１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ９５４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９５６３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４４８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４９５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４３１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８２０９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２７３７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４０７１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２６６５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８８９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２２０２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７３４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２０７７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６９３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１６５３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５５１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１０６１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３５４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８９１４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２９７２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．６１１８－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４７２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１５７７Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＤＭＤ遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを治療または予防する方法に関する。

【０７８５】

ベッカー型筋ジストロフィー

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、ベッカー型筋ジストロフィーに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正

するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む少なくともＤＭＤ遺伝子において存在する。

ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３４１３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１１３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３５８－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１０１０８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３３７０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．６３７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２１２５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９５６８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３１９０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８７１３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９０５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１６１５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５３９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３１５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０５１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３４３２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５２８７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１７６３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５５３０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１８４４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８６０８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２８７０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８６５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２８８６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８９４４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９８２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５８９９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１９６７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１００３３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３３４５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１００８６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４０１９．２（ＤＭＤ）：ｃ．１０２０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｈｒ３４０＝）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１２６１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４２１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１４６５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４８９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１９９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６６４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２０３２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６７８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２３３２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７７８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２４１９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８０７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２６５０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８８４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２８０４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３２７６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３２９５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１０９９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３３６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１１２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３５８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４１１７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３７３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．６４９＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．６９０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２３０２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７１８９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２３９７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７３０９＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７６５７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２５５３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７６８２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２５６１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７６８３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２５６１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．７８９４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２６３２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９３６１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９５６４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２９５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９８６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３１＋３６９４７Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１０２７９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３４２７Ｔｅｒ）

ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４３３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１４５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１０１７１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３３９１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１９５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９３３７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３１１３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．８０３８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２６８０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１８１２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１０９３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３６５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１７０４＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１９１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１３３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５８６８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１９５６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５６５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１８９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．５０８９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１６９７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．２５１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．１０４７７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３４９３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．９３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．４１７４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３９２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３９４０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１３１４Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＤＭＤ遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、ベッカー型筋ジストロフィーを治療または予防する方法に関する。

【０７８６】

肢体型筋ジストロフィー

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、肢体型筋ジストロフィーに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＳＧＣＢ、ＭＹＯＴ、ＬＭＮＡ、ＣＡＰＮ３、ＤＹＳＦ、ＳＧＣＡ、ＴＴＮ、ＡＮＯ５、ＴＲＡＰＰＣ１１、ＬＭＮＡ、ＰＯＭＴ１、及びＦＫＲＰから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００２３２．４（ＳＧＣＢ）：ｃ．３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００６７９０．２（ＭＹＯＴ）：ｃ．１６４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ５５Ｐｈｅ）
ＮＭ＿００６７９０．２（ＭＹＯＴ）：ｃ．１７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ５７Ｉｌｅ）
ＮＭ＿１７０７０７．３（ＬＭＮＡ）：ｃ．１４８８＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１７０７０７．３（ＬＭＮＡ）：ｃ．１６０９－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１７１５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ５７２Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．２２４３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ７４８Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１４５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１３１９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ４４０Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１３４３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ４４８Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００００７０．２（ＣＡＰＮ３）：ｃ．１４６５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４８９Ｔｒｐ）

NM_000070.2(CAPN3):c.1714C>T(p.Arg572Trp)
NM_000070.2(CAPN3):c.2306G>A(p.Arg769Gln)
NM_000070.2(CAPN3):c.133G>A(p.Ala45Thr)
NM_000070.2(CAPN3):c.499-1G>A
NM_000070.2(CAPN3):c.439C>T(p.Arg147Ter)
NM_000070.2(CAPN3):c.1063C>T(p.Arg355Trp)
NM_000070.2(CAPN3):c.1250C>T(p.Thr417Met)
NM_000070.2(CAPN3):c.245C>T(p.Pro82Leu)
NM_000070.2(CAPN3):c.2242C>T(p.Arg748Ter)
NM_000070.2(CAPN3):c.1318C>T(p.Arg440Trp)
NM_000070.2(CAPN3):c.1333G>A(p.Gly445Arg)
NM_000070.2(CAPN3):c.1957C>T(p.Gln653Ter)
NM_000070.2(CAPN3):c.1801-1G>A
NM_000070.2(CAPN3):c.2263+1G>A
NM_000070.2(CAPN3):c.956C>T(p.Pro319Leu)
NM_000070.2(CAPN3):c.1468C>T(p.Arg490Trp)
NM_000070.2(CAPN3):c.802-9G>A
NM_000070.2(CAPN3):c.1342C>T(p.Arg448Cys)
NM_000070.2(CAPN3):c.1303G>A(p.Glu435Lys)
NM_000070.2(CAPN3):c.1993-1G>A
NM_003494.3(DYSF):c.3113G>A(p.Arg1038Gln)
NM_001130987.1(DYSF):c.5174+1G>A
NM_001130987.1(DYSF):c.159G>A(p.Trp53Ter)
NM_001130987.1(DYSF):c.2929C>T(p.Arg977Trp)
NM_001130987.1(DYSF):c.4282C>T(p.Gln1428Ter)
NM_001130987.1(DYSF):c.1577-1G>A
NM_003494.3(DYSF):c.5529G>A(p.Trp1843Ter)
NM_001130987.1(DYSF):c.1576+1G>A
NM_001130987.1(DYSF):c.4462C>T(p.Gln1488Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.5429G>A(p.Arg1810Lys)
NM_003494.3(DYSF):c.5077C>T(p.Arg1693Trp)

NM_001130978.1(DYSF):c.1813C>T(p.Gln605Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.3230G>A(p.Trp1077Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.265C>T(p.Arg89Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.4434G>A(p.Trp1478Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.3478C>T(p.Gln1160Ter)
NM_001130987.1(DYSF):c.1372G>A(p.Gly458Arg)
NM_003494.3(DYSF):c.4090C>T(p.Gln1364Ter)
NM_001130987.1(DYSF):c.2409+1G>A
NM_003494.3(DYSF):c.1708C>T(p.Gln570Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.1956G>A(p.Trp652Ter)
NM_001130987.1(DYSF):c.5004-1G>A
NM_003494.3(DYSF):c.331C>T(p.Gln111Ter)
NM_001130978.1(DYSF):c.5776C>T(p.Arg1926Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.6124C>T(p.Arg2042Cys)
NM_003494.3(DYSF):c.2643+1G>A
NM_003494.3(DYSF):c.4253G>A(p.Gly1418Asp)
NM_003494.3(DYSF):c.610C>T(p.Arg204Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.1834C>T(p.Gln612Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.5668-7G>A
NM_001130978.1(DYSF):c.3137G>A(p.Arg1046His)
NM_003494.3(DYSF):c.1053+1G>A
NM_003494.3(DYSF):c.1398-1G>A
NM_003494.3(DYSF):c.1481-1G>A
NM_003494.3(DYSF):c.2311C>T(p.Gln771Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.2869C>T(p.Gln957Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.4756C>T(p.Arg1586Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.5509G>A(p.Asp1837Asn)
NM_003494.3(DYSF):c.5644C>T(p.Gln1882Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.5946+1G>A
NM_003494.3(DYSF):c.937+1G>A
NM_003494.3(DYSF):c.5266C>T(p.Gln1756Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.3832C>T(p.Gln1278Ter)
NM_003494.3(DYSF):c.5525+1G>A
NM_003494.3(DYSF):c.3112C>T(p.Arg1038Ter)

ＮＭ＿０００００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．２９３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ９８Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．８５０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２８４Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．４０３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．４０９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ１３７Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．７４７＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．２２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７７Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．１０１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３４Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００００２３．３（ＳＧＣＡ）：ｃ．７３９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ２４７Ｍｅｔ）
ＮＭ＿００１２５６８５０．１（ＴＴＮ）：ｃ．８７３９４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９１３２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．７６２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．１２１３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４０５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．１６３９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５４７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．１４０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４６９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．１２１０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４０４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．２２７２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７５８Ｃｙｓ）
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．４１－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．１７２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５８Ｔｒｐ）
ＮＭ＿２１３５９９．２（ＡＮＯ５）：ｃ．１８９８＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０２１９４２．５（ＴＲＡＰＰＣ１１）：ｃ．１２８７＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿１７０７０７．３（ＬＭＮＡ）：ｃ．１６０８＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００７１７１．３（ＰＯＭＴ１）：ｃ．１８６４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６２２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０２４３０１．４（ＦＫＲＰ）：ｃ．３１３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１０５Ｔｅｒ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＳＧＣＢ、ＭＹＯＴ、ＬＭＮＡ、ＣＡＰＮ３、ＤＹＳＦ、ＳＧＣＡ、ＴＴＮ、ＡＮＯ５、ＴＲＡＰＰＣ１１、ＬＭＮＡ、ＰＯＭＴ１、及びＦＫＲＰから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、肢体型筋ジストロフィーを治療または予防するための方法に関する。

【０７８７】

エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィーに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＥＭＤまたはＳＹＮＥ１遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００１１７．２（ＥＭＤ）：ｃ．３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｍｅｔ１Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０３３０７１．３（ＳＹＮＥ１）：ｃ．１１９０８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３９７０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０３３０７１．３（ＳＹＮＥ１）：ｃ．２１７２１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７２４１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１１７．２（ＥＭＤ）：ｃ．１３０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４４Ｔｅｒ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＥＭＤまたはＳＹＮＥ１遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィーを治療または予防する方法に関する。

【０７８８】

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＳＭＣＨＤ１遺伝子に存在する。
ＮＭ＿０１５２９５．２（ＳＭＣＨＤ１）：ｃ．３８０１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０１５２９５．２（ＳＭＣＨＤ１）：ｃ．１８４３－１Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＳＭＣＨＤ１遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを治療または予防するための方法に関する。

【０７８９】

先天性代謝異常症（ＩＥＭ）

これらに限定されないが、原発性高シュウ酸尿症１型、アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ欠損症、及びメープルシロップ尿症を含む、様々なＩＥＭに関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告され、表Ａに開示される。したがって、本発明の態様は、以下で議論される通り、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正する方法に関する。

【０７９０】

原発性高シュウ酸尿症１型

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、原発性高シュウ酸尿症１型に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＡＧＸＴ遺伝子に存在する。
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．２４５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ８２Ｇｌｕ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．６９８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２３３Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．４６６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１５６Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．１０６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３６Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．３４６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１１６Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．５６８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１９０Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．６５３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ２１８Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．７３７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２４６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．１０４９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ３５０Ａｓｐ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．４７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ１５８Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．９０７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３０３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．９９６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３３２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００３０．２（ＡＧＸＴ）：ｃ．５０８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１７０Ａｒｇ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＡＧＸＴ遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、原発性高シュウ酸尿症１型を治療または予防する方法に関する。

【０７９１】

アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＡＳＬ遺伝子に存在する。
ＮＭ＿００１０２４９４３．１（ＡＳＬ）：ｃ．１１５３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３８５Ｃｙ

ｓ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．５３２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ１７８Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．５４５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１８２Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．１７５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ５９Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．７１８＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．８８９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９７Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．１３６０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４５４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．１０６０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３５４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．３５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１２Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．４４６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．５４４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１８２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００４８．３（ＡＳＬ）：ｃ．１１３５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３７９Ｃｙｓ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＡＳＬ遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症を治療または予防する方法に関する。

【０７９２】

オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ欠損症

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ欠損症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＯＴＣ遺伝子に存在する。
ＮＭ＿０００５３１．５（ＯＴＣ）：ｃ．１１９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ４０Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００５３１．５（ＯＴＣ）：ｃ．４２２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１４１Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００５３１．５（ＯＴＣ）：ｃ．８２９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２７７Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００５３１．５（ＯＴＣ）：ｃ．６７４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ２２５Ｌｅｕ）
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＯＴＣ遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ欠損症を治療または予防する方法に関する。

【０７９３】

メープルシロップ尿症

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、メープルシロップ尿症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＢＣＫＤＨＡ、ＢＣＫＤＨＢ、ＤＢＴ、及びＤＬＤから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．４７６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１５９Ｇｌｎ）
ＮＭ＿１８３０５０．３（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｍｅｔ１Ｉｌｅ）
ＮＭ＿１８３０５０．３（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．５５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ１８５Ｌｅｕ）
ＮＭ＿００１９１８．３（ＤＢＴ）：ｃ．１０３３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ３４５Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．９４０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３１４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．７９３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２６５Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．８６８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２９０Ａｒｇ

)
ＮＭ＿０００１０８．４（ＤＬＤ）：ｃ．１１２３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ３７５Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．１２３４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ４１２Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．２８８＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．９７９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ３２７Ｌｙｓ）
ＮＭ＿００１９１８．３（ＤＢＴ）：ｃ．９０１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３０１Ｃｙｓ）
ＮＭ＿１８３０５０．３（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．５０９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１７０Ｈｉｓ）
ＮＭ＿１８３０５０．３（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．７９９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２６７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１８３０５０．３（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．８５３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２８５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１８３０５０．３（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．９７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３２４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿１８３０５０．３（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．８３２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２７８Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．１０３６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３４６Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．２８８＋９Ｃ＞Ｔ
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．６３２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ２１１Ｍｅｔ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．６５９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｌａ２２０Ｖａｌ）
ＮＭ＿０００７０９．３（ＢＣＫＤＨＡ）：ｃ．９６４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３２２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１９１８．３（ＤＢＴ）：ｃ．１２９１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４３１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１９１８．３（ＤＢＴ）：ｃ．２５１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ８４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００１９１８．３（ＤＢＴ）：ｃ．８７１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５６．４（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．１０１６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ３３９Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００００５６．４（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．３４４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００５６．４（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．６３３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００００５６．４（ＢＣＫＤＨＢ）：ｃ．９５２－１Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＢＣＫＤＨＡ、ＢＣＫＤＨＢ、ＤＢＴ、及びＤＬＤから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、メープルシロップ尿症を治療または予防するための方法に関する。

【０７９４】

がん関連疾患

これらに限定されないが、乳癌卵巣癌疾患及びリンチ症候群を含む、様々ながん及びがん関連疾患に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告され、表Ａに開示される。したがって、本発明の態様は、以下で議論される通り、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正する方法に関する。

【０７９５】

乳癌卵巣癌

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、乳癌卵巣癌に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＢＲＣＡ１またはＢＲＣＡ２遺伝子に存在する。

ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５０９５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６９９Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００００９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７５５８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２５２０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．２５７２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８５８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．３６０７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１２０３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５５０３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１８３５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．２０５９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６８７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４６７５＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５２５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１７５１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５４４４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１８１５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．９３１８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３１０６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．９３８２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３１２８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．２７４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．６９５２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２３１８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．１６８７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５６３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．２５９９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８６７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．７８４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２６２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．２８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５５４２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１８４８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５１６１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１７２１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４５７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１５２５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４２７０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４２４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４２２５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４０９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．４０６６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３５６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．３６７９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１２２７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．１９１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６４０Ｔｅｒ）

NM_007294.3(BRCA1):c.963G>A(p.Trp321Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.718C>T(p.Gln240Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9196C>T(p.Gln3066Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9154C>T(p.Arg3052Trp)
NM_007294.3(BRCA1):c.3991C>T(p.Gln1331Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4097-1G>A
NM_007294.3(BRCA1):c.1059G>A(p.Trp353Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1115G>A(p.Trp372Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1138C>T(p.Gln380Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1612C>T(p.Gln538Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1621C>T(p.Gln541Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1630C>T(p.Gln544Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.178C>T(p.Gln60Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1969C>T(p.Gln657Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.2275C>T(p.Gln759Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.2410C>T(p.Gln804Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.2869C>T(p.Gln957Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.2923C>T(p.Gln975Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.3268C>T(p.Gln1090Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.3430C>T(p.Gln1144Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.3544C>T(p.Gln1182Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4075C>T(p.Gln1359Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4201C>T(p.Gln1401Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4399C>T(p.Gln1467Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4552C>T(p.Gln1518Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5054C>T(p.Thr1685Ile)
NM_007294.3(BRCA1):c.514C>T(p.Gln172Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5239C>T(p.Gln1747Te

r)
NM_007294.3(BRCA1):c.5266C>T(p.Gln1756Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5335C>T(p.Gln1779Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5345G>A(p.Trp1782Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5511G>A(p.Trp1837Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5536C>T(p.Gln1846Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.55C>T(p.Gln19Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.949C>T(p.Gln317Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.928C>T(p.Gln310Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5117G>A(p.Gly1706Glu)
NM_007294.3(BRCA1):c.5136G>A(p.Trp1712Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4327C>T(p.Arg1443Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1471C>T(p.Gln491Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1576C>T(p.Gln526Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.160C>T(p.Gln54Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.2683C>T(p.Gln895Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.2761C>T(p.Gln921Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.3895C>T(p.Gln1299Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4339C>T(p.Gln1447Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4372C>T(p.Gln1458Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5153G>A(p.Trp1718Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5445G>A(p.Trp1815Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5510G>A(p.Trp1837Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5346G>A(p.Trp1782Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1116G>A(p.Trp372Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1999C>T(p.Gln667Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4183C>T(p.Gln1395Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4810C>T(p.Gln1604Te

r)
NM_007294.3(BRCA1):c.850C>T(p.Gln284Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1058G>A(p.Trp353Ter
)
NM_007294.3(BRCA1):c.131G>A(p.Cys44Tyr)
NM_007294.3(BRCA1):c.1600C>T(p.Gln534Ter
)
NM_007294.3(BRCA1):c.3286C>T(p.Gln1096Te
r)
NM_007294.3(BRCA1):c.3403C>T(p.Gln1135Te
r)
NM_007294.3(BRCA1):c.34C>T(p.Gln12Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4258C>T(p.Gln1420Te
r)
NM_007294.3(BRCA1):c.4609C>T(p.Gln1537Te
r)
NM_007294.3(BRCA1):c.5154G>A(p.Trp1718Te
r)
NM_007294.3(BRCA1):c.5431C>T(p.Gln1811Te
r)
NM_007294.3(BRCA1):c.241C>T(p.Gln81Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.3331C>T(p.Gln1111Te
r)
NM_007294.3(BRCA1):c.3967C>T(p.Gln1323Te
r)
NM_007294.3(BRCA1):c.415C>T(p.Gln139Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.505C>T(p.Gln169Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5194−12G>A
NM_007294.3(BRCA1):c.5212G>A(p.Gly1738Ar
g)
NM_007294.3(BRCA1):c.5332+1G>A
NM_007294.3(BRCA1):c.1480C>T(p.Gln494Ter
)
NM_007294.3(BRCA1):c.2563C>T(p.Gln855Ter
)
NM_007294.3(BRCA1):c.1066C>T(p.Gln356Ter
)
NM_007294.3(BRCA1):c.3718C>T(p.Gln1240Te
r)
NM_007294.3(BRCA1):c.3817C>T(p.Gln1273Te
r)
NM_007294.3(BRCA1):c.3937C>T(p.Gln1313Te
r)
NM_007294.3(BRCA1):c.4357+1G>A
NM_007294.3(BRCA1):c.5074+1G>A
NM_007294.3(BRCA1):c.5277+1G>A
NM_007294.3(BRCA1):c.2338C>T(p.Gln780Ter
)
NM_007294.3(BRCA1):c.3598C>T(p.Gln1200Te
r)

NM_007294.3(BRCA1):c.3841C>T(p.Gln1281Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4222C>T(p.Gln1408Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4524G>A(p.Trp1508Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5353C>T(p.Gln1785Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.962G>A(p.Trp321Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.220C>T(p.Gln74Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.2713C>T(p.Gln905Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.2800C>T(p.Gln934Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4612C>T(p.Gln1538Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.3352C>T(p.Gln1118Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4834C>T(p.Gln1612Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4523G>A(p.Trp1508Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.5135G>A(p.Trp1712Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.1155G>A(p.Trp385Ter)
NM_007294.3(BRCA1):c.4987-1G>A
NM_000059.3(BRCA2):c.9573G>A(p.Trp3191Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.1945C>T(p.Gln649Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.217C>T(p.Gln73Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.523C>T(p.Gln175Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2548C>T(p.Gln850Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2905C>T(p.Gln969Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.4689G>A(p.Trp1563Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.4972C>T(p.Gln1658Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.1184G>A(p.Trp395Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2137C>T(p.Gln713Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3217C>T(p.Gln1073Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3523C>T(p.Gln1175Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.4783C>T(p.Gln1595Te

r)
NM_000059.3(BRCA2):c.5800C>T(p.Gln1934Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.6478C>T(p.Gln2160Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7033C>T(p.Gln2345Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7495C>T(p.Gln2499Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7501C>T(p.Gln2501Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7887G>A(p.Trp2629Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8910G>A(p.Trp2970Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9139C>T(p.Gln3047Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9739C>T(p.Gln3247Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.582G>A(p.Trp194Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7963C>T(p.Gln2655Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8695C>T(p.Gln2899Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8869C>T(p.Gln2957Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.1117C>T(p.Gln373Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.1825C>T(p.Gln609Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2455C>T(p.Gln819Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2881C>T(p.Gln961Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3265C>T(p.Gln1089Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3283C>T(p.Gln1095Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3442C>T(p.Gln1148Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3871C>T(p.Gln1291Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.439C>T(p.Gln147Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.4525C>T(p.Gln1509Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.475+1G>A
NM_000059.3(BRCA2):c.5344C>T(p.Gln1782Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.5404C>T(p.Gln1802Ter)

NM_000059.3(BRCA2):c.5773C>T(p.Gln1925Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.5992C>T(p.Gln1998Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.6469C>T(p.Gln2157Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7261C>T(p.Gln2421Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7303C>T(p.Gln2435Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7471C>T(p.Gln2491Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7681C>T(p.Gln2561Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7738C>T(p.Gln2580Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7886G>A(p.Trp2629Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8140C>T(p.Gln2714Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8363G>A(p.Trp2788Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8572C>T(p.Gln2858Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8773C>T(p.Gln2925Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8821C>T(p.Gln2941Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9109C>T(p.Gln3037Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9317G>A(p.Trp3106Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9466C>T(p.Gln3156Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9572G>A(p.Trp3191Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8490G>A(p.Trp2830Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.5980C>T(p.Gln1994Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7721G>A(p.Trp2574Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.196C>T(p.Gln66Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7618-1G>A
NM_000059.3(BRCA2):c.8489G>A(p.Trp2830Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7857G>A(p.Trp2619Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.1261C>T(p.Gln421Ter)

NM_000059.3(BRCA2):c.1456C>T(p.Gln486Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3319C>T(p.Gln1107Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.5791C>T(p.Gln1931Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.6070C>T(p.Gln2024Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7024C>T(p.Gln2342Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.961C>T(p.Gln321Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9380G>A(p.Trp3127Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8364G>A(p.Trp2788Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7758G>A(p.Trp2586Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2224C>T(p.Gln742Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.5101C>T(p.Gln1701Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.5959C>T(p.Gln1987Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7060C>T(p.Gln2354Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9100C>T(p.Gln3034Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9148C>T(p.Gln3050Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9883C>T(p.Gln3295Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.1414C>T(p.Gln472Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.1689G>A(p.Trp563Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.581G>A(p.Trp194Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.6490C>T(p.Gln2164Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7856G>A(p.Trp2619Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8970G>A(p.Trp2990Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.92G>A(p.Trp31Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9376C>T(p.Gln3126Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.93G>A(p.Trp31Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.1189C>T(p.Gln397Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2818C>T(p.Gln940Ter)

NM_000059.3(BRCA2):c.2979G>A(p.Trp993Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3166C>T(p.Gln1056Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.4285C>T(p.Gln1429Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.6025C>T(p.Gln2009Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.772C>T(p.Gln258Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7877G>A(p.Trp2626Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3109C>T(p.Gln1037Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.4222C>T(p.Gln1408Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7480C>T(p.Arg2494Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7878G>A(p.Trp2626Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9076C>T(p.Gln3026Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.1855C>T(p.Gln619Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.4111C>T(p.Gln1371Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.5656C>T(p.Gln1886Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7757G>A(p.Trp2586Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8243G>A(p.Gly2748Asp)
NM_000059.3(BRCA2):c.8878C>T(p.Gln2960Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8487+1G>A
NM_000059.3(BRCA2):c.8677C>T(p.Gln2893Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.250C>T(p.Gln84Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.6124C>T(p.Gln2042Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.7617+1G>A
NM_000059.3(BRCA2):c.8575C>T(p.Gln2859Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.8174G>A(p.Trp2725Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.3187C>T(p.Gln1063Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.9381G>A(p.Trp3127Ter)
NM_000059.3(BRCA2):c.2095C>T(p.Gln699Ter)

ＮＭ＿００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．１６４２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５４８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．８６０８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２８７０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．３４１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１１３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．４２４６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１４１６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．６４７５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２１５９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７３６６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２４５６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７５１６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２５０６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．８９６９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２９９０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．６４８７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２１６３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．２９７８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ９９３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．７６１５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２５３９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．９１０６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３０３６Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＢＲＣＡ１またはＢＲＣＡ２遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、乳癌卵巣癌を治療または予防する方法に関する。

【０７９６】

リンチ症候群

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、リンチ症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＭＳＨ６、ＭＳＨ２、ＥＰＣＡＭ、ＰＭＳ２、及びＭＬＨ１から選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．１０４５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３４９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．１３８４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４６２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００２３５４．２（ＥＰＣＡＭ）：ｃ．１３３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００２３５４．２（ＥＰＣＡＭ）：ｃ．４２９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１４３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００２３５４．２（ＥＰＣＡＭ）：ｃ．５２３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１７５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．２６８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．３５０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１１７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．２７３５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ９１２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．３５５６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．３８８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５３５．６（ＰＭＳ２）：ｃ．１９１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５３５．６（ＰＭＳ２）：ｃ．１８９１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６３１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．４５４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．１０３０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３４４Ｔｅｒ）

NM_000179.2(MSH6):c.2330G>A(p.Trp777Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.2191C>T(p.Gln731Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.2764C>T(p.Arg922Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.2815C>T(p.Gln939Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.3020G>A(p.Trp1007Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.3436C>T(p.Gln1146Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.3647-1G>A
NM_000179.2(MSH6):c.3772C>T(p.Gln1258Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.3838C>T(p.Gln1280Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.706C>T(p.Gln236Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.730C>T(p.Gln244Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1171C>T(p.Gln391Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1192C>T(p.Gln398Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1225C>T(p.Gln409Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1276C>T(p.Gln426Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1528C>T(p.Gln510Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1609C>T(p.Gln537Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1613G>A(p.Trp538Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1614G>A(p.Trp538Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1624C>T(p.Gln542Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1684C>T(p.Gln562Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1731+1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.1731+5G>A
NM_000249.3(MLH1):c.1732-1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.1896G>A(p.Glu632=)
NM_000249.3(MLH1):c.1989+1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.1990-1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.1998G>A(p.Trp666Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.208-1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.2101C>T(p.Gln701Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.2136G>A(p.Trp712Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.2224C>T(p.Gln742Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.230G>A(p.Cys77Tyr)
NM_000249.3(MLH1):c.256C>T(p.Gln86Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.436C>T(p.Gln146Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.445C>T(p.Gln149Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.545G>A(p.Arg182Lys)
NM_000249.3(MLH1):c.731G>A(p.Gly244Asp)
NM_000249.3(MLH1):c.76C>T(p.Gln26Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.842C>T(p.Ala281Val)
NM_000249.3(MLH1):c.882C>T(p.Leu294=)
NM_000249.3(MLH1):c.901C>T(p.Gln301Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1013G>A(p.Gly338Glu)
NM_000251.2(MSH2):c.1034G>A(p.Trp345Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1129C>T(p.Gln377Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1183C>T(p.Gln395Ter)

NM_000251.2(MSH2):c.1189C>T(p.Gln397Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1204C>T(p.Gln402Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1276+1G>A
NM_000251.2(MSH2):c.1528C>T(p.Gln510Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1552C>T(p.Gln518Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1720C>T(p.Gln574Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1777C>T(p.Gln593Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1885C>T(p.Gln629Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2087C>T(p.Pro696Leu)
NM_000251.2(MSH2):c.2251G>A(p.Gly751Arg)
NM_000251.2(MSH2):c.2291G>A(p.Trp764Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2292G>A(p.Trp764Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2446C>T(p.Gln816Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2470C>T(p.Gln824Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2536C>T(p.Gln846Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2581C>T(p.Gln861Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2634G>A(p.Glu878=)
NM_000251.2(MSH2):c.2635C>T(p.Gln879Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.28C>T(p.Gln10Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.472C>T(p.Gln158Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.478C>T(p.Gln160Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.484G>A(p.Gly162Arg)
NM_000251.2(MSH2):c.490G>A(p.Gly164Arg)
NM_000251.2(MSH2):c.547C>T(p.Gln183Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.577C>T(p.Gln193Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.643C>T(p.Gln215Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.645+1G>A
NM_000251.2(MSH2):c.652C>T(p.Gln218Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.754C>T(p.Gln252Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.792+1G>A
NM_000251.2(MSH2):c.942G>A(p.Gln314=)
NM_000535.6(PMS2):c.949C>T(p.Gln317Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.306+1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.62C>T(p.Ala21Val)
NM_000251.2(MSH2):c.1865C>T(p.Pro622Leu)
NM_000179.2(MSH6):c.426G>A(p.Trp142Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.715C>T(p.Gln239Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.350C>T(p.Thr117Met)
NM_000251.2(MSH2):c.1915C>T(p.His639Tyr)
NM_000251.2(MSH2):c.289C>T(p.Gln97Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2785C>T(p.Arg929Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.131C>T(p.Ser44Phe)
NM_000249.3(MLH1):c.1219C>T(p.Gln407Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.306+5G>A
NM_000251.2(MSH2):c.1801C>T(p.Gln601Ter)
NM_000535.6(PMS2):c.1144+1G>A
NM_000251.2(MSH2):c.1984C>T(p.Gln662Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.381-1G>A
NM_000535.6(PMS2):c.631C>T(p.Arg211Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.790C>T(p.Gln264Ter)

NM_000251.2(MSH2):c.366+1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.298C>T(p.Arg100Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.3013C>T(p.Arg1005Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.694C>T(p.Gln232Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.742C>T(p.Arg248Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1039-1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.142C>T(p.Gln48Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1790G>A(p.Trp597Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1961C>T(p.Pro654Leu)
NM_000249.3(MLH1):c.2103+1G>A
NM_000249.3(MLH1):c.2135G>A(p.Trp712Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.588+5G>A
NM_000249.3(MLH1):c.790+1G>A
NM_000251.2(MSH2):c.1035G>A(p.Trp345Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1255C>T(p.Gln419Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1861C>T(p.Arg621Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.226C>T(p.Gln76Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2653C>T(p.Gln885Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.508C>T(p.Gln170Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.862C>T(p.Gln288Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.892C>T(p.Gln298Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.970C>T(p.Gln324Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.4001G>A(p.Arg1334Gln)
NM_000251.2(MSH2):c.1662-1G>A
NM_000535.6(PMS2):c.1882C>T(p.Arg628Ter)
NM_000535.6(PMS2):c.2174+1G>A
NM_000535.6(PMS2):c.2404C>T(p.Arg802Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.3991C>T(p.Arg1331Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.2503C>T(p.Gln835Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.718C>T(p.Arg240Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.1038G>A(p.Gln346=)
NM_000249.3(MLH1):c.245C>T(p.Thr82Ile)
NM_000249.3(MLH1):c.83C>T(p.Pro28Leu)
NM_000249.3(MLH1):c.884G>A(p.Ser295Asn)
NM_000249.3(MLH1):c.982C>T(p.Gln328Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1046C>T(p.Pro349Leu)
NM_000251.2(MSH2):c.1120C>T(p.Gln374Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1285C>T(p.Gln429Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1477C>T(p.Gln493Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.2152C>T(p.Gln718Ter)
NM_000535.6(PMS2):c.703C>T(p.Gln235Ter)
NM_000249.3(MLH1):c.2141G>A(p.Trp714Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1009C>T(p.Gln337Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1216C>T(p.Arg406Ter)
NM_000179.2(MSH6):c.3202C>T(p.Arg1068Ter)
NM_000251.2(MSH2):c.1165C>T(p.Arg389Ter)

ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．１９４３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ６４８Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．２００Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ６７Ｇｌｕ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．７９３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２６５Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．２０５９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６８７Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．６７７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ２２６Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．２０４１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ６８１Ｔｈｒ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．１９４２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ６４８Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．６７６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２２６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．２０３８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６８０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．１４８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４９５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．２１９４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７３２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．３１０３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０３５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．８９２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．１４５９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４８７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．１７３１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｓｅｒ５７７＝）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．１８４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．１９７５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６５９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．１９９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ６７Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．１０７６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．１１４７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３８３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．１８１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．２１２－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．２１３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５３５．６（ＰＭＳ２）：ｃ．６９７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２３３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５３５．６（ＰＭＳ２）：ｃ．１２６１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４２１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２５１．２（ＭＳＨ２）：ｃ．２０４７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ６８３Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００５３５．６（ＰＭＳ２）：ｃ．４００Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１３４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５３５．６（ＰＭＳ２）：ｃ．１９２７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６４３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．１４４４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４８２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．２７３１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ９１１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００５３５．６（ＰＭＳ２）：ｃ．９４３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３１５Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＢＣＫＤＨＡ、ＢＣＫＤＨＢ、ＤＢＴ、及びＤＬＤから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、リンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０７９７】

他の遺伝性疾患

これらに限定されないが、マルファン症候群、ハーラー症候群、糖原病、及び嚢胞性線維症を含む、追加的な遺伝性疾患に関連する病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰもまた、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに報告され、表Ａに開示される。したがって、本発明の態様は、以下で議論される通り、これらの疾患のいずれかに関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正する方法に関する。

【０７９８】

マルファン症候群

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、マルファン症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、

少なくともＦＢＮ１遺伝子に存在する。
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１８７９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６２７Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１０５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３５１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１８４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６２Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．２８５５－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．３１６４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１０５５Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．３６８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１２３Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４９５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１６５２Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．７１８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２３９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．８２６７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２７５６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１４９６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ４９９Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６８８６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２２９６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．３３７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１１２５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６４０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２１４Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．５０３８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１６８０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４３４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１４５Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．２５６３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８５５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．７４６６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ２４８９Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．２０８９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６９７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．５９２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１９８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６６９５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ２２３２Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６１６４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．５６２７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１８７６Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４０６１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１３５４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１９８２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ６６１Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６７８４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２２６２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４０９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．３６４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１２２Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．３２１７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ１０７３Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４４６０－８Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４７８６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１５９６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．７８０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２６０２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．２４７＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．２４９５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ８３２Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４９３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１６５Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．５５０４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１８３５Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．５８６３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１９５５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６６５８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２２２０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．７６０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２５３６Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．７９５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ２６５２Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．３０３７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１０１３Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．８０８０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２６９４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１６３３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５４５Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．７２０５－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４６２１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１５４１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１０９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３６４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１５８５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５２９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４７８１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１５９４Ａｓｐ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６４３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２１５Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．３６６８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｃｙｓ１２２３Ｔｙｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．８３２６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２７７６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．６３５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｉｌｅ２１１８＝）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１４６８＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１５４６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５１６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．４６１５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１５３９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．５３６８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１７９０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１３８．４（ＦＢＮ１）：ｃ．１２８５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ４２９Ｔｅｒ）

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＦＢＮ１遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、マルファン症候群を治療または予防する方法に関する。

【０７９９】

ハーラー症候群

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、ハーラー症候群に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、少なくともＩＤＵＡ遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００２０３．４（ＩＤＵＡ）：ｃ．９７２＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２０３．４（ＩＤＵＡ）：ｃ．１８５５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６１９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２０３．４（ＩＤＵＡ）：ｃ．１５２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ５１Ａｓｐ）
ＮＭ＿０００２０３．４（ＩＤＵＡ）：ｃ．１２０５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４０２Ｔｅｒ）

ＮＭ＿０００２０３．４（ＩＤＵＡ）：ｃ．２０８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ７０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２０３．４（ＩＤＵＡ）：ｃ．１０４５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ３４９Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００２０３．４（ＩＤＵＡ）：ｃ．１６５０＋５Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＩＤＵＡ遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、ハーラー症候群を治療または予防する方法に関する。

【０８００】

糖原病

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、糖原病に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＧＡＡ、ＡＧＬ、ＰＨＫＢ、ＰＲＫＡＧ２、Ｇ６ＰＣ、ＰＧＡＭ２、ＧＢＥ１、ＰＹＧＭ、及びＰＦＫＭから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１９２７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ６４３Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．２１７３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ７２５Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．３９８０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１３２７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．１６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．２０３９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ６８０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００２９３．２（ＰＨＫＢ）：ｃ．１５４６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５１６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０１６２０３．３（ＰＲＫＡＧ２）：ｃ．１５９２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ５３１Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００１５１．３（Ｇ６ＰＣ）：ｃ．２４８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ８３Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００１５１．３（Ｇ６ＰＣ）：ｃ．７２４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ２４２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１５１．３（Ｇ６ＰＣ）：ｃ．８８３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ２９５Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００１５１．３（Ｇ６ＰＣ）：ｃ．２４７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８３Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００１５１．３（Ｇ６ＰＣ）：ｃ．１０３９Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ３４７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１５６１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ５２１Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．２５９０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８６４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．３６８２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１２２８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．１１８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．２５６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．２６８１＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００６４２．２（ＡＧＬ）：ｃ．２１５８－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００２９０．３（ＰＧＡＭ２）：ｃ．２３３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１５４８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５１６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．２０１４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ６７２Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．５４６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｈｒ１８２＝）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１８０２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ６０１Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１７５４＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１０８２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｐｒｏ３６１Ｌｅｕ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．２５６０Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８５４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．６５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２１９Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１９３３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ６４５Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１９７９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ６６０Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．１４６５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｓｐ４８９Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００１５２．４（ＧＡＡ）：ｃ．２５１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００１５８．３（ＧＢＥ１）：ｃ．１５４３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５１５Ｃｙｓ）
ＮＭ＿００５６０９．３（ＰＹＧＭ）：ｃ．１７２６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５７６Ｔｅｒ）

ＮＭ＿００５６０９．３（ＰＹＧＭ）：ｃ．１８２７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｌｙｓ６０９＝）
ＮＭ＿００５６０９．３（ＰＹＧＭ）：ｃ．１４８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ５０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿００５６０９．３（ＰＹＧＭ）：ｃ．６１３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ２０５Ｓｅｒ）
ＮＭ＿００５６０９．３（ＰＹＧＭ）：ｃ．１３６６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｖａｌ４５６Ｍｅｔ）
ＮＭ＿００５６０９．３（ＰＹＧＭ）：ｃ．１７６８＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿００１１６６６８６．１（ＰＦＫＭ）：ｃ．４５０＋１Ｇ＞Ａ
表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＧＡＡ、ＡＧＬ、ＰＨＫＢ、ＰＲＫＡＧ２、Ｇ６ＰＣ、ＰＧＡＭ２、ＧＢＥ１、ＰＹＧＭ、及びＰＦＫＭから選択される少なくとも１つの遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、ならびにより具体的には上に記載の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、糖原病を治療または予防するための方法に関する。

【０８０１】

嚢胞性線維症

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、嚢胞性線維症に関連する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正するために使用される。いくつかの実施形態では、病原性変異／ＳＮＰは、少なくとも以下を含む、ＣＦＴＲ遺伝子に存在する。

ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３７１２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１２３８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３４８４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１１６２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１７６６＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１４７７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ４９３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２５３８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ８４６Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２５５１Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ８５１Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３４７２Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１１５８Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１４７５Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｓｅｒ４９２Ｐｈｅ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１６７９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ５６０Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３１９７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ１０６６Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３８７３＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３１９６Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ１０６６Ｃｙｓ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２４９０＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３７１８－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１７１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５７Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３９３７Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ１３１３Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２７４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｕ９２Ｌｙｓ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１０１３Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｔｈｒ３３８Ｉｌｅ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３２６６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１０８９Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１０５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３５２Ｇｌｎ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１６５４Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ５５２Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２６６８Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ｇｌｎ８９０Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３６１１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１２０４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１５８５－８Ｇ＞Ａ

NM_000492.3(CFTR):c.223C>T(p.Arg75Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1680-1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.349C>T(p.Arg117Cys)
NM_000492.3(CFTR):c.1203G>A(p.Trp401Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1240C>T(p.Gln414Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1202G>A(p.Trp401Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1209+1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.115C>T(p.Gln39Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1116+1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.1393-1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.1573C>T(p.Gln525Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.164+1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.166G>A(p.Glu56Lys)
NM_000492.3(CFTR):c.170G>A(p.Trp57Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2053C>T(p.Gln685Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2125C>T(p.Arg709Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2290C>T(p.Arg764Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2353C>T(p.Arg785Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2374C>T(p.Arg792Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2537G>A(p.Trp846Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.292C>T(p.Gln98Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.2989-1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.3293G>A(p.Trp1098Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.4144C>T(p.Gln1382Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.4231C>T(p.Gln1411Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.4234C>T(p.Gln1412Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.579+5G>A
NM_000492.3(CFTR):c.595C>T(p.His199Tyr)
NM_000492.3(CFTR):c.613C>T(p.Pro205Ser)
NM_000492.3(CFTR):c.658C>T(p.Gln220Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1117-1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.3294G>A(p.Trp1098Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1865G>A(p.Gly622Asp)
NM_000492.3(CFTR):c.743+1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.1679+1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.1657C>T(p.Arg553Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1675G>A(p.Ala559Thr)
NM_000492.3(CFTR):c.165-1G>A
NM_000492.3(CFTR):c.200C>T(p.Pro67Leu)
NM_000492.3(CFTR):c.2834C>T(p.Ser945Leu)
NM_000492.3(CFTR):c.3846G>A(p.Trp1282Ter)
NM_000492.3(CFTR):c.1652G>A(p.Gly551Asp)
NM_000492.3(CFTR):c.4426C>T(p.Gln1476Ter)

ＮＭ＿０００４９２．３：ｃ．３７１８－２４７７Ｃ＞Ｔ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２９８８＋１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２６５７＋５Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２９８８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｎ９９６＝）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２７４－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３６１２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１２０４Ｔｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１６４６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｓｅｒ５４９Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３７５２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｓｅｒ１２５１Ａｓｎ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．４０４６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１３４９Ａｓｐ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．５３２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１７８Ａｒｇ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３７３１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ１２４４Ｇｌｕ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１６５１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ５５１Ｓｅｒ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１５８５－１Ｇ＞Ａ
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１０００Ｃ＞Ｔ（ｐ．Ａｒｇ３３４Ｔｒｐ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２５４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｇｌｙ８５Ｇｌｕ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．１０４０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｒｇ３４７Ｈｉｓ）
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．２７３＋１Ｇ＞Ａ

表Ａを参照されたい。したがって、本発明の一態様は、１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、具体的にはＣＦＴＲ遺伝子に存在する１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰ、及びより具体的には上述の１つ以上の病原性Ｇ→ＡまたはＣ→Ｔ変異／ＳＮＰを矯正することによって、嚢胞性線維症を治療または予防する方法に関する。

【０８０２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性２乳癌卵巣癌に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ２遺伝子（ＨＧＶＳ：Ｕ４３７４６．１：ｎ．７８２９＋１Ｇ＞Ａ）に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって、家族性２乳癌卵巣癌を治療または予防するための方法に関する。

【０８０３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、遺伝的因子ＩＸ欠乏症に関連すると考えられるＡ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＡｒｇからＧｌｎの置換をもたらすＦ９遺伝子中のＧＲＣｈ３８：ＣｈｒＸ：１３９５３７１４５に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって遺伝的因子ＩＸ欠乏症を治療または予防するための方法に関する。

【０８０４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、ベーター－プラス－サラセミア、ベータサラセミア、及びベータサラセミアメジャーに関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＨＢＢ遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１１：５２２６８２０に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによってベーター－プラス－サラセミア、ベータサラセミア、及びベータサラセミアメジャーを治療または予防するための方法に関する。

【０８０５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、マルファン症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するた

めに使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、Ｙａｍａｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ　Ｈｕｍ　Ｇｅｎｅｔ．２０００；４５（２）：１１５－８によって報告されるように、ＦＢＮ１遺伝子（ＩＶＳ２ＤＳ、Ｇ－Ａ、＋１）に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによってマルファン症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８０６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、Ｋｗａｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９５）によって報告されるように、ウィスコット・アルドリッチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＷＡＳ遺伝子（ＩＶＳ６ＡＳ、Ｇ－Ａ、－１）のイントロ６の－１位に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによってウィスコット・アルドリッチ症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８０７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、嚢胞性線維症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ７：１１７５９０４４０に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって嚢胞性線維症を治療または予防するための方法に関する。

【０８０８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、嚢胞性線維症及び遺伝性膵炎に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ７：１１７６０６７５４に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって嚢胞性線維症及び遺伝性膵炎を治療または予防するための方法に関する。

【０８０９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、嚢胞性線維症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ７：１１７５８７７３８に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって嚢胞性線維症を治療または予防するための方法に関する。

【０８１０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、ターコット症候群及びリンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＳＨ２遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ２：４７４７０９６４に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによってターコット症候群及びリンチ症候群を治療または予防する方法に関する。

【０８１１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、嚢胞性線維症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ７：１１７６４２４３７に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって嚢胞性線維症を治療または予防するための方法に関する。

【０８１２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、リンチ症

候群ＩＩ及びリンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＬＨ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ３：３７００１０５８に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによってリンチ症候群ＩＩ及びリンチ症候群を治療または予防する方法に関する。

【０８１３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、嚢胞性線維症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ７：１１７６４２５９４に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって嚢胞性線維症を治療または予防するための方法に関する。

【０８１４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、嚢胞性線維症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ７：１１７５９２６５８に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって嚢胞性線維症を治療または予防するための方法に関する。

【０８１５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、ならびに遺伝性がん素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０５７０５１に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、ならびに遺伝性がん素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８１６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ欠乏症、ヒルシュスプルング病１、フルオロウラシル応答、ピリミジン類似体応答－毒性／ＡＤＲ、カペシタビン応答－毒性／ＡＤＲ、
フルオロウラシル応答－毒性／ＡＤＲ、テガファー応答－毒性／ＡＤＲに関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＤＰＹＤ遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１：９７４５００５８に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ欠乏症、ヒルシュスプルング病１、フルオロウラシル応答、
ピリミジン類似体応答－毒性／ＡＤＲ、カペシタビン応答－毒性／ＡＤＲ、
フルオロウラシル応答－毒性／ＡＤＲ、テガファー応答－毒性／ＡＤＲを治療または予防する方法に関する。

【０８１７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、リンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＳＨ２遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ２：４７４７８５２０に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによってリンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８１８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、リンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために

使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＬＨ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ３：３７０１１８１９に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによってリンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８１９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、リンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＬＨ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ３：３７０１４５４５に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによってリンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８２０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、リンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＬＨ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ３：３７０１１８６７に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによってリンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８２１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、リンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＬＨ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ３：３７０２５６３６に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによってリンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８２２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、リンチ症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＬＨ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ３：３７００４４７５に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによってリンチ症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８２３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、リンチ症候群及び遺伝性がん素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＳＨ２遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ２：４７４１６４３０に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによってリンチ症候群及び遺伝性がん素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８２４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、リンチ症候群及び遺伝性がん素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＳＨ２遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ２：４７４０８４００に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによってリンチ症候群及び遺伝性がん素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８２５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、リンチ症候群及び遺伝性がん素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＬＨ１遺伝子

中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ３：３６９９６７１０に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによってリンチ症候群及び遺伝性がん素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８２６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０６７６９６に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって、家族性１乳癌卵巣癌を治療または予防するための方法に関する。

【０８２７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性２乳癌卵巣癌、ならびに遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ２遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１３：３２３５６６１０に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって、家族性２乳癌卵巣癌、ならびに遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群を治療または予防する方法に関する。

【０８２８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、原発性拡張型心筋症及び原発性家族性肥大型心筋症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＹＨ７遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１４：２３４１９９９３に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって、原発性拡張型心筋症及び原発性家族性肥大型心筋症を治療または予防する方法に関する。

【０８２９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、原発性家族性肥大型心筋症、腰曲がり（ｃａｍｐｔｏｃｏｒｍｉｓｍ）、及び肥大型心筋症に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＹＨ７遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１４：２３４１５２２５に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって、原発性家族性肥大型心筋症、腰曲がり（ｃａｍｐｔｏｃｏｒｍｉｓｍ）、及び肥大型心筋症を治療または予防する方法に関する。

【０８３０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性乳癌、家族性２乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、ならびに遺伝性がん素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ２遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１３：３２３５７７４１に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって、家族性乳癌、家族性２乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、ならびに遺伝性がん素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８３１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、原発性拡張型心筋症、肥大型心筋症、心筋症、及び左室心筋緻密化障害に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＭＹＨ７遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１４：２３４３１５８４に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって、原発性拡張型心筋症、肥大型心筋症、心筋症、及び左室心筋緻密化

障害を治療または予防する方法に関する。

【０８３２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、ならびに遺伝性がん素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０６７６０７に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、ならびに遺伝性がん素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８３３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、遺伝性がん素因症候群、ならびに乳癌に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０４７６６６に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、遺伝性がん素因症候群、ならびに乳癌を治療または予防するための方法に関する。

【０８３４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性２乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、ならびに遺伝性がん素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ２遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１３：３２３７０５５８に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって、家族性２乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、ならびに遺伝性がん素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８３５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、遺伝性がん素因症候群、ならびに乳癌に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０７４３３０に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、遺伝性がん素因症候群、ならびに乳癌を治療または予防するための方法に関する。

【０８３６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、ならびに遺伝性がん素因症候群に関連すると考えられる病原性Ａ→Ｇ（Ａ＞Ｇ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０８２４０３に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰを矯正することによって、家族性１乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、ならびに遺伝性がん素因症候群を治療または予防するための方法に関する。

【０８３７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、嚢胞性線維症及び遺伝性膵炎に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＣＦＴＲ遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ７：１１７６３９９６１に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰを矯正することによって嚢胞性線維症及び遺伝性膵炎を治療または予防するための方法に関する。

【０８３８】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性２乳癌卵巣癌に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ２遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１３：３２３３６４９２に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰを矯正することによって家族性２乳癌卵巣癌を治療または予防するための方法に関する。
【０８３９】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０６３３６５に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰを矯正することによって家族性１乳癌卵巣癌を治療または予防するための方法に関する。
【０８４０】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性１乳癌卵巣癌に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０９３６１３に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰを矯正することによって家族性１乳癌卵巣癌を治療または予防するための方法に関する。
【０８４１】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性乳癌、及び家族性１乳癌卵巣癌に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ１遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１７：４３０９３９３１に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰを矯正することによって、家族性乳癌、及び家族性１乳癌卵巣癌を治療または予防するための方法に関する。
【０８４２】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性肥大型心筋症１、原発性家族性肥大型心筋症、及び肥大型心筋症に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＭＹＨ７遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１４：２３４２９２７９に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰを矯正することによって、家族性肥大型心筋症１、原発性家族性肥大型心筋症、及び肥大型心筋症を治療または予防する方法に関する。
【０８４３】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性２乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、ならびに遺伝性がん素因症候群に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＢＲＣＡ２遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１３：３２３５６４７２に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰを矯正することによって、家族性２乳癌卵巣癌、遺伝性乳癌及び卵巣癌症候群、ならびに遺伝性がん素因症候群を治療または予防するための方法に関する。
【０８４４】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法、システム、及び組成物は、家族性肥大型心筋症１、原発性家族性肥大型心筋症、家族性拘束型心筋症、及び肥大型心筋症に関連すると考えられる病原性Ｃ→Ｔ（Ｃ＞Ｔ）変異またはＳＮＰを矯正するために使用され、病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰは、ＭＹＨ７遺伝子中のＧＲＣｈ３８：Ｃｈｒ１４：２３４２９００５に位置する。したがって、本発明の追加的な態様は、前述の病原性Ｃ＞Ｔ

変異またはＳＮＰを矯正することによって、家族性肥大型心筋症１、原発性家族性肥大型心筋症、家族性拘束型心筋症、及び肥大型心筋症を治療または予防する方法に関する。

【０８４５】

追加的な病原性Ａ＞Ｇ変異及びＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースに見出される。したがって、本開示の追加的な態様は、それに関連する疾患または状態を治療または予防するための、本明細書に記載される方法、システム、及び組成物を使用する、ＣｌｉｎＶａｒに列挙される病原性Ａ＞Ｇ変異またはＳＮＰの矯正に関する。

【０８４６】

追加的な病原性Ｃ＞Ｔ変異及びＳＮＰは、ＣｌｉｎＶａｒデータベースにも見出される。したがって、本開示の追加的な態様は、それに関連する疾患または状態を治療または予防するための、本明細書に記載の方法、システム、および組成物を使用する、ＣｌｉｎＶａｒに列挙される病原性Ｃ＞Ｔ変異またはＳＮＰの矯正に関する。本明細書に開示される実施形態を使用して対処され得る他のＴ変異またはＳＮＰは、本明細書に出願される「Ｃｌｉｎ＿ｖａｒ＿ｐａｔｈｏｇｅｎｉｃ＿ＳＮＰＳ＿ＴＣ＿ｔｘｔ」と題されるＡＳＣＩＩテキストに見出される表に列挙される。

【０８４７】

本発明は、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定しない以下の実施例でさらに説明される。

【実施例】

【０８４８】

実施例１

アデニンデアミナーゼ（ＡＤ）は、二本鎖ＲＮＡ内の特定の部位でアデニンを脱アミン化することができる。

【０８４９】

いくつかのＡＤがＤＮＡ－ＲＮＡｎ　ＲＮＡ二本鎖にアデニン脱アミノ酸化をもたらす可能性があるという事実（例えば、Ｚｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２０１７）は、非活性Ｃａｓ１３によるＲＮＡ誘導ＤＮＡ結合中に形成されたＲループにおいて、誘導ＲＮＡとその相補ＤＮＡ標的との間に形成されたＲＮＡ二本鎖を利用して、ＲＮＡ誘導ＡＤを開発するユニークな機会を提供する。非活性Ｃａｓ１３を使用してＡＤを動員することによって、次いでＡＤ酵素がＲＮＡ－ＤＮＡｎ　ＲＮＡ二本鎖内でアデニンに作用するであろう。

【０８５０】

一実施形態では、Ｃａｓ１３ｂなどの非活性Ｃａｓ１３は、以下の変異：Ｒ１１６Ａ、Ｈ１２１Ａ、Ｒ１１７７Ａ、及びＨ１１８２Ａを使用して得られる。ＡＤによる編集の効率を高めるために、変異Ｅ４８８Ｑを含む変異されたｈＡＤＡＲ２ｄなどの変異されたＡＤＡＲを使用する。

【０８５１】

特定の座位にＡＤを動員するための設計：

１．ＮＬＳタグ付き非活性Ｃａｓ１３は、Ｎ末端またはＣ末端のいずれかでＡＤに融合される。ＧＳＧ５などの可撓性リンカー、またはＬＥＰＧＥＫＰＹＫＣＰＥＣＧＫＳＦＳＱＳＧＡＬＴＲＨＱＲＴＨＴＲ（配列番号１１）などの低可撓性リンカーを含む、様々なリンカーが使用される。

【０８５２】

２．ガイドＲＮＡ骨格は、ＭＳ２結合部位などのアプタマーで修飾される（例えば、Ｋｏｎｅｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　２０１５）。ＮＬＳタグ付きＡＤ－ＭＳ２結合タンパク質融合体は、（ＮＬＳタグ付き不活性またはＣａｓ１３ｂ）及び対応するガイドＲＮＡと共に標的細胞に共導入される。

【０８５３】

３．ＡＤは、ＮＬＳタグ付き不活性またはニッカーゼＣａｓ１３の内部ループに挿入される。

【０８５４】
ＲＮＡガイドの設計：
１．Ｃａｓ１３タンパク質の天然ガイド配列の長さに対応する長さのガイド配列は、目的のＲＮＡを標的にするように設計される。
【０８５５】
２．正規長より長いＲＮＡガイドを使用して、タンパク質ガイドＲＮＡ標的ＤＮＡ複合体の外側にＲＮＡ二本鎖を形成する。
【０８５６】
これらのＲＮＡガイド設計の各々について、標的ＲＮＡ鎖上のアデニンと反対のＲＮＡ上の塩基は、Ｕとは反対にＣとして指定されるであろう。
【０８５７】
ＡＤの選択及び設計：
多数のＡＤが使用され、各々が異なる活性レベルを有するであろう。このようなＡＤ
【０８５８】
１．ヒトＡＤＡＲ（ｈＡＤＡＲ１、ｈＡＤＡＲ２、ｈＡＤＡＲ３）
【０８５９】
２．イカマダコＡＤＡＲ
【０８６０】
３．コウイカ属ＡＤＡＲ；カリフォルニアヤリイカＡＤＡＲ
【０８６１】
ＡＤＡＴ（ヒトＡＤＡＴ、ショウジョウバエＡＤＡＴ）
【０８６２】
変異を使用して、ＤＮＡ－ＲＮＡｎ　ＲＮＡ二本鎖に対して反応するＡＤＡＲの活性を増加させることもできる。例えば、ヒトＡＤＡＲ遺伝子の場合、ｈＡＤＡＲ１ｄ（Ｅ１００８Ｑ）またはｈＡＤＡＲ２ｄ（Ｅ４８８Ｑ）変異を使用して、ＤＮＡ－ＲＮＡ標的に対するそれらの活性を増加させる。
【０８６３】
各ＡＤＡＲは、様々なレベルの配列構成要件を有する。例えば、ｈＡＤＡＲ１ｄ（Ｅ１００８Ｑ）の場合、ｔＡｇ及びａＡｇ部位は効率的に脱アミノ酸化され、ａＡｔ及びｃＡｃはあまり効率的に編集されず、ｇＡａ及びｇＡｃはさらに編集されない。しかしながら、構成要件は、異なるＡＤＡＲによって変動する。
【０８６４】
システムの１つのバージョンを示す概略図を図１に提供する。例示的なＡＤタンパク質のアミノ酸配列を図４に提供する。
【０８６５】
本明細書に例示的に記載される実施形態は、本明細書に具体的に開示されていない、任意の要素（複数可）や制限（複数可）がない場合に好適に実施され得る。したがって、例えば、用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「含む（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」等は、広範囲に、かつ限定されないように読み取らなければならない。加えて、本明細書に用いられる用語及び表現は、説明の用語として使用されており、限定されないものであり、示され説明される特徴またはその一部の任意の等価物を除外するそのような用語及び表現を使用する意図はないが、特許請求される技術の範囲内で様々な修正が可能であることが認識される。加えて、「から実質的になる」という語句は、特異的に引用されるそのような要素を含み、かつそのような追加の要素が、特許請求される技術の基本的な及び新規の特徴に実質的に影響を及ぼさないことが理解されるであろう。「からなる」という語句は、指定されていない任意の要素を除外する。
【０８６６】
本開示は、本出願に説明される特定の実施形態に関して限定されるものではない。当業者には明らかであるように、その趣旨及び範囲から逸脱することなく、多くの修正及び変形を行うことができる。本明細書に列挙されるものに加えて、本開示の範囲内の機能的に

同等の方法及び組成物は、前述の説明から当業者に明らかであろう。かかる修正及び変形は、添付の特許請求の範囲内に収まることが意図される。本開示は、添付の特許請求の範囲、及びそのような特許請求の範囲が適用される等価物の全ての範囲によってのみ制限されるものとする。本開示は、当然変化することができる特定の方法、試薬、化合物組成物または生物系に限定されないことを理解されたい。本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的とし、限定することを意図していないことも理解されたい。

【０８６７】

加えて、本開示の特徴または態様がＭａｒｋｕｓｈ群に関して説明される場合、当業者は、それによって、本開示もまた、Ｍａｒｋｕｓｈ群の任意の個別のメンバーまたはメンバーのサブグループに関して説明されることを認識するであろう。

【０８６８】

当業者によって理解されるように、あらゆる全ての目的のために、特に書面による説明の提供に関して、本明細書に開示される全ての範囲はまた、あらゆる全ての可能性のあるサブ範囲及びそのサブ範囲の組み合わせを包含する。列挙される任意の範囲は、同じ範囲を少なくとも２等分、３等分、４等分、５等分、１０等分などに分解することを十分に説明し、可能にするものとして容易に認識することができる。非限定的な例として、本明細書で論じられる各範囲は、下位の３分の１、中位の３分の１、及び上位の３分の１などに容易に分解することができる。また、当業者によって理解されるように、例えば「最大」「少なくとも」「より大きい」「より少ない」等の全ての言語は、列挙される数を含み、その後、上述のようにサブ範囲に分解され得る範囲を指す。最後に、当業者によって理解されるように、範囲は各個別のメンバーを含む。

【０８６９】

本明細書に言及される全ての刊行物、特許出願、発行された特許、及びその他の文献は、各個別の刊行物、特許出願、発行された特許、またはその他の文献が、その全体が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。参照により組み込まれる原文に含まれる定義は、本開示における定義と矛盾する範囲で除外される。

【０８７０】

実施例２

Ｃａｓ１３ａ／Ｃａｓ１３ｂ干渉のためのＣｌｕｃ／Ｇｌｕｃタイリング

ＣａｓｌＳａとＣａｓ１３ｂとの間のノックダウン効率を比較するために、Ｃｙｐｒｉｄｉｎａ及びＧａｕｓｓｉａルシフェラーゼ遺伝子を、それぞれ、２４または９６ガイドでタイリングした（図１０）。ガイドをＣａｓ１３ａ及びＣａｓ１３ｂについてマッチングし、Ｃａｓ１３ｂについて増加したノックダウン効率を示し、各遺伝子につき１つを除いた全てのガイドがＣａｓ１３ｂについてより高い効率を示した。

【０８７１】

ＮＧＳによるＡＤＡＲ編集定量化

【０８７２】

Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２のＲＮＡ編集効率を、ルシフェラーゼの発現を阻止する中途終止コドンＵＡＧを用いてルシフェラーゼレポーターを設計することによって試験した（図１１Ａ～１１Ｃ）。様々な長さの７個のガイドを設計し、ＵＡＧ終止コドンに対して位置決めし、これらは全てＵＡＧ内のＡに対するＣミスマッチを含有した。Ｃミスマッチは ＡＤＡＲ触媒ドメインに好まれる編集部位で泡を作成することが知られている。Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２によるＲＮＡ編集はＵＡＧをＵＩＧ（ＵＧＧ）に変換し、終止コドンの代わりにトリプトファンを導入して、翻訳を進めることを可能にする。ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞におけるガイドの発現及びＣａｓ１３ｂ１２－ＡＤＡＲ２融合は、ルシフェラーゼ発現を様々なレベルに回復し、ガイド５に最大の回復が起きた（図１１Ｂ）。一般に、編集部位が、直接反復があり、したがってタンパク質が結合するｃｒＲＮＡの３’末端からさらに離れて移動するにつれて、ガイド１～５からの編集のレベルが増加する。これは、タ

ンパク質によって結合されるｃｒＲＮＡ：標的二本鎖の部分が、ＡＤＡＲ触媒ドメインにアクセスできないことを示す可能性が高い。ガイド５、６、及び７は、編集部位がＤＲ／タンパク質結合領域から離れたガイドの遠端にあり、かつそれらのガイドがはるかに長く、ＡＤＡＲに好まれるより長いＲＮＡ二本鎖を生成するため、最大量の活性示す。ＡＤＡＲ活性は、編集部位がＲＮＡ二本鎖の中央にある場合、最適である。ルシフェラーゼ活性の相対発現は、非標的化ガイド条件に正規化される。

【０８７３】

これらの試料を配列決定し、ＲＮＡ編集効率を正確に定量化した（図１１Ｃ）。編集効率をガイド標識の隣の括弧内に列挙する。全体的に、シークエンシングによって特定される編集パーセントは、図１１Ｂに見られるルシフェラーゼ発現回復の相対的なレベルと一致した。ガイド５は、オンターゲットＡにおけるＧへの変換率４５％で最大のＲＮＡ編集を示した。いくつかの事例では、領域内に少量のオフターゲットＡ－Ｇ編集が存在する。これらは、ＡＤＡＲ触媒ドメインに好まれないガイド配列にＧミスマッチを導入することにより低減し得る。

【０８７４】

ルシフェラーゼレポーター転写産物を編集することに加えて、ＫＲＡＳ及びＰＰＩＢ転写産物中のフレーム外ＵＡＧ部位を編集するようにガイドを設計し、２つのガイドが各転写産物を標的化した（図１２）。ガイドを、上記のガイド５と同じ原理（３’ＤＲから２７ｎｔ離れた編集部位を有する４５ｎｔスペーサー及び編集部位アデノシンに対するＣミスマッチ）で設計した。ＫＲＡＳガイドはオンターゲットアデノシンで６．５％及び１３．７％の編集を達成することができ、ＰＰＩＢガイドは７．７％及び９．２％の編集を達成することができた。これらのガイドの一部にはいくつかのオフターゲットも存在し、これらは、近くにある可能性のあるオフターゲットアデノシンに対してスペーサー内にＧミスマッチを設計することによって低減することができる。確かに、オフターゲットは標的アデノシンの二本鎖領域３’で起こるように思われる。

【０８７５】

ＲＮＡ配列からのＣａｓ１３ａ／ｂ＋ｓｈＲＮＡ特異性

Ｃａｓ１３ｂ１２ノックダウンの特異性を決定するために、トランスクリプトーム全体の全てのｍＲＮＡに対してＲＮＡシークエンシングを実施した（図１３Ａ）。Ｇｌｕｃ及びＫＲＡＳを標的化するガイドのノックダウンを非標的化ガイドと比較して、Ｃａｓ１３ａ２及びＣａｓ１３ｂ１２が、標的転写産物（図１３Ａ中の赤い点）の特異的ノックダウンを有し、一方ｓｈＲＮＡは、分布のより大きな分散によって証明されるように、多数のオフターゲットを有することを見出した。これらの条件の各々について有意なオフターゲットの数を図１３Ｂに示す。有意なオフターゲットを、２倍超または０．８倍未満変化した任意のオフターゲット転写産物についてＦＤＲ補正（ｐ＜０．０１）を用いたｔ検定によって測定した。Ｃａｓ１３ａ及びＣａｓ１３ｂ条件は、ｓｈＲＮＡ条件に関して見られる数百個のオフターゲットと比較して、非常に少ないオフターゲットを有した。各条件ごとのノックダウン効率を図１３Ｃに示す。

【０８７６】

オフターゲットを低減するためのミスマッチ特異性（Ａ：ＡまたはＡ：Ｇ）

標的アデノシン編集部位付近のアデノシンにおいてオフターゲットを低減するために、潜在的なオフターゲットのアデノシンに対してＧまたはＡミスマッチを有するガイドを設計した（図１４及び以下の表）。ＧまたはＡとのミスマッチは、ＡＤＡＲ触媒ドメインによる活性に好ましくない。

名称	ガイド
Ｃミスマッチを有するルシフェラーゼガイドＷＴ（配列番号１６２）	ｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａＣＣＡｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａ
１　Ｇ　ＭＭとのＣミスマッチを有するルシフェラーゼガイドＷＴ（配列番号１６３）	ｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃＧａａａＣＣＡｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａ
２　Ｇ　ＭＭとのＣミスマッチを有するルシフェラーゼガイドＷＴ（配列番号１６４）	ｃａｔａｇａａｔｇＧｔｃＧａａａＣＣＡｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａ
１　Ｇ　ＭＭとのＣミスマッチを有するルシフェラーゼガイドＷＴ（配列番号１６５）	ｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃＡａａａＣＣＡｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａ
２　Ｇ　ＭＭとのＣミスマッチを有するルシフェラーゼガイドＷＴ（配列番号１６６）	ｃａｔａｇａａｔｇＡｔｃＡａａａＣＣＡｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａ
Ｃミスマッチを有するＫＲＡＳガイドＷＴ（配列番号１６７）	ｇｇｔｔｔｃｔｃｃａｔｃａａｔｔａｃＣａｃｔｔｇｃｔｔｃｃｔｇｔａｇｇａａｔｃｃｔｃｔａｔｔ
１　Ｇ　ＭＭとのＣミスマッチを有するＫＲＡＳガイド（配列番号１６８）	ｇｇｔｔｔｃｔｃｃａｔｃａａｔＧａｃＣａｃｔｔｇｃｔｔｃｃｔｇｔａｇｇａａｔｃｃｔｃｔａｔｔ
２　Ｇ　ＭＭとのＣミスマッチを有するＫＲＡＳガイド（配列番号１６９）	ｇｇｔｔｔｃｔｃｃａｔｃａａＧＧａｃＣａｃｔｔｇｃｔｔｃｃｔｇｔａｇｇａａｔｃｃｔｃｔａｔｔ
１　Ａ　ＭＭとのＣミスマッチを有するＫＲＡＳガイド（配列番号１７０）	ｇｇｔｔｔｃｔｃｃａｔｃａａｔＡａｃＣａｃｔｔｇｃｔｔｃｃｔｇｔａｇｇａａｔｃｃｔｃｔａｔｔ
２　Ａ　ＭＭとのＣミスマッチを有するＫＲＡＳガイド（配列番号１７１）	ｇｇｔｔｔｃｔｃｃａｔｃａａＡＡａｃＣａｃｔｔｇｃｔｔｃｃｔｇｔａｇｇａａｔｃｃｔｃｔａｔｔ
Ｃミスマッチを有するＰＰＩＢガイドＷＴ（配列番号１７２）	ｇｃｃｔｔｔｃｔｃｔｃｃｔｇｔａｇｃＣａａｇｇｃｃａｃａａａａｔｔａｔｃｃａｃｔｇｔｔｔｔｔ

１　Ｇ　ＭＭとのＣミスマッチを有するＰＰＩＢガイドＷＴ（配列番号１７３）	ｇｃｃｔｔｔｃｔｃｔｃｃｔｇＧａｇｃＣａａｇｇｃｃａｃａａａａｔｔａｔｃｃａｃｔｇｔｔｔｔｔ
１　Ａ　ＭＭとのＣミスマッチを有するＰＰＩＢガイドＷＴ（配列番号１７４）	ｇｃｃｔｔｔｃｔｃｔｃｃｔｇＡａｇｃＣａａｇｇｃｃａｃａａａａｔｔａｔｃｃａｃｔｇｔｔｔｔｔ

【０８７７】

上記の表中のガイドを、編集されるオンターゲットアデノシンに対してＣミスマッチを、及び既知のオフターゲット部位に対してＧまたはＡミスマッチを有するように設計した（上記のＲＮＡシークエンシングに基づく）。スペーサー配列におけるミスマッチを大文字にする。

【０８７８】

オンターゲット活性についてのミスマッチ

ＡＤＡＲ２の触媒ドメインに関する先行研究は、標的Ａの反対側の異なる塩基がイノシン編集の量に影響を及ぼすことができることを実証している（Ｚｈｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７），Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，４５（６）：３３６９－３３７７）。具体的には、Ｕ及びＣは天然ＡＤＡＲ編集されたＡの反対側に見られるが、Ｇ及びＡは見られない。編集されたＡとのＡ及びＧミスマッチを使用してＡＤＡＲ活性を抑制することができるかどうかを試験するために、Ｃミスマッチで活性であることが知られているガイドを、ルシフェラーゼレポーターアッセイで他の３つの可能性のある塩基全てと試験する（図１６）。相対活性を、ルシフェラーゼ活性を評価することによって定量化する。ガイド配列を以下の表に提供する。

ミスマッチ	ガイド配列
ミスマッチ－Ｃ（配列番号１７５）	ＧｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａＣＣＡｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａ
ミスマッチ－Ｇ（配列番号１７６）	ＧｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａＣＧＡｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａ
ミスマッチ－Ｔ（配列番号１７７）	ＧｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａＣＴＡｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａ
ミスマッチ－Ａ（配列番号１７８）	ＧｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａＣＡＡｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａ

【０８７９】

ｇＲＮＡの化学的修飾によるオフターゲット修飾の編集及び低減の改善

ｇＲＮＡは、Ｖｏｇｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（２０１４），Ａｎｇｅｗ　Ｃｈｅｍ　Ｉｎｔ　Ｅｄ，５３：６２６７－６２７１，ｄｏｉ：１０．１００２／ａｎｉｅ．２０１４０２

６３４に例示されるように化学的に修飾され、オフターゲット活性を低減し、オンターゲット効率を改善する。２′－Ｏ－メチル及びチオリン酸修飾ガイドＲＮＡは、一般に細胞における編集効率を改善する。

【０８８０】

モチーフ嗜好性

ＡＤＡＲは、編集されたＡの両側で隣接するヌクレオチドに対する嗜好性を示すことが知られている（ｗｗｗ．ｎａｔｕｒｅ．ｃｏｍ／ｎｓｍｂ／ｊｏｕｒｎａｌ／ｖ２３／ｎ５／ｆｕｌｌ／ｎｓｍｂ．３２０３．ｈｔｍｌ，Ｍａｔｔｈｅｗｓ ｅｔ ａｌ．（２０１７），Ｎａｔｕｒｅ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ，２３（５）：４２６－４３３）。嗜好性を、標的化されたＡを取り囲む可変塩基を有するＣｙｐｒｉｄｉｎａルシフェラーゼ転写産物を標的化することによって体系的に試験する（図１７）。

【０８８１】

ＲＮＡ編集効率を増強するより大きな泡

好まれない５’または３’隣接塩基におけるＲＮＡ編集効率を増強するために、隣接塩基において意図的なミスマッチを導入し、好まれないモチーフの編集を可能にすることをインビトロで実証している（ｈｔｔｐｓ：／／ａｃａｄｅｍｉｃ．ｏｕｐ．ｃｏｍ／ｎａｒ／ａｒｔｉｃｌｅ－ｌｏｏｋｕｐ／ｄｏｉ／１０．１０９３／ｎａｒ／ｇｋｕ２７２、Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ ｅｔ ａｌ（２０１４），Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ，４２（１０）：ｅ８７）、Ｆｕｋｕｄａ ｅｔ ａｌ．（２０１７），Ｓｃｉｅｎｔｉｃｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ，７，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｓｒｅｐ４１４７８）。グアノシン置換などの追加のミスマッチを試験して、それらが天然嗜好性を低減するかどうかを調べる（図１８）。

【０８８２】

転写産物における複数のＡの編集

結果は、ＡＤＡＲデアミナーゼドメインの標的化窓におけるＣに対向するＡが他の塩基よりも優先的に編集されることを示唆する。加えて、標的化された塩基の少数の塩基内でＵと塩基対合される場合、Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合による低レベルの編集を示し、酵素に複数のＡを編集する柔軟性があることを示唆する（図１９）。これらの２つの観察は、Ｃａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ融合の活動窓における複数のＡが、Ｃで編集される全てのＡをミスマッチさせることによって編集のために指定され得ることを示唆する。これを試験するために、最適化実験から最も有望なガイドを採用し、活動窓内の複数のＡ：Ｃミスマッチを設計して複数のＡ：Ｉ編集を作成する可能性を試験する。この実験の編集率を、ＮＧＳを使用して定量化する。活動窓における潜在的なオフターゲット編集を抑制するために、非標的化ＡをＡまたはＧと対にする（塩基嗜好性実験からの結果に応じて）。

【０８８３】

ＲＮＡ編集のためのガイド長滴定

ＡＤＡＲは、長さ２０ｂｐ超の分子間または分子内ＲＮＡ二本鎖に自然に作用する（Ｎｉｓｈｉｋｕｒａ ｅｔ ａｌ．（２０１０），Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ，７９：３２１－３４９も参照されたい）。結果は、より長いｃｒＲＮＡがより長い二本鎖をもたらし、より高レベルの活性を有することを実証した。ＲＮＡ編集活性について異なる長さのガイドの活性を体系的に比較するために、出願者は、３０、５０、７０、及び８４塩基のガイドを、当社のルシフェラーゼレポーターアッセイで終止コドンを矯正するように設計している（図２０Ａ～２０Ｆ及び下記の表）。出願者は、編集されたＡの位置が、ｃｒＲＮＡの特異性決定領域の３’末端に対してｍＲＮＡ：ｃｒＲＮＡ二本鎖内の全ての可能性のある偶数距離（すなわち＋２、＋４など）で存在するようにこれらのガイドを設計している。

配列名	配列
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ０Ｔｏｐ（配列番号１７９）	ＧＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ１Ｔｏｐ（配列番号１８０）	ＧＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ２Ｔｏｐ（配列番号１８１）	ＧＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ３Ｔｏｐ（配列番号１８２）	ＧＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ４Ｔｏｐ（配列番号１８３）	ＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ５Ｔｏｐ（配列番号１８４）	ＧＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ６Ｔｏｐ（配列番号１８５）	ＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ７Ｔｏｐ（配列番号１８６）	ＧＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ８Ｔｏｐ（配列番号１８７）	ＧＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ９Ｔｏｐ（配列番号１８８）	ＧＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ１０Ｔｏｐ（配列番号１８９）	ＧＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ１１Ｔｏｐ（配列番号１９０）	ＧＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ１２Ｔｏｐ（配列番号１９１）	ＧＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴ

Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ１３Ｔｏｐ（配列番号１９２）	ＧＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿３０＿ＡＤＡＲ１４Ｔｏｐ（配列番号１９３）	ＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ０Ｔｏｐ（配列番号１９４）	ＧＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ１Ｔｏｐ（配列番号１９５）	ＧＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ２Ｔｏｐ（配列番号１９６）	ＧＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ３Ｔｏｐ（配列番号１９７）	ＧＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ４Ｔｏｐ（配列番号１９８）	ＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ５Ｔｏｐ（配列番号１９９）	ＧＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ６Ｔｏｐ（配列番号２００）	ＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ７Ｔｏｐ（配列番号２０１）	ＧＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ８Ｔｏｐ（配列番号２０２）	ＧＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ９Ｔｏｐ（配列番号２０３）	ＧＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ１０Ｔｏｐ（配列番号２０４）	ＧＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ１１Ｔｏｐ（配列番号２０５）	ＧＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡ

Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ１２Ｔｏｐ（配列番号２０６）	ＧＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ１３Ｔｏｐ（配列番号２０７）	ＧＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ１４Ｔｏｐ（配列番号２０８）	ＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ１５Ｔｏｐ（配列番号２０９）	ＧＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ１６Ｔｏｐ（配列番号２１０）	ＧＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ１７Ｔｏｐ（配列番号２１１）	ＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ１８Ｔｏｐ（配列番号２１２）	ＧＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ１９Ｔｏｐ（配列番号２１３）	ＧＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ２０Ｔｏｐ（配列番号２１４）	ＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ２１Ｔｏｐ（配列番号２１５）	ＧＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ２２Ｔｏｐ（配列番号２１６）	ＧＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ２３Ｔｏｐ（配列番号２１７）	ＧＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿５０＿ＡＤＡＲ２４Ｔｏｐ（配列番号２１８）	ＧＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ０Ｔｏｐ（配列番号２１９）	ＧＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧＧＴＴＴＡＴ

Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ１Ｔｏｐ（配列番号２２０）	ＧＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧＧＴＴＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ２Ｔｏｐ（配列番号２２１）	ＧＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧＧＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ３Ｔｏｐ（配列番号２２２）	ＧＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ４Ｔｏｐ（配列番号２２３）	ＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ５Ｔｏｐ（配列番号２２４）	ＧＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ６Ｔｏｐ（配列番号２２５）	ＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ７Ｔｏｐ（配列番号２２６）	ＧＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ８Ｔｏｐ（配列番号２２７）	ＧＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ９Ｔｏｐ（配列番号２２８）	ＧＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ１０Ｔｏｐ（配列番号２２９）	ＧＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ１１Ｔｏｐ（配列番号２３０）	ＧＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ１２Ｔｏｐ（配列番号２３１）	ＧＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ１３Ｔｏｐ（配列番号２３２）	ＧＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ１４Ｔｏｐ（配列番号２３３）	ＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣ

Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ１５Ｔｏｐ（配列番号２３４）	ＧＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ１６Ｔｏｐ（配列番号２３５）	ＧＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ１７Ｔｏｐ（配列番号２３６）	ＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ１８Ｔｏｐ（配列番号２３７）	ＧＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ１９Ｔｏｐ（配列番号２３８）	ＧＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ２０Ｔｏｐ（配列番号２３９）	ＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ２１Ｔｏｐ（配列番号２４０）	ＧＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ２２Ｔｏｐ（配列番号２４１）	ＧＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ２３Ｔｏｐ（配列番号２４２）	ＧＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ２４Ｔｏｐ（配列番号２４３）	ＧＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ２５Ｔｏｐ（配列番号２４４）	ＧＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ２６Ｔｏｐ（配列番号２４５）	ＧＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ２７Ｔｏｐ（配列番号２４６）	ＧＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ２８Ｔｏｐ（配列番号２４７）	ＧＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣ

Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ２９Ｔｏｐ（配列番号２４８）	ＧＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ３０Ｔｏｐ（配列番号２４９）	ＧＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ３１Ｔｏｐ（配列番号２５０）	ＧＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ３２Ｔｏｐ（配列番号２５１）	ＧＴＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ３３Ｔｏｐ（配列番号２５２）	ＧＣＣＴＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿７０＿ＡＤＡＲ３４Ｔｏｐ（配列番号２５３）	ＧＴＴＣＣＴＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ０Ｔｏｐ（配列番号２５４）	ＧＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧＧＴＴＴＡＴＴＴＴＣＡＣＡＣＡＧＴＣＣＡ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ１Ｔｏｐ（配列番号２５５）	ＧＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧＧＴＴＴＡＴＴＴＣＡＣＡＣＡＧＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ２Ｔｏｐ（配列番号２５６）	ＧＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧＧＴＴＴＡＴＴＴＴＣＡＣＡＣＡＧ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ３Ｔｏｐ（配列番号２５７）	ＧＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧＧＴＴＴＡＴＴＴＴＣＡＣＡＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ４Ｔｏｐ（配列番号２５８）	ＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧＧＴＴＴＡＴＴＴＴＣＡＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ５Ｔｏｐ（配列番号２５９）	ＧＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧＧＴＴＴＡＴＴＴＴＣ

Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ６Ｔｏｐ（配列番号２６０）	ＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧＧＴＴＴＡＴＴＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ７Ｔｏｐ（配列番号２６１）	ＧＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧＧＴＴＴＡＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ８Ｔｏｐ（配列番号２６２）	ＧＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧＧＴＴＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ９Ｔｏｐ（配列番号２６３）	ＧＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧＧＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ１０Ｔｏｐ（配列番号２６４）	ＧＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣＴＧ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ１１Ｔｏｐ（配列番号２６５）	ＧＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴＣＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ１２Ｔｏｐ（配列番号２６６）	ＧＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴＴＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ１３Ｔｏｐ（配列番号２６７）	ＧＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ１４Ｔｏｐ（配列番号２６８）	ＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ１５Ｔｏｐ（配列番号２６９）	ＧＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ１	ＧＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴ

６Ｔｏｐ（配列番号２７０）	ＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ１７Ｔｏｐ（配列番号２７１）	ＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ１８Ｔｏｐ（配列番号２７２）	ＧＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ１９Ｔｏｐ（配列番号２７３）	ＧＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ２０Ｔｏｐ（配列番号２７４）	ＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ２１Ｔｏｐ（配列番号２７５）	ＧＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ２２Ｔｏｐ（配列番号２７６）	ＧＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ２３Ｔｏｐ（配列番号２７７）	ＧＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ２４Ｔｏｐ（配列番号２７８）	ＧＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴＡＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ２５Ｔｏｐ（配列番号２７９）	ＧＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣＡＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ２６Ｔｏｐ（配列番号２８０）	ＧＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴＡＣ

Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ２７Ｔｏｐ（配列番号２８１）	ＧＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡＴＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ２８Ｔｏｐ（配列番号２８２）	ＧＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣＡＡ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ２９Ｔｏｐ（配列番号２８３）	ＧＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ３０Ｔｏｐ（配列番号２８４）	ＧＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣＡＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ３１Ｔｏｐ（配列番号２８５）	ＧＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴＧＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ３２Ｔｏｐ（配列番号２８６）	ＧＴＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴＣＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ３３Ｔｏｐ（配列番号２８７）	ＧＣＣＴＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡＣＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ３４Ｔｏｐ（配列番号２８８）	ＧＴＴＣＣＴＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣＴＡ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ３５Ｔｏｐ（配列番号２８９）	ＧＧＧＴＴＣＣＴＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ３６Ｔｏｐ（配列番号２９０）	ＧＴＴＧＧＴＴＣＣＴＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧＣＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ３	ＧＣＣＴＴＧＧＴＴＣＣＴＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧ

７Ｔｏｐ（配列番号２９１）	ＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣＧＧ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ３８Ｔｏｐ（配列番号２９２）	ＧＧＣＣＣＴＴＧＧＴＴＣＣＴＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴＧＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ３９Ｔｏｐ（配列番号２９３）	ＧＣＣＧＣＣＣＴＴＧＧＴＴＣＣＴＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣＣＴ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ４０Ｔｏｐ（配列番号２９４）	ＧＣＧＣＣＧＣＣＣＴＴＧＧＴＴＣＣＴＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡＴＣ
Ｇｕｉｄｅ＿Ｃａｓ１３ｂＣ－ｌｕｃ＿８４＿ＡＤＡＲ４１Ｔｏｐ（配列番号２９５）	ＧＧＴＣＧＣＣＧＣＣＣＴＴＧＧＴＴＣＣＴＴＧＡＣＣＣＡＡＣＡＣＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴＣＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＡＴＧＴＴＣＴＡＡＡＣＣＡ

【０８８４】

原因疾患変異の復帰

以下の表中の３つの遺伝子を、プレ終端終止部位を遺伝子に導入し、それらを非ヒト細胞株に統合する病原性Ｇ＞Ａ変異と合成する。終止コドンＵＡＧをＵＩＧ（ＵＧＧ）に変化させ、ひいてはタンパク質翻訳を回復することによって転写産物を矯正する、Ｃａｓ１３ｂ１２－ＡＤＡＲ２の能力を試験する。

タンパク質長（ａａ）	全長候補	遺伝子	疾患
４９８	ＮＭ＿００４９９２．３（ＭＥＣＰ２）：ｃ．３１１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１０４Ｔｅｒ）	ＭＥＣＰ２	Ｒｅｔｔ症候群
４１４	ＮＭ＿００７３７５．３（ＴＡＲＤＢＰ）：ｃ．９４３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ３１５Ｔｈｒ）	ＴＡＲＤＢＰ	筋萎縮性側索硬化症１０型
３９３	ＮＭ＿０００５４６．５（ＴＰ５３）：ｃ．２７３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ９１Ｔｅｒ）	ＴＰ５３	Ｌｉ－Ｆｒａｕｍｅｎｉ症候群｜遺伝性がん素因症候群

【０８８５】

さらに４８個の病原性Ｇ＞Ａ変異を、それに伴う疾患と共に以下の表５に示す。これらの変異の周囲の２００ｂｐの断片を、遺伝子全体ではなく、合成し、ＧＦＰの前でクローニングする。プレ終端部位が回復する場合、ＧＦＰの翻訳が可能となり、ＲＮＡシークエンシングに加えて、高スループット蛍光によって補正を測定することができる。

【表５】
表５

	候補	遺伝子	疾患
1	NM_004006.2(DMD):c.3747G>A(p.Trp1249Ter)	DMD	Duchenne型筋ジストロフィー
2	M_000344.3(SMN1):c.305G>A(p.Trp102Ter)	SMN1	脊髄性筋萎縮症、II型|Kugelberg−Welander病
3	NM_000492.3(CFTR):c.3846G>A(p.Trp1282Ter)	CFTR	嚢胞性線維症|遺伝性膵炎|提供されない|アタルレン応答−有効性
4	NM_004562.2(PRKN):c.1358G>A(p.Trp453Ter)	PRKN	Parkinson病2
5	NM_017651.4(AHI1):c.2174G>A(p.Trp725Ter)	AHI1	Joubert症候群3
6	NM_000238.3(KCNH2):c.3002G>A(p.Trp1001Ter)	KCNH2	QT延長症候群|提供されない
7	NM_000136.2(FANCC):c.1517G>A(p.Trp506Ter)	FANCC|C9orf3	Fanconi貧血、補体群C
8	NM_001009944.2(PKD1):c.12420G>A(p.Trp4140Ter)	PKD1	多発性嚢胞腎疾患、成人型
9	NM_177965.3(C8orf37):c.555G>A(p.Trp185Ter)	C8orf37	網膜色素変性64

１０	ＮＭ＿０００８３３．４（ＧＲＩＮ２Ａ）：ｃ．３８１３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１２７１Ｔｅｒ）	ＧＲＩＮ２Ａ	発話障害を有し、精神遅滞を伴うか、または伴わないてんかん、焦点性
１１	ＮＭ＿０００５４８．４（ＴＳＣ２）：ｃ．２１０８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７０３Ｔｅｒ）	ＴＳＣ２	結節性硬化症２｜結節性硬化症症候群
１２	ＮＭ＿０００２６７．３（ＮＦ１）：ｃ．７０４４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２３４８Ｔｅｒ）	ＮＦ１	神経線維腫症、１型
１３	ＮＭ＿０００５２０．５（ＨＥＸＡ）：ｃ．１４５４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４８５Ｔｅｒ）	ＨＥＸＡ	Ｔａｙ－Ｓａｃｈｓ病
１４	ＮＭ＿１３０８３８．１（ＵＢＥ３Ａ）：ｃ．２３０４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７６８Ｔｅｒ）	ＵＢＥ３Ａ	Ａｎｇｅｌｍａｎ症候群
１５	ＮＭ＿０００５４３．４（ＳＭＰＤ１）：ｃ．１６８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５６Ｔｅｒ）	ＳＭＰＤ１	Ｎｉｅｍａｎｎ－Ｐｉｃｋ病、Ａ型
１６	ＮＭ＿０００２１８．２（ＫＣＮＱ１）：ｃ．１１７５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３９２Ｔｅｒ）	ＫＣＮＱ１	ＱＴ延長症候群
１７	ＮＭ＿０００２５６．３（ＭＹＢＰＣ３）：ｃ．３２９３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１０９８Ｔｅｒ）	ＭＹＢＰＣ３	原発性家族性肥大型心筋症
１８	ＮＭ＿０００３８．５（ＡＰＣ）：ｃ．１２６２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４２１Ｔｅｒ）	ＡＰＣ	家族性大腸腺腫症１

１９	ＮＭ＿０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．１９９８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ６６６Ｔｅｒ）	ＭＬＨ１	Ｌｙｎｃｈ症候群
２０	ＮＭ＿０００００５４．４（ＡＶＰＲ２）：ｃ．８７８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２９３Ｔｅｒ）	ＡＶＰＲ２	腎性尿崩症、Ｘ連鎖性
２１	ＮＭ＿００１２０４．６（ＢＭＰＲ２）：ｃ．８９３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｗ２９８＊）	ＢＭＰＲ２	原発性肺高血圧症
２２	ＮＭ＿００４５６０．３（ＲＯＲ２）：ｃ．２２４７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７４９Ｔｅｒ）	ＲＯＲ２	短指症、Ｂ１型
２３	ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．１１４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３８Ｔｅｒ）	ＨＢＢ	ベータ＾０＾サラセミア｜ベータサラセミア
２４	ＮＭ＿０２４５７７．３（ＳＨ３ＴＣ２）：ｃ．９２０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３０７Ｔｅｒ）	ＳＨ３ＴＣ２	Ｃｈａｒｃｏｔ－Ｍａｒｉｅ－Ｔｏｏｔｈ病、４Ｃ型
２５	ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．９３９０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３１３０Ｔｅｒ）	ＵＳＨ２Ａ	Ｕｓｈｅｒ症候群、２Ａ型
２６	ＮＭ＿０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．３０２０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１００７Ｔｅｒ）	ＭＳＨ６	Ｌｙｎｃｈ症候群
２７	ＮＭ＿００２９７７．３（ＳＣＮ９Ａ）：ｃ．２６９１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ８９７Ｔｅｒ）	ＳＣＮ９Ａ｜ＬＯＣ１０１９２９６８０	疼痛に不関、先天性、常染色体劣性

28	NM_000090.3（COL3A1）：c.30G>A（p.Trp10Ter）	COL3A1	Ehlers－Danlos症候群、4型
29	NM_000551.3（VHL）：c.263G>A（p.Trp88Ter）	VHL	Von Hippel－Lindau症候群｜提供されない
30	NM_015627.2（LDLRAP1）：c.65G>A（p.Trp22Ter）	LDLRAP1	高コレステロール血症、常染色体劣性
31	NM_000132.3（F8）：c.3144G>A（p.Trp1048Ter）	F8	遺伝性第ＶＩＩＩ因子欠乏症
32	NM_002185.4（IL7R）：c.651G>A（p.Trp217Ter）	IL7R	重度の複合免疫不全、常染色体劣性、Ｔ細胞陰性、Ｂ細胞陽性、ＮＫ細胞陽性
33	NM_000527.4（LDLR）：c.1449G>A（p.Trp483Ter）	LDLR	家族性高コレステロール血症
34	NM_002294.2（LAMP2）：c.962G>A（p.Trp321Ter）	LAMP2	Danon病
35	NM_000271.4（NPC1）：c.1142G>A（p.Trp381Ter）	NPC1	Niemann－Pick病、Ｃ1型
36	NM_000267.3（NF1）：c.1713G>A（p.Trp571Ter）	NF1	神経線維腫症、１型

37	NM_000035.3（ALDOB）：c.888G>A（p.Trp296Ter）	ALDOB	遺伝性果糖尿症
38	NM_000090.3（COL3A1）：c.3833G>A（p.Trp1278Ter）	COL3A1	Ehlers－Danlos症候群、4型
39	NM_001369.2（DNAH5）：c.8465G>A（p.Trp2822Ter）	DNAH5	原発性線毛運動不全症
40	NM_178443.2（FERMT3）：c.48G>A（p.Trp16Ter）	FERMT3	白血球粘着不全症、III型
41	NM_005359.5（SMAD4）：c.906G>A（p.Trp302Ter）	SMAD4	若年性ポリポーシス症候群
42	NM_032119.3（ADGRV1）：c.7406G>A（p.Trp2469Ter）	ADGRV1	Usher症候群、2C型
43	NM_000206.2（IL2RG）：c.710G>A（p.Trp237Ter）	IL2RG	X連鎖重症複合免疫不全症
44	NM_007294.3（BRCA1）：c.5511G>A（p.Trp1837Ter）	BRCA1	家族性乳癌｜乳－卵巣癌、家族性1
45	NM_130799.2（MEN1）：c.1269G>A（p.Trp423Ter）	MEN1	遺伝性がん素因症候群

４６	ＮＭ＿０００７１．２（ＣＢＳ）：ｃ．１６２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５４Ｔｅｒ）	ＣＢＳ	ＣＢＳ欠乏によるホモシスチン尿症
４７	ＮＭ＿０００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．５８２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１９４Ｔｅｒ）	ＢＲＣＡ２	家族性乳癌｜乳－卵巣癌、家族性２
４８	ＮＭ＿０００５３．３（ＡＴＰ７Ｂ）：ｃ．２３３６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７７９Ｔｅｒ）	ＡＴＰ７Ｂ	Ｗｉｌｓｏｎ病

【０８８６】

実施例３

効率的かつ正確な核酸編集は、特に疾患関連転写産物を救出して機能的タンパク質産物を得ることができるＲＮＡのレベルにおいて、遺伝子疾患の治療に非常に有望である。ＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムは、プログラム可能な単一エフェクターであるＲＮＡ誘導ＲＮａｓｅｓ　Ｃａｓ１３を含有する。ここで、ＶＩ型システムの多様性をプロファイルして、頑健なノックダウンが可能なＣａｓ１３オーソログを操作し、触媒的に不活性なＣａｓ１３（ｄＣａｓ１３）を使用して、アデノシンデアミナーゼ活性を哺乳動物細胞内の転写産物に誘導することによってＲＮＡ編集を実証する。ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメインをｄＣａｓ１３に融合し、ガイドＲＮＡを操作して最適なＲＮＡ二本鎖基質を作成することによって、特異的な単一アデノシンからイノシン（これは翻訳中にグアノシンとして読み出される）への標的化された編集を、通常２０～４０％及び最大８９％の範囲の効率で達成する。このシステムは、プログラム可能なＡからＩへの置換のためのＲＮＡ編集（ＲＮＡ　Ｅｄｉｔｉｎｇ　ｆｏｒ　Ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ　Ａ　ｔｏ　Ｉ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、ＲＥＰＡＩＲ）と称され、さらに操作して高い特異性を達成することができる。操作されたバリアント、ＲＥＰＡＩＲｖ２は、頑健なオンターゲットのＡからＩへの編集を維持しながら、特異性において１７０倍超の増加を示す。ＲＥＰＡＩＲｖ２を使用して、既知の病原性変異を含有する全長転写産物を編集し、アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）ベクターにおけるパッケージングに適した、機能的な切断されたバージョンを作成する。ＲＥＰＡＩＲは、研究、治療、及びバイオテクノロジーに幅広い適用性を有する、有望なＲＮＡ編集プラットフォームを提示する。正確な核酸編集技術は、細胞機能の研究のために、及び新規治療薬として有益である。Ｃａｓ９ヌクレアーゼなどの現在の編集ツールは、ゲノム座位のプログラム可能な修飾を達成することができるが、編集はしばしば、挿入または欠失のために不均一であるか、または正確な編集のためのドナーテンプレートを必要とする。ｄＣａｓ９－ＡＰＯＢＥＣ融合などの塩基エディタは、二本鎖断裂を生成することなく編集を可能にするが、標的窓内の任意のシチジンを編集するシチジンデアミナーゼ活性の性質上、精度に欠ける場合がある。さらに、プロトスペーサーの隣接モチーフ（ＰＡＭ）の要件は、可能性のある編集部位の数を制限する。ここで、ＶＩ型原核生物の、クラスター化され規則的に間隔が空いている短い回文の反復（ＣＲＩＳＰＲ）獲得免疫系由来のＣａｓ１３酵素を標的化するＲＮＡ誘導ＲＮＡを使用する正確かつ柔軟なＲＮＡ塩基編集ツールの開発について説明する。

【０８８７】

正確な核酸編集技術は、細胞機能の研究のために、及び新規治療薬として有益である。原核生物の、クラスター化され規則的に間隔が空いている短い回文の反復（ＣＲＩＳＰＲ）関連ヌクレアーゼＣａｓ９（１～４）またはＣｐｆ１（５）などのプログラム可能なヌクレアーゼに基づいた現在の編集ツールは、標的化されたＤＮＡ切断を媒介するために幅

広く採用されており、これは、次いで、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）による標的化された遺伝子破壊、またはテンプレート依存相同組み換え修復（ＨＤＲ）による正確な遺伝子編集を駆動する（６）。ＮＨＥＪは、分裂細胞及び有糸分裂後細胞の両方において活性である宿主機械を利用し、遺伝子をコードするタンパク質におけるフレームシフトにつながり得る挿入または欠失（インデル）変異の混合物を生成することによって効率的な遺伝子破壊を提供する。対照的に、ＨＤＲは宿主機械によって媒介され、宿主機械の発現は細胞を複製することに大きく制限される。このように、有糸分裂後細胞における遺伝子編集能力の開発は、依然として大きな課題である。最近では、特定のゲノム標的にシチジンデアミナーゼ活性を標的化して、標的窓内でのシトシンからチミンへの変換に影響を与えるための、触媒的に不活性なＣａｓ９（ｄＣａｓ９）の使用などのＤＮＡ塩基エディタは、ＤＮＡ二本鎖断裂を生成することなく編集を可能にし、インデルの形成を有意に低減する（７、８）。しかしながら、ＤＮＡ塩基エディタの標的化範囲は、編集部位でのプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）のためのＣａｓ９の要件のために制限される（９）。ここで、ＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ関連ＲＮＡ誘導ＲＮａｓｅ　Ｃａｓ１３（１０～１３）を使用する正確かつ柔軟なＲＮＡ塩基編集技術の開発について説明する。

【０８８８】

Ｃａｓ１３酵素は、正確なＲＮＡ切断を媒介する２つのＨｉｇｈｅｒ　Ｅｕｋａｒｙｏｔｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒｏｋａｒｙｏｔｅｓ　Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ－ｂｉｎｄｉｎｇ（ＨＥＰＮ）ｅｎｄｏＲＮａｓｅドメイン（１０、１１）を有する。３つのＣａｓ１３タンパク質ファミリー：Ｃａｓ１３ａ（以前はＣ２ｃ２として知られていた）、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃ（１２、１３）が現在までに特定されている。出願者は、Ｃａｓ１３ａ酵素が核酸検出（１４）ならびに哺乳動物細胞及び植物細胞ＲＮＡノックダウン及び転写産物追跡（１５）のためのツールとして適応できることを最近報告した。Ｃａｓ１３酵素のＲＮＡ誘導性は、それらをＲＮＡ結合及び撹乱用途のための魅力的なツールにする。

【０８８９】

酵素のＲＮＡ（ＡＤＡＲ）ファミリーに作用するアデノシンデアミナーゼは、アデノシンのイノシンへの加水分解的脱アミノ化を介して転写産物の内因性編集を媒介し、イノシンは翻訳及びスプライシングにおいてグアノシンと機能的に等価な核酸塩基である（１６）。Ｎ末端二本鎖ＲＮＡ結合ドメイン及びＣ末端触媒脱アミノ化ドメインからなる２つの機能的ヒトＡＤＡＲオーソログ、ＡＤＡＲ１及びＡＤＡＲ２が存在する。ＡＤＡＲ１及びＡＤＡＲ２の内因性標的部位は実質的な二本鎖同一性を含有し、触媒ドメインはインビボ及びインビトロでの効率的な編集のために二本鎖領域を必要とする（１７、１８）。ＡＤＡＲタンパク質は、標的化の潜在的な柔軟性を制限する可能性がある編集のための好ましいモチーフを有するが、ＡＤＡＲ（Ｅ４８８Ｑ）（１９）などの超活性型変異体は、配列制約を緩和し、アデノシンのイノシンへの編集率を改善する。ＡＤＡＲは、ＲＮＡ二本鎖中のシチジン塩基と反対側のアデノシンを優先的に脱アミノ化し（２０）、正確な塩基編集の有望な機会を提供する。以前の手法はＲＮＡガイドを介して標的化されたＡＤＡＲ融合を操作しているが（２１～２４）、これらの手法の特異性は報告されておらず、それらのそれぞれの標的化機構は、標的認識及びストリンジェンシーを増強し得るタンパク質パートナーの援助なしにＲＮＡ－ＲＮＡハイブリダイゼーションに依存する。

【０８９０】

ここで、哺乳動物細胞におけるＲＮＡノックダウン活性についてＣａｓ１３酵素のファミリー全体をアッセイし、Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｓｐ．Ｐ５－１２５（ＰｓｐＣａｓ１３ｂ）からのＣａｓ１３ｂオーソログを哺乳動物細胞用途に最も効率的で特異的であると特定する。次いで、ＡＤＡＲ２デアミナーゼドメイン（ＡＤＡＲＤＤ）を触媒的に不活性なＰｓｐＣａｓ１３ｂに融合し、レポーター及び内因性転写産物ならびに疾患関連変異のプログラム可能なＡからＩ（Ｇ）への置換のためのＲＮＡ編集（ＲＥＰＡＩＲ）を実証する。最後に、合理的な変異誘発スキームを用いてｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２ＤＤ融合の特異性を改善し、特異性が１７０倍以上増加したＲＥＰＡＩＲｖ２を生成する。

【０８９１】

方法設計及び細菌構築物のクローニング

哺乳動物コドン最適化Ｃａｓ１３ｂ構築物を、Ｌａｃプロモーターの制御下でクロラムフェニコール耐性ｐＡＣＹＣ１８４ベクターにクローニングした。次いで、ＢｓａＩ制限部位によって分離された２つの対応する直接反復（ＤＲ）配列を、ｐＪ２３１１９プロモーターの制御下でＣａｓ１３ｂの下流に挿入した。最後に、スペーサーを標的化するためのオリゴを、Ｔ４　ＰＮＫ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用してリン酸化し、Ｔ７リガーゼ（Ｅｎｚｙｍａｔｉｃｓ）を使用してＢｓａＩ消化ベクターにアニール及び核酸連結して、標的化Ｃａｓ１３ｂベクターを生成した。

【０８９２】

細菌ＰＦＳスクリーニング

ＰＦＳスクリーニングのためのアンピシリン耐性プラスミドを、ＮＥＢ　Ｇｉｂｓｏｎ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して、アンピシリン耐性遺伝子ｂｌａの開始コドンのすぐ下流の標的部位によって分離された２個の５’ランダム化されたヌクレオチド及び４個の３’ランダム化されたヌクレオチドを有するＣａｓ１３ｂ標的を含有するＰＣＲ生成物を挿入することによってクローニングした。次いで、１００ｎｇのアンピシリン耐性標的プラスミドを、６５～１００ｎｇのクロラムフェニコール耐性Ｃａｓ１３ｂ標的化プラスミドと共にＥｎｄｕｒａ　Ｅｌｅｃｔｒｏｃｏｍｐｅｔｅｎｔ　Ｃｅｌｌに電気穿孔した。プラスミドを細胞に添加し、氷上で１５分間インキュベートして、製造業者のプロトコルを使用して電気穿孔し、次いで９５０ｕＬの回収培地を細胞に添加した後、３７Ｃで１時間の増殖を行った。増殖物をクロラムフェニコール及びアンピシリンの二重選択プレートの上に播種した。増殖物の連続希釈を使用して、ｃｆｕ／ｎｇのＤＮＡを推定した。播種後１６時間で細胞をプレートから削り取り、生存するプラスミドＤＮＡをＱｉａｇｅｎ　Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｐｌｕｓ　Ｍａｘｉ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して採取した。生存するＣａｓ１３ｂ標的配列及びそれらの隣接領域を、ＰＣＲによって増幅し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＮｅｘｔＳｅｑを使用して配列決定した。ＰＦＳの嗜好性を評価するために、元のライブラリ内のランダム化されたヌクレオチドを含有する位置を抽出し、両方のバイオレプリケートに存在するベクター単独条件に対して枯渇した配列を、カスタムｐｙｔｈｏｎスクリプトを使用して抽出した。次いで、ベクター単独対照と比較したＣａｓ１３ｂ条件におけるＰＦＳ存在量の比の－ｌｏｇ２を使用して、好ましいモチーフを計算した。具体的には、特定の閾値を超える－ｌｏｇ２（ｓａｍｐｌｅ／ｖｅｃｔｏｒ）枯渇比を有する全ての配列を使用して、配列モチーフのウェブロゴ（ｗｅｂｌｏｇｏ．ｂｅｒｋｅｌｅｙ．ｅｄｕ）を生成した。各Ｃａｓ１３ｂオーソログについてウェブロゴを生成するために使用される特定の枯渇比値を表９に列挙する。

【０８９３】

ＲＮＡ干渉のための哺乳動物構築物の設計及びクローニング

哺乳動物細胞におけるＣａｓ１３オーソログを試験するためのベクターを生成するために、哺乳動物コドン最適化Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、及びＣａｓ１３ｃ遺伝子をＰＣＲ増幅し、ＥＦ１アルファプロポーターの制御下で二重ＮＬＳ配列及びＣ末端ｍｓｆＧＦＰを含有する哺乳動物発現ベクターにｇｏｌｄｅｎ－ｇａｔｅクローニングした。さらなる最適化のために、Ｃａｓ１３オーソログを、ＥＦ１アルファプロポーターの制御下で異なるＣ末端局在化タグを含有するデスティネーションベクターにｇｏｌｄｅｎ　ｇａｔｅクローニングした。

【０８９４】

二重ルシフェラーゼレポーターを、ＤＮＡ、ＥＦ１アルファ及びＣＭＶプロモーターをコードするＧａｕｓｓｉａ及びＣｙｐｒｉｄｉｎｉａルシフェラーゼを増幅するＰＣＲ、ならびにＮＥＢ　Ｇｉｂｓｏｎ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用するアセンブリによってクローニングした。

【０８９５】

Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１３ｂ、またはＣａｓ１３ｃオーソログの哺乳動物ガイドＲＮＡ

の発現のために、対応する直接反復配列をｇｏｌｄｅｎ－ｇａｔｅ受容体部位と合成し、制限消化クローニングを介してＵ６発現下でクローニングした。次いで、個々のガイドを、ｇｏｌｄｅｎ　ｇａｔｅクローニングによって各オーソログについて対応する発現バックボーンにクローニングした。

【０８９６】

Ｃａｓ１３干渉特異性のためのプールされたミスマッチライブラリのクローニング

プールされたミスマッチライブラリ標的部位をＰＣＲによって作成した。標的内の各位置で９４％の正確な塩基及び２％の各不正確な塩基の混合物を含有するＧ－ルシフェラーゼにおいて半変性標的配列を含有するオリゴを第１のプライマーとして使用し、Ｇ－ルシフェラーゼの非標的化領域に対応するオリゴをＰＣＲ反応において第２のプライマーとして使用した。次いで、ミスマッチライブラリ標的を、ＮＥＢ　Ｇｉｂｓｏｎ　ａｓｓｅｍｂｌｙ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して野生型Ｇ－ルシフェラーゼの代わりに二重ルシフェラーゼレポーターにクローニングした。

【０８９７】

ＲＮＡ編集のための哺乳動物構築物の設計及びクローニング

ＰｓｐＣａｓ１３ｂを、ＨＥＰＮドメインの触媒部位での２つのヒスチジンのアラニンへの変異（Ｈ１３３Ａ／Ｈ１０５８Ａ）を介して触媒的に不活性（ｄＰｓｐＣａｓ１３ｂ）にする。ヒトＡＤＡＲ１及びＡＤＡＲ２のデアミナーゼドメインを合成し、ｐｃＤＮＡ－ＣＭＶベクターバックボーンにｇｉｂｓｏｎクローニングするためにＰＣＲ増幅して、ＧＳまたはＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２９６）リンカーを介してＣ末端でｄＰｓｐＣａｓ１３ｂに融合した。異なるリンカーを試験した実験のために、ｄＰｓｐＣａｓ１３ｂとＡＤＡＲ２ｄｄとの間に以下の追加のリンカーをクローニングした：ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ、ＥＡＡＡＫ（配列番号２９７）、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（配列番号２９８）、及びＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号２９９）（ＸＴＥＮ）。特異性変異体を、適切な変異体をｄＰｓｐＣａｓ１３ｂ－ＧＳＧＧＧＧＳバックボーンにｇｉｂｓｏｎクローニングすることによって生成した。

【０８９８】

ＲＮＡ編集活性を測定するためのルシフェラーゼレポーターベクターを、ノックダウン実験に使用されるルシフェラーゼレポーターベクターにおいてＷ８５Ｘ変異（ＴＧＧ＞ＴＡＧ）を作成することによって生成した。このレポーターベクターは、正規化対照として機能性Ｇｌｕｃを発現するが、プレ終端部位の追加による欠陥Ｃｌｕｃである。ＡＤＡＲ編集モチーフの嗜好性を試験するために、Ｃｌｕｃのコドン８５（ＸＡＸ）でアデノシンの周囲のあらゆる可能性のあるモチーフをクローニングした。

【０８９９】

ＲＥＰＡＩＲのＰＦＳ嗜好性を試験するために、標的領域及びアデノシン編集部位の上流に６塩基対変性ＰＦＳ配列を含有するプールされたプラスミドライブラリをクローニングした。ライブラリをＩｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（ＩＤＴ）からのウルトラマーとして合成し、配列のプライマー及びＤＮＡポリメラーゼＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）充填のＫｌｅｎｏｗ断片をアニールすることによって二本鎖にした。次いで、変性配列を含有するこのｄｓＤＮＡ断片を、消化されたレポーターベクターにｇｉｂｓｏｎクローニングし、次いでこれをイソプロパノール沈殿して精製した。次いで、クローニングされたライブラリを、ＥｎｄｕｒａコンピテントＥ．ｃｏｌｉ細胞（Ｌｕｃｉｇｅｎ）に電気穿孔し、２４５ｍｍ×２４５ｍｍ角のバイオアッセイ（Ｎｕｎｃ）上に播種した。１６時間後、コロニーを採取し、エンドトキシンを含有しないＭＡＣＨＥＲＥＹ－ＮＡＧＥＬ　ｍｉｄｉｐｒｅｐキットを使用してミディプレップした。クローニングされたライブラリを、次世代シークエンシングによって検証した。

【０９００】

ＲＥＰＡＩＲ活性を試験するための疾患関連変異をクローニングするために、ＣｌｉｎＶａｒに定義される疾患の病因に関連する３４個のＧ＞Ａ変異を選択し、これらの変異を取り囲む２００ｂｐの領域を、ｍＳｃａｒｌｅｔｔとＥＧＦＰとの間にＣＭＶプロモータ

ー下でｇｏｌｄｅｎ　ｇａｔｅクローニングした。ＡＶＰＲ２及びＦＡＮＣＣにおける２つの追加のＧ＞Ａ変異を、ＥＦ１アルファの発現下で遺伝子配列全体をＧｉｂｓｏｎクローニングするために選択した。

【０９０１】

ＲＥＰＡＩＲのための哺乳動物ガイドＲＮＡの発現のために、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ直接反復配列をｇｏｌｄｅｎ－ｇａｔｅ受容体部位と合成し、制限消化クローニングを介してＵ６発現下でクローニングした。次いで、個々のガイドを、ｇｏｌｄｅｎ　ｇａｔｅクローニングによってこの発現バックボーンにクローニングした。

【０９０２】

哺乳動物細胞培養

高グルコース、ピルビン酸ナトリウム、及びＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を含み、追加で１倍のペニシリン－ストレプトマイシン（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び１０％のウシ胎児血清（ＶＷＲ　Ｓｅｒａｄｉｇｍ）を補充した、ＤｕｌｂｅｃｃｏのＭｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ　Ｍｅｄｉｕｍ中で増殖させたＨＥＫ２９３ＦＴライン（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ））において、哺乳動物細胞培養実験を実施した。細胞を８０％未満の培養密度で維持した。

【０９０３】

別途記載がない限り、全てのトランスフェクションを、ポリ－Ｄ－リジン（ＢＤ　Ｂｉｏｃｏａｔ）でコーティングされた９６ウェルプレート中でＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて実施した。細胞を、トランスフェクション時に９０％の培養密度を確実にするように、トランスフェクションの１６時間前におよそ２０，０００細胞／ウェルで播種した。プレート上の各ウェルにつき、トランスフェクションプラスミドをＯｐｔｉ－ＭＥＭ　Ｉ　Ｒｅｄｕｃｅｄ　Ｓｅｒｕｍ　Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）と組み合わせて合計２５μｌにした。別個に、２４．５ｕｌのＯｐｔｉ－ＭＥＭを、０．５ｕｌのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００と組み合わせた。次いで、プラスミド及びＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ溶液を組み合わせて５分間インキュベートし、その後、細胞上にピペットで分注した。

【０９０４】

ＲＮＡノックダウン哺乳動物細胞アッセイ

レポーター構築物を有する哺乳動物細胞におけるＲＮＡ標的化を評価するために、１５０ｎｇのＣａｓ１３構築物を、３００ｎｇのガイド発現プラスミド及び１２．５ｎｇのノックダウンレポーター構築物と共に同時トランスフェクションした。トランスフェクションの４８時間後、分泌されたルシフェラーゼを含有する培地を細胞から除去し、ＰＢＳ中で１：５に希釈し、注入プロトコルを有するプレートリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｎｅｏ２）上で、ＢｉｏＬｕｘ　Ｃｙｐｒｉｄｉｎｉａ及びＢｉｏｌｕｘ　Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼアッセイキット（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を用いて活性を測定した。実行される全ての反復は生物学的反復である。

【０９０５】

内因性遺伝子の標的化のために、１５０ｎｇのＣａｓ１３構築物を、３００ｎｇのガイド発現プラスミドと共に同時トランスフェクションした。トランスフェクションの４８時間後、細胞を溶解し、ＲＮＡを採取して、Ｃｅｌｌｓ－ｔｏ－Ｃｔ　ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の前述の［引用プロトコル］修飾を使用して逆転写した。ｃＤＮＡ発現を、ＫＲＡＳ転写産物のためのＴａｑＭａｎ　ｑＰＣＲプローブ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ＧＡＰＤＨ制御プローブ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、及びＦａｓｔ　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用する、ｑＰＣＲを介して測定した。ｑＰＣＲ反応を、３８４ウェルフォーマットで４つの５ｕｌの技術的反復を用いて、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ　４８０　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎ

ｔ　ＩＩ（Ｒｏｃｈｅ）で読み出した。
【０９０６】
ミスマッチした標的のプールされたライブラリを使用するＲＮＡ特異性の評価
　６ウェルプレートに播種されたＨＥＫ２９３ＦＴ細胞を使用して、ミスマッチした標的ライブラリに干渉するＣａｓ１３の能力を試験した。約７０％の培養密度の細胞を、２４００ｎｇのＣａｓ１３ベクター、４８００ｎｇのガイド、及び２４０ｎｇのミスマッチした標的ライブラリを使用してトランスフェクションした。トランスフェクションの４８時間後、細胞を採取し、ＱＩＡｓｈｒｅｄｄｅｒ（Ｑｉａｇｅｎ）及びＱｉａｇｅｎ　ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔを使用してＲＮＡを抽出した。１ｕｇの抽出されたＲＮＡを、製造業者の遺伝子特異的プライミングプロトコル及びＧｌｕｃ特異的ＲＴプライマーに続いて、ｑＳｃｒｉｐｔ　Ｆｌｅｘ　ｃＤＮＡ合成キット（Ｑｕａｎｔａｂｉｏ）を使用して逆転写した。次いで、ｃＤＮＡを増幅し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＮｅｘｔＳｅｑ上で配列決定した。
【０９０７】
　シークエンシングは、配列ごとの読み取りデータをカウントすることによって分析され、ｌｏｇ２（読み取りカウント比）値を決定することによって枯渇スコアを算出し、ここで読み取りカウント比は、標的化ガイド条件対非標的化ガイド条件における読み取りカウントの比である。このスコア値は、配列上のＣａｓ１３活性のレベルを表し、より高い値は、より強い枯渇、したがってより高いＣａｓ１３切断活性を表す。単一ミスマッチ及び二重ミスマッチ配列について別個の分布を決定し、各ミスマッチ同一性の枯渇スコアを有するヒートマップとしてプロットした。二重ミスマッチ配列について、所与の位置での可能性のある二重ミスマッチ全ての平均をプロットした。
【０９０８】
ＲＮＡシークエンシングによる哺乳動物細胞におけるＣａｓ１３のトランスクリプトームワイドなプロファイリング
　トランスクリプトームワイドな特異性の測定のために、１５０ｎｇのＣａｓ１３構築物、３００ｎｇのガイド発現プラスミド、及び１５ｎｇのノックダウンレポーター構築物を同時トランスフェクションし、ｓｈＲＮＡ条件については、３００ｎｇのｓｈＲＮＡ標的化プラスミド、１５ｎｇのノックダウンレポーター構築物、及び１５０ｎｇのＥＦ１－アルファ駆動ｍＣｈｅｒｒｙ（レポーター負荷のバランス調整するため）を同時トランスフェクションした。トランスフェクションの４８時間後、ＲＮＡを、ＲＮｅａｓｙ　Ｐｌｕｓ　Ｍｉｎｉ　ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて精製し、ｍＲＮＡを、ＮＥＢＮｅｘｔ　Ｐｏｌｙ（Ａ）ｍＲＮＡ　Ｍａｇｎｅｔｉｃ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｍｏｄｕｌｅ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用するために選択し、ＮＥＢＮｅｘｔ　Ｕｌｔｒａ　ＲＮＡ　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｋｉｔ　ｆｏｒ　Ｉｌｌｕｍｉｎａ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を用いてシークエンシングのために調製した。次いで、ＲＮＡシークエンシングライブラリを、ＮｅｘｔＳｅｑ（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）上で配列決定した。
【０９０９】
　トランスクリプトームワイドなシークエンシングデータを分析するために、読み取りデータを、デフォルトのパラメータを有するＢｏｗｔｉｅ及びＲＳＥＭバージョン１．２．３１を使用してＲｅｆＳｅｑ　ＧＲＣｈ３８アセンブリに整列した［引用ＲＳＥＭ：参照ゲノムの有無にかかわらずＲＮＡ－Ｓｅｑデータから正確な転写産物定量化］。転写産物の発現をｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）として定量化し、２．５超のｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）について遺伝子をフィルタリングした。示差的に発現される遺伝子の選択については、２超または０．７５未満の示差的変化を有する遺伝子のみを考慮した。示差的発現の統計的な有意性を、３つの標的化反復対非標的化反復においてＳｔｕｄｅｎｔのＴ検定で評価し、Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ－Ｈｏｃｈｂｅｒｇ手順によって０．０１％未満の誤発見率でフィルタリングした。
【０９１０】

哺乳動物細胞トランスフェクションにおけるＡＤＡＲ　ＲＮＡ編集
　哺乳動物細胞におけるＲＥＰＡＩＲ活性を評価するために、１５０ｎｇのＲＥＰＡＩＲベクター、３００ｎｇのガイド発現プラスミド、及び４０ｎｇのＲＮＡ編集レポーターをトランスフェクションした。４８時間後、細胞由来のＲＮＡを採取し、遺伝子特異的逆転写プライマーを用いる、前述の［引用ＪＪ］方法を使用して逆転写した。次いで、抽出したｃＤＮＡを２ラウンドのＰＣＲに供し、ＮＥＢＮｅｘｔ　Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　２Ｘ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘを使用してＩｌｌｕｍｉｎａアダプター及び試料バーコードを添加した。次いで、ライブラリを、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＮｅｘｔＳｅｑまたはＭｉＳｅｑ上で次世代シークエンシングに供した。次いで、シークエンシング窓内の全てのアデノシンでＲＮＡ編集率を評価した。
【０９１１】
　ルシフェラーゼレポーターがＲＮＡ編集のために標的化される実験では、ＲＮＡ採取の前に、分泌されたルシフェラーゼを含む培地も採取した。この場合では、矯正されたＣｌｕｃが低レベルであり得るため、培地を希釈しなかった。注入プロトコルを有するプレートリーダー（Ｂｉｏｔｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙ　Ｎｅｏ２）上で、ＢｉｏＬｕｘ　Ｃｙｐｒｉｄｉｎｉａ及びＢｉｏｌｕｘ　Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼアッセイキット（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。実行される全ての反復は生物学的反復である。
【０９１２】
ＰＦＳ結合哺乳動物スクリーニング
　ＰＦＳの編集効率への貢献度を決定するために、６２５ｎｇのＰＦＳ標的ライブラリ、４．７ｕｇのガイド、及び２．３５ｕｇのＲＥＰＡＩＲを、２２５ｃｍ２のフラスコ内に播種されたＨＥＫ２９３ＦＴ細胞上に同時トランスフェクションした。プラスミドを３３ｕｌのＰＬＵＳ試薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）と混合し、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭで５３３ｕｌにして、５分間インキュベートし、３０ｕｌのＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　２０００及び５００ｕｌのＯｐｔｉ－ＭＥＭと組み合わせて、さらに５分間インキュベートし、次いで、細胞上にピペットで分注した。トランスフェクションの４８時間後、ＲＮＡをＲＮｅａｓｙ　Ｐｌｕｓ　Ｍｉｎｉ　ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて採取し、遺伝子特異的プライマーを使用してｑＳｃｒｉｐｔ　Ｆｌｅｘ（Ｑｕａｎｔａｂｉｏ）で逆転写し、ＮＥＢＮｅｘｔ　Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　２Ｘ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して２ラウンドのＰＣＲで増幅して、Ｉｌｌｕｍｉｎａアダプター及びサンプルバーコードを添加した。ライブラリをＩｌｌｕｍｉｎａ　ＮｅｘｔＳｅｑ上で配列決定し、標的アデノシンでのＲＮＡ編集率をＰＦＳ同一性にマッピングした。適用範囲を増加するために、ＰＦＳを、計算的に４つのヌクレオチドに崩壊した。ＲＥＰＡＩＲ編集率を各ＰＦＳについて算出し、対応するＰＦＳの非標的化率を差し引いて、生物学的反復において平均した。
【０９１３】
ＡＤＡＲ編集特異性を評価するための全トランスクリプトームシークエンシング
　トランスクリプトーム全体のオフターゲットＲＮＡ編集部位を分析するために、ＲＮｅａｓｙ　Ｐｌｕｓ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐ　ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、トランスフェクションの４８時間後に細胞から全ＲＮＡを採取した。次いで、ｍＲＮＡ画分を、ＮＥＢＮｅｘｔ　Ｐｏｌｙ（Ａ）ｍＲＮＡ　Ｍａｇｎｅｔｉｃ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｍｏｄｕｌｅ（ＮＥＢ）を使用して富化し、次いで、このＲＮＡを、ＮＥＢＮｅｘｔ　Ｕｌｔｒａ　ＲＮＡ　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｋｉｔ　ｆｏｒ　Ｉｌｌｕｍｉｎａ（ＮＥＢ）を使用して配列決定のために調製する。次いで、ライブラリを、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＮｅｘｔＳｅｑ上で配列決定し、試料あたり少なくとも５００万個の読み取りデータがあるようにロードした。
【０９１４】
標的化されたかつトランスクリプトームワイドな実験についてのＲＮＡ編集分析
　トランスクリプトームワイドなＲＮＡ編集ＲＮＡシークエンシングデータを分析するた

めに、配列ファイルをランダムに５００万個の読み取りデータに対してダウンサンプリングした。指標を、Ｇｌｕｃ及びＣｌｕｃ配列を添加したＲｅｆＳｅｑ　ＧＲＣｈ３８アセンブリを使用して生成し、読み取りデータを整列させ、Ｂｏｗｔｉｅ／ＲＳＥＭバージョン１．３．０を使用して定量化した。次いで、アラインメントＢＡＭを選別し、ＲＥＤｉｔｏｏｌｓ［引用］を使用して、ＲＮＡ編集部位について以下のパラメータで分析した：－ｔ　８　－ｅ　－ｄ　－ｌ　－Ｕ［ＡＧまたはＴＣ］－ｐ　－ｕ　－ｍ２０　－Ｔ６－０　－Ｗ　－ｖ　１　－ｎ　０．０。未トランスフェクションまたはＥＧＦＰトランスフェクション条件で見つかった任意の有意な編集は、トランスフェクションのＳＮＰまたは人工物であると見なされ、オフターゲットの分析から除外された。オフターゲットは、Ｆｉｓｈｅｒの正確な試験が０．５未満のｐ値を得、３つの生物学的反復のうち少なくとも２つが編集部位を特定した場合に有意であると見なされた。

【０９１５】

各オフターゲットの予測されるバリアント効果を分析するために、オフターゲット編集部位のリストを、ＳＩＦＴ及びＰｏｌｙＰｈｅｎ－２アノテーションを使用するツールのＵＣＳＣゲノムブラウザスイートの一部として、バリアントアノテーションインテグレーター（ｈｔｔｐｓ：／／ｇｅｎｏｍｅ．ｕｃｓｃ．ｅｄｕ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ｈｇＶａｉ）を使用して分析した。オフターゲット遺伝子が発がん性であるかどうかを断言するには、がんにおける体細胞変異のＣＯＳＭＩＣカタログからの発がん性アノテーションのデータベース（ｃａｎｃｅｒ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ）。

【０９１６】

ＲＥＰＡＩＲ構築物がＲＮＡレベルを撹乱したかどうかを分析するために、ＲＳＥＭ分析から出力された１００万あたりの転写産物（ＴＰＭ）値を発現カウントに使用して、ｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）を取ることによって対数空間に変換した。示差的に調節される遺伝子を発見するために、Ｓｔｕｄｅｎｔのｔ検定を、３つの標的化ガイド反復対３つの非標的ガイド化反復において実施した。統計的分析を、２．５超のｌｏｇ２（ＴＰＭ＋１）値を有する遺伝子においてのみ実施し、遺伝子を、それらが２倍超または０．８倍未満の変化を有した場合のみ、示差的に調節されたと見なした。遺伝子を、０．０１未満の誤発見率を有する場合に報告した。

【０９１７】

結果

哺乳動物細胞におけるＣａｓ１３ファミリーメンバーの包括的な特徴付け

出願者は、哺乳動物ノックダウン用途のためにＬｗａＣａｓ１３ａを以前開発したが、効率的なノックダウンにはｍｓｆＧＦＰ安定化ドメインを必要とし、特異性は高かったものの、ノックダウン効率は一貫して５０％未満ではなかった（１５）。哺乳動物細胞におけるＲＮＡノックダウン活性を評価するために、遺伝的に多様な集合のＣａｓ１３ファミリーメンバーを特徴付けることによって、より頑健なＲＮＡ標的化ＣＲＩＳＰＲシステムを特定しようと試みた（図４９Ａ）。２１個のＣａｓ１３ａ、１５個のＣａｓ１３ｂ、及び７個のＣａｓ１３ｃ哺乳動物コドン最適化オーソログ（表６）を、Ｎ末端及びＣ末端核外輸送シグナル（ＮＥＳ）配列及びＣ末端ｍｓｆＧＦＰを有する発現ベクターにクローニングして、タンパク質安定性を増強した。哺乳動物細胞における干渉をアッセイするために、直交のＧａｕｓｓｉａ（Ｇｌｕｃ）及びＣｙｐｒｉｄｉｎｉａ（Ｃｌｕｃ）ルシフェラーゼを別個のプロモーターの下で発現する二重レポーター構築物を設計し、一方のルシフェラーゼがＣａｓ１３干渉活性の尺度として機能し、他方が内部制御として機能することを可能にした。各オーソログについて、アンピシリン干渉アッセイに由来するＣａｓ１３ｂ　ＰＦＳモチーフ（図５５Ａ～５５Ｃ、表７、付記１）、及びＣａｓ１３ａ活性の以前の報告からの３’Ｈ　ＰＦＳ（１０）を使用して、ＰＦＳ適合性ガイドＲＮＡを設計した。

【０９１８】

ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞を、Ｃａｓ１３発現、ガイドＲＮＡ、及びレポータープラスミドでトランスフェクションし、４８時間後に標的化されたＧｌｕｃのレベルを定量化した。

各Ｃａｓ１３オーソログにつき２つのガイドＲＮＡを試験したことにより、最近特徴付けられたＬｗａＣａｓ１３ａと比較して、両方のガイドＲＮＡにわたって同様または増加した干渉を有する５つのＣａｓ１３ｂオーソログを含む、活性レベルの範囲が明らかになった（図４９Ｂ）。これら５つのＣａｓ１３ｂオーソログ、ならびに上位２つのＣａｓ１３ａオーソログを、さらなる操作のために選択した。

【０９１９】

次に、頑健な活性のために安定化ドメインを必要としないオーソログを選択するために、ｍｓｆＧＦＰを含まないＧｌｕｃのＣａｓ１３媒介性ノックダウンについて試験した。出願者は、ｍｓｆＧＦＰに加えて、Ｃａｓ１３活性が、ＬｗａＣａｓ１３ａ（１５）の最適化について以前に報告されたように、サブ細胞局在化によって影響を受ける可能性があると仮定した。したがって、ｍｓｆＧＦＰを含まない６つの異なる局在化タグのうちの１つにＣ末端融合した、７つの選択されたＣａｓ１３オーソログの干渉活性を試験した。ルシフェラーゼレポーターアッセイを使用して、ＨＩＶ　Ｒｅｖ遺伝子ＮＥＳにＣ末端融合したＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＰｇｕＣａｓ１３ｂ、ならびにＭＡＰＫ　ＮＥＳにＣ末端融合したＲａｎＣａｓ１３ｂが、最高レベルの干渉活性を有することを見出した（図５６Ａ）。上位オーソログの活性レベルをさらに区別するために、３つの最適化されたＣａｓ１３ｂ構築物を、位置合わせされたガイドを使用して、ＫＲＡＳ転写産物をノックダウンするそれらの能力について、最適なＬｗａＣａｓ１３ａ－ｍｓｆＧＦＰ融合及びｓｈＲＮＡと比較した（図５６Ｂ）。ＰｓｐＣａｓ１３ｂについて最高レベルの干渉（平均ノックダウン６２．９％）を観察し、したがって、ＬｗａＣａｓ１３ａとのさらなる比較のためにこれを選択した。

【０９２０】

ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａの活性レベルをより厳密に定義するために、位置合わせされたガイドをＧｌｕｃ及びＣｌｕｃの両方に沿ってタイリングするよう設計し、それらの活性を当社のルシフェラーゼレポーターアッセイを使用してアッセイした。Ｇｌｕｃ及びＣｌｕｃをそれぞれ標的化する、９３及び２０の位置合わせされたガイドを試験し、ＰｓｐＣａｓ１３ｂは、ＬｗａＣａｓ１３ａと比べて、ノックダウンのレベルが一貫して増加したことを見出した（平均で、ＰｓｐＣａｓ１３ｂの９２．３％対ＬｗａＣａｓ１３ａの４０．１％のノックダウン）（図４９Ｃ、４９Ｄ）。

【０９２１】

Ｃａｓ１３哺乳動物干渉活性の特異性

ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａの干渉特異性を特徴付けるために、標的配列全体及び３つの隣接する５’及び３’塩基対全体にわたって単一ミスマッチ及び二重ミスマッチを含有するルシフェラーゼ標的のプラスミドライブラリを設計した（図５６Ｃ）。ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞を、ＬｗａＣａｓ１３ａまたはＰｓｐＣａｓ１３ｂのいずれか、非修飾標的配列を標的化する固定ガイドＲＮＡ、及び適切なシステムに対応するミスマッチした標的ライブラリを用いてトランスフェクトした。次いで、切断されていない転写産物の標的化されたＲＮＡシークエンシングを実施して、ミスマッチした標的配列の枯渇を定量化した。ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂが、単一ミスマッチに対して比較的耐性が低く、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ標的については塩基対１２～２６、ＬｗａＣａｓ１３ａ標的については１３～２４から延在する、中央領域を有することを見出した（図５６Ｄ）。二重ミスマッチは、単一変異よりさらに耐性が低く、それぞれの標的において、ＰｓｐＣａｓ１３ｂについては塩基対１２～２９、ＬｗａＣａｓ１３ａについては８～２７から延在する、より大きな窓にわたってほとんどノックダウン活性が観察されなかった（図５６Ｅ）。加えて、標的配列の５’及び３’末端に隣接する３つのヌクレオチドに含まれるミスマッチが存在するため、Ｃａｓ１３ノックダウン活性におけるＰＦＳ制約を評価することができる。シークエンシングは、ほぼ全てのＰＦＳの組み合わせが頑健なノックダウンを可能にしたことを示し、哺乳動物細胞における干渉に対するＰＦＳ制約が、試験されたいずれの酵素についても存在しない可能性が高いことを示唆した。これらの結果は、Ｃａｓ１３ａ及びＣａｓ１３ｂが、ミスマッチに対して同様の配列制約及び感度を示す

ことを示唆する。

【０９２２】

次に、トランスクリプトームのｍＲＮＡ画分にわたって、ＰｓｐＣａｓ１３ｂ及びＬｗａＣａｓ１３ａの干渉特異性を特徴付けた。トランスクリプトームワイドなｍＲＮＡシークエンシングを実施して、有意に示差的に発現される遺伝子を検出した。ＬｗａＣａｓ１３ａ及びＰｓｐＣａｓ１３ｂは、Ｇｌｕｃの頑健なノックダウンを実証し（図４９Ｅ、４９Ｆ）、数百個のオフターゲットを示した位置合わせされたｓｈＲＮＡと比較して、高度に特異的であった（図４９Ｇ）。

【０９２３】

標的化されたＲＮＡ編集を可能にするＣａｓ１３－ＡＤＡＲ融合

ＰｓｐＣａｓ１３ｂが哺乳動物細胞におけるｍＲＮＡの一貫した、頑健な、特異的なノックダウンを達成したことから、プログラム可能なＲＮＡ編集のためのＡＤＡＲ（ＡＤＡＲ$_{DD}$）のデアミナーゼドメインを動員するために、ＲＮＡ結合プラットフォームとして適応することができると想定した。ヌクレアーゼ活性を欠くＰｓｐＣａｓ１３ｂ（ｄＰｓｐＣａｓ１３ｂ、ここからｄＣａｓ１３ｂと称される）を操作するために、ＨＥＰＮドメイン内の保存された触媒残基を変異させ、ルシフェラーゼＲＮＡノックダウン活性の損失を観察した（図５７Ａ）。ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ$_{DD}$融合は、ガイドＲＮＡによって動員されてアデノシンを標的化することができ、ハイブリダイズされたＲＮＡは、ＡＤＡＲ活性に必要とされる二本鎖基質を作成することができると仮定した（図５０Ａ）。標的アデノシン脱アミノ化速度を向上させるために、当社の初期ＲＮＡ編集設計に２つの追加の修正を導入した。すなわち、脱アミノ化頻度を増加させると以前報告されている標的アデノシンと反対側のミスマッチしたシチジンを導入し、ｄＣａｓ１３ｂを、超活性化変異を含有するヒトＡＤＡＲ１またはＡＤＡＲ２のデアミナーゼドメインと融合して、触媒活性を向上させた（ＡＤＡＲ１$_{DD}$（Ｅ１００８Ｑ）（２５）またはＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）（１９））。

【０９２４】

ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ$_{DD}$の活性を試験するために、ナンセンス変異（Ｗ８５Ｘ（ＵＧＧ－＞ＵＡＧ））を導入することによってＣｌｕｃ上にＲＮＡ編集レポーターを生成し、ＡからＩへの編集によって野生型コドンに機能的に修復することができ（図５０Ｂ）、次いでＣｌｕｃ発光の回復として検出した。ガイドを、標的アデノシン全体に３０、５０、７０、または８４ヌクレオチド長で、スペーサーを用いて均等にタイリングし、最適ガイド配置及び設計を決定した（図５０Ｃ）。ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ１$_{DD}$は、Ｃｌｕｃレポーターを修復するためにより長いガイドを必要とし、一方ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$は、試験された全てのガイド長で機能することを見出した（図５０Ｃ）。野生型ＡＤＡＲ２$_{DD}$を用いたルシフェラーゼ回復が低減されると、超活性型Ｅ４８８Ｑ変異が編集効率を改善することも見出した（図５７Ｂ）。この活性の論証から、さらなる特徴付けのためにｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）を選択し、この手法を、プログラム可能なＡからＩへの置換のためのＲＮＡ編集バージョン１（ＲＥＰＡＩＲｖ１）と指定した。

【０９２５】

ルシフェラーゼ活性の回復が真正の編集事象に起因することを検証するために、ＲＥＰＡＩＲｖ１に供するＣｌｕｃ転写産物の編集を、逆転写及び標的化された次世代シークエンシングを介して直接測定した。標的部位の周囲の３０及び５０ｎｔのスペーサーを試験して、両方のガイド長が予想されるＡからＩへの編集をもたらし、５０ｎｔのスペーサーがより高い編集パーセンテージを達成したことを見出した（図５０Ｄ、５０Ｅ、図５７Ｃ）。また、５０ｎｔのスペンサーが、二本鎖ＲＮＡの領域の増加に起因する可能性が高い、非標的アデノシンで編集する傾向が増加したことも観察した（図５０Ｅ、図５７Ｃ）。

【０９２６】

次に、内因性遺伝子ＰＰＩＢを標的化した。ＰＰＩＢをタイリングする５０ｎｔのスペーサーを設計し、ＰＰＩＢ転写産物を最大２８％の編集効率で編集できることを見出した

（図５７Ｄ）。ＲＥＰＡＩＲがさらに最適化されるかどうかを試験するために、ｄＣａｓ１３ｂとＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）との間のリンカーを修飾し（図５７Ｅ、表８）、リンカー選択が適度にルシフェラーゼ活性回復に影響を与えることを見出した。

【０９２７】

ＲＮＡ編集のための配列パラメータの定義

試験部位で正確なＲＮＡ編集を達成することができたため、トランスクリプトームにおける任意のＲＮＡ標的に対してシステムをプログラミングするための配列制約を特徴付けたいと考えた。配列制約は、ＰＦＳなどのｄＣａｓ１３ｂ標的化制限から、またはＡＤＡＲ配列嗜好性から生じ得る（２６）。ＲＥＰＡＩＲｖ１に対するＰＦＳ制約を調査するために、Ｃｌｕｃ転写産物上の標的部位の５’末端に一連の４つのランダム化ヌクレオチドを担持するプラスミドライブラリを設計した（図５１Ａ）。ＵＡＧまたはＡＡＣモチーフのいずれか内の中心アデノシンを標的化し、両方のモチーフについて、全てのＰＦＳが検出可能なレベルのＲＮＡ編集を実証し、その大部分のＰＦＳが標的部位で５０％超の編集を有することを見出した（図５１Ｂ）。次に、ＲＥＰＡＩＲｖ１中のＡＤＡＲ２$_{DD}$が、ＡＤＡＲ２$_{DD}$について以前報告されているように、標的化された塩基に直接隣接する任意の配列制約を有するかどうかを判定しようと試みた（２６）。標的アデノシンを直接取り囲む５’及び３’の隣接するヌクレオチドのあらゆる可能性のある組み合わせを試験し（図５１Ｃ）、ＲＥＰＡＩＲｖ１が全てのモチーフを編集することができることを見出した（図５１Ｄ）。最後に、スペーサー配列内の標的Ａの反対の塩基の同一性が編集効率に影響を及ぼしたかどうかを分析し、Ａ－Ｃミスマッチが最高のルシフェラーゼ回復を有し、Ａ－Ｇ、Ａ－Ｕ、及びＡ－ＡがＲＥＰＡＩＲｖ１活性を劇的に低減したことを見出した（図５７Ｆ）。

【０９２８】

ＲＥＰＡＩＲｖ１を使用する疾患関連ヒト変異の矯正

哺乳動物細胞におけるＲＮＡ編集について、ＲＥＰＡＩＲｖ１の広範な適用性を実証するために、２つの疾患関連変異に対するＲＥＰＡＩＲｖ１ガイドを設計した：Ｘ連鎖性腎性尿崩症における８７８Ｇ＞Ａ（ＡＶＰＲ２　Ｗ２９３Ｘ）、及びＦａｎｃｏｎｉ貧血における１５１７Ｇ＞Ａ（ＦＡＮＣＣ　Ｗ５０６Ｘ）。これらの変異を保有する遺伝子のｃＤＮＡの発現構築物を、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞にトランスフェクションし、ＲＥＰＡＩＲｖ１が変異を矯正できるかどうかを試験した。５０ｎｔのスペーサーを含有するガイドＲＮＡを使用して、ＡＶＰＲ２の３５％の矯正及びＦＡＮＣＣの２３％の矯正を達成することができた（図５２Ａ～５２Ｄ）。次いで、ＲＥＰＡＩＲｖ１の３４の異なる疾患関連Ｇ＞Ａ変異を矯正する能力を試験し（表９）、３３の部位で最大２８％の編集効率で有意な編集を達成できることを見出した（図５２Ｅ）。選択した変異は、ＣｌｉｎＶａｒデータベース中の病原性のＧからＡへの変異（５，７３９）のほんの一部分にすぎず、これはさらに１１，９４３のＧからＡへのバリアント（図５２Ｆ及び図５８）も含む。配列制約がないため、ＲＥＰＡＩＲｖ１は、特に標的モチーフに関係なく有意な編集を観察したことを考慮すると、これらの疾患関連変異を全て潜在的に編集することができる（図５１Ｃ及び図５２Ｇ）。

【０９２９】

ＲＥＰＡＩＲｖ１系を疾患細胞に送達することは、治療的使用の前提条件であり、したがって、アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）ベクターなどの治療に関連するウイルスベクターにパッケージ化することができるＲＥＰＡＩＲｖ１構築物の設計を模索した。ＡＡＶベクターは、プロモーター及び発現調節エレメントと共に、ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ$_{DD}$（４４７３ｂｐ）の大型サイズには対応できない４．７ｋｂのパッケージ限界を有する。サイズを低減するために、ＲＮＡ編集活性について、ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ）に融合したｄＣａｓ１３の様々なＮ末端及びＣ末端切断を試験した。試験された全てのＣ末端切断は、まだ機能しており、かつルシフェラーゼシグナルを回復することができ（図５９）、最大の切断部であるＣ末端Δ９８４－１０９０（融合タンパク質の総合サイズ４，１５２ｂｐ）は、ＡＡＶベクターのパッケージ限界内に収まるのに十分小さいことを見出した

。
【０９３０】
ＲＥＰＡＩＲｖ１のトランスクリプトームワイドな特異性
ＰｓｐＣａｓ１３ｂによるＲＮＡノックダウンは高度に特異的であったが、当社のルシフェラーゼタイリング実験では、ガイド：標的二本鎖内のオフターゲットアデノシン編集を観察した（図５０Ｅ）。これが広範な現象であるかどうかを確認するために、内因性転写産物ＫＲＡＳをタイリングし、標的アデノシン付近のオフターゲット編集の程度を測定した（図５３Ａ）。ＫＲＡＳについては、オンターゲット編集率が２３％である一方、標的部位の周囲に、同様に検出可能なＡからＧへの編集を有する多数の部位があることを見出した（図５３Ｂ）。
【０９３１】
ガイド：標的二本鎖内でオフターゲット編集が観察されたため、全てのｍＲＮＡ上でＲＮＡシークエンシングを実施することによって、可能性のあるトランスクリプトームオフターゲット全てを評価した。ＲＮＡシークエンシングは、有意な数のＡからＧへのオフターゲット事象が存在し、標的化条件下では１，７３２個のオフターゲット、非標的化条件下では９２５個のオフターゲットが存在し、８２８個のオフターゲットが重複していることを明らかにした（図５３Ｃ、５３Ｄ）。トランスクリプトーム全体の全ての編集サイトのうち、オンターゲット編集部位が最高の編集率を有し、８９％のＡからＧへの変換を有した。
【０９３２】
Ｃａｓ１３標的化の高特異性を考慮して、オフターゲットはＡＤＡＲから生じ得ると推論した。２つのＲＮＡ誘導ＡＤＡＲシステムが以前説明されている（図６０Ａ）。第１のシステムは、ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$の、ＢｏｘＢ－
ＲＮＡヘアピンに結合する小ウイルスタンパク質ラムダＮ（
Ｎ）との融合を利用する（２２）。二重ＢｏｘＢ－
ヘアピンを有するガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡにコードされた部位を編集するようにＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$を誘導する（２３）。第２の設計は、全長ＡＤＡＲ２（ＡＤＡＲ２）と、ＡＤＡＲ２の二本鎖ＲＮＡ結合ドメイン（ｄｓＲＢＤ）が認識するヘアピンを有するガイドＲＮＡとを利用する（２１、２４）。ＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して、これら２つのシステムの編集効率を分析し、ＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ２及びＡＤＡＲ２システムが、ＲＥＰＡＩＲｖ１によって達成された８９％の編集率と比較して、それぞれ６３％及び３６％の編集率を実証したことを見出した（図６０Ｂ～６０Ｅ）。加えて、ＢｏｘＢシステム及びＡＤＡＲ２システムは、ＲＥＰＡＩＲｖ１標的化ガイド条件における１，２２９個のオフターゲットと比較して、標的化ガイド条件において、それぞれ２０１８個及び１７４個の観察されたオフターゲットを作成した。特筆すべきことに、２つのＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$ベースのシステム（ＲＥＰＡＩＲｖ１及びＢｏｘＢ）を有する全ての条件は、それらのオフターゲットにおける高い割合の重複を示し、一方、ＡＤＡＲ２システムは、大きく異なるオフターゲットのセットを有した（図６０Ｆ）。標的化条件と非標的化条件との間、及びＲＥＰＡＩＲｖ１とＢｏｘＢ条件との間の、オフターゲットにおける重複は、ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$がｄＣａｓ１３標的化から独立してオフターゲットを駆動したことを示唆している（図６０Ｆ）
。
【０９３３】
合理的なタンパク質操作によるＲＥＰＡＩＲｖ１の特異性の向上
ＲＥＰＡＩＲの特異性を向上させるために、ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）の構造誘導タンパク質操作を採用した。オフターゲットのガイド依存性のため、ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）－ＲＮＡ結合を不安定にすることは、選択的にオフターゲット編集を減少させるが、ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）のｄＣａｓ１３ｂテザリングからターゲット部位への局所濃度の増加によるオンターゲット編集を維持するであろうと仮定した。ＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）バックグラウンド上で標的ＲＮＡの二本鎖領域（図５４Ａ）（１８）に接触させることを以前決定したＡＤＡＲ２$_{ＤＤ}$（Ｅ４８８Ｑ）残基を変異誘発した。効

率及び特異性を評価するために、検出された非標的条件におけるバックグラウンドルシフェラーゼ回復がより広範なオフターゲット活性を示すであろうという仮説の下で、標的化及び非標的化ガイドの両方を用いて１７個の単一変異体を試験した。選択された残基での変異が、標的化及び非標的化ガイドのルシフェラーゼ活性に有意な効果を有することを見出した（図５４Ａ、５４Ｂ、図６１Ａ）。変異体の大部分は、標的化ガイドのルシフェラーゼ活性を有意に改善したか、または標的化対非標的化ガイド活性の比率を増加させたかのいずれかであり、これを特異性スコアと称した（図５４Ａ、５４Ｂ）。次世代シークエンシングによってプロファイリングされるトランスクリプトームワイドな特異性について、これらの変異体のサブセットを選択した（図５４Ｂ）。予想したとおり、トランスクリプトームワイドなシークエンシングから測定されたオフターゲットは、変異体についての当社の特異性スコア（図６１Ｂ）と相関した。ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ／Ｒ４５５Ｅ）を除いて、配列決定されたＲＥＰＡＩＲｖ１変異体は全て、レポーター転写産物を効果的に編集することができ（図５４Ｃ）、多くの変異体は、オフターゲットの数の減少を示すことを見出した（図６１Ｃ、６２）。特異性変異体のオフターゲットの周囲のモチーフをさらに探求し、ＲＥＰＡＩＲｖ１及びほとんどの操作された変異体が、特徴付けられたＡＤＡＲ２モチーフと一致して、それらの編集に対して強い３’Ｇの嗜好性を示したことを見出した（図６３Ａ）（２６）。４つの変異体の最も高い編集パーセントと、最も少ない数のトランスクリプトームワイドなオフターゲットを有したため、変異体ＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ／Ｔ３７５Ｇ）を将来の実験のために選択し、ＲＥＰＡＩＲｖ２と称した。ＲＥＰＡＩＲｖ１と比較して、ＲＥＰＡＩＲｖ２は特異性の増加を示し、１７３２から１０個のトランスクリプトームオフターゲットを減少した（図５４Ｄ）。Ｃｌｕｃにおける標的化アデノシンを取り囲む領域では、ＲＥＰＡＩＲｖ２は、配列決定トレースにおいて明らかである、オフターゲット編集を減少させた（図５４Ｅ）。次世代シークエンシングに由来するモチーフでは、ＲＥＰＡＩＲｖ１は３’Ｇに対して強い嗜好性を示したが、全てのモチーフに対してオフターゲット編集を示し（図６３Ｂ）、対照的に、ＲＥＰＡＩＲｖ２は、最強のオフターゲットモチーフのみを編集した（図６３Ｃ）。転写産物上の編集の分布は大きく偏っており、高度に編集された遺伝子が６０超の編集をする（図６４Ａ、６４Ｂ）一方で、ＲＥＰＡＩＲｖ２は１つの転写産物（ＥＥＦ１Ａ１）のみを複数回編集した（図６４Ｄ～６４Ｆ）。ＲＥＰＡＩＲｖ１オフターゲット編集は、９３個の発がん性事象（図６４Ｄ）を伴う１０００個のミスセンス変異（図６４Ｃ）を含む、多数のバリアントをもたらすと予測された。対照的に、ＲＥＰＡＩＲｖ２は６つのミスセンス変異のみ有し（図６４Ｅ）、そのいずれも発がん性の結果を有しなかった（図６４Ｆ）。予測されるオフターゲット効果におけるこの低減は、ＲＥＰＡＩＲｖ２を他のＲＮＡ編集手法と区別する。異なる用量のガイドＲＮＡを用いる実験は、用量応答がオフターゲット活性を低下させる得ることを示唆している（図６８）。

【０９３４】

ＲＥＰＡＩＲｖ２を内因性遺伝子に標的化し、特異性増強化変異が高効率なオンターゲット編集を維持しながら標的転写産物における近くの編集を減少させたかどうかを試験した。ＫＲＡＳまたはＰＰＩＢのいずれかを標的化するガイドについて、ＲＥＰＡＩＲｖ２は、ＲＥＰＡＩＲｖ１とは異なり、検出可能なオフターゲット編集を有しておらず、それぞれ２７．１％及び１３％でオンターゲットアデノシンを効果的に編集することができることを見出した（図５４Ｆ、５４Ｇ）。この特異性は、他のＫＲＡＳまたはＰＰＩＢ標的部位などの、ＲＥＰＡＩＲｖ１の非標的化条件下で高レベルのバックグラウンドを実証する領域を含む、追加の標的部位に拡大した（図６５Ａ～６５Ｃ）。総合的に、ＲＥＰＡＩＲｖ２は、編集されたアデノシン周辺の二本鎖領域におけるオフターゲットを排除し、劇的に増強したトランスクリプトームワイドな特異性を示した。

【０９３５】

結論

ここで、ＲＮＡ誘導ＲＮＡ標的化ＶＩ－Ｂ型エフェクターＣａｓ１３ｂは、高効率かつ特異的なＲＮＡノックダウンが可能であり、必須遺伝子及び非コード化ＲＮＡを調査する

ための、ならびにトランスクリプトームなレベルでの細胞プロセスを制御するための、改良されたツールの基盤を提供することを示している。触媒的に不活性なＣａｓ１３ｂ（ｄＣａｓ１３ｂ）は、プログラム可能なＲＮＡ結合能力を保持しており、ここでｄＣａｓ１３ｂをアデノシンデアミナーゼＡＤＡＲ２に融合することによって、正確なＡからＩへの編集を達成した。このシステムを、ＲＥＰＡＩＲｖ１（プログラム可能なＡからＩへの置換のためのＲＮＡ編集バージョン１）と呼ぶ。システムのさらなる操作は、特異性が劇的に改善された現在の編集プラットフォームと比較して同等または増加した活性を有する方法であるＲＥＰＡＩＲｖ２を生成した。

【０９３６】

Ｃａｓ１３ｂは高い忠実度を示すが、ｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲ２$_{DD}$融合による当初の結果は、何千ものオフターゲットを明らかにした。これに対処するために、ＲＮＡ二本鎖に接触するＡＤＡＲ２$_{DD}$残基を変化させるための合理的変異誘発戦略を採用し、ｄＣａｓ１３ｂに融合したときに正確、効率的、かつ高度に特異的な編集が可能なバリアントであるＡＤＡＲ２$_{DD}$（Ｅ４８８Ｑ／Ｔ３７５Ｇ）を特定した。このバリアントでの編集効率は、２つの現在利用可能なシステムであるＢｏｘＢ－ＡＤＡＲ$_{DD}$またはＡＤＡＲ２編集によって達成される編集効率と同等であるか、またはそれより良好であった。さらに、ＲＥＰＡＩＲｖ２システムは、トランスクリプトーム全体においてわずか１０個の観察可能なオフターゲットを作成し、少なくとも両方の代替編集技術よりも良好な規模であった。

【０９３７】

ＲＥＰＡＩＲシステムは、他の核酸編集ツールと比較して多くの利点を提供する。第一に、正確な標的部位は、所望のアデノシンの向こう側のガイド拡張部内にシチジンを配置して、ＡＤＡＲ編集活性に理想的な好ましいＡ－Ｃミスマッチを作成することによって、ガイド内にコードされ得る。第二に、Ｃａｓ１３は、ＰＦＳまたはＰＡＭなどの標的化配列制約を有さず、標的アデノシンを取り囲むモチーフ嗜好性もなく、トランスクリプトーム中の任意のアデノシンがＲＥＰＡＩＲシステムで潜在的に標的化されることを可能にする。しかしながら、ＤＮＡ塩基エディタは、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれかを標的化することができ、一方、ＲＥＰＡＩＲシステムは転写配列に限定され、それによって標的化できる可能性のある編集部位の総数を制約することに留意する。しかしながら、ＲＥＰＡＩＲを用いる標的化のより柔軟な性質のため、このシステムは、Ｃａｓ９－ＤＮＡ塩基エディタよりもＣｌｉｎＶａｒ（図５２Ｃ）内でより多くの編集に影響を与えることができる。第三に、ＲＥＰＡＩＲシステムは標的アデノシンをイノシンに直接脱アミンし、所望の編集成果を生成するために、塩基切除またはミスマッチ修復などの内因性修復経路に依存しない。したがって、他の編集形態に対応できない非分割細胞において、ＲＥＰＡＩＲが可能であるべきである。第四に、ＲＮＡ編集は一過性であり得、編集成果に対する時間的制御の可能性を可能にする。この性質は、局所的な炎症などの細胞状態の一時的な変化によって引き起こされる疾患の治療に有用である可能性が高い。

【０９３８】

ＲＥＰＡＩＲシステムは、さらなる操作のための複数の機会を提供する。Ｃａｓ１３ｂはｃｒＲＮＡ前処理活性（１３）を有し、複数のバリアントの多重編集を可能にし、これだけでは疾患リスクは変化しないが、一緒になって付加効果及び疾患修飾可能性を有し得る。有望な変異を組み合わせるなどの、当社の合理的な設計手法の拡張は、システムの特異性及び効率性をさらに高めることができ、一方、公平なスクリーニング手法は、ＲＥＰＡＩＲ活性及び特異性を改善するための追加の残基を特定することができる。

【０９３９】

現在、ＲＥＰＡＩＲによって達成可能な塩基変換は、アデノシンからイノシンを生成することに限定され、ｄＣａｓ１３のＡＰＯＢＥＣなどの他の触媒ＲＮＡ編集ドメインとのさらなる融合は、シチジンに尿路編集を可能にさせることができる。加えて、ＡＤＡＲの変異誘発は、シチジンを標的化するために基質の嗜好性を緩和することができ、二本鎖ＲＮＡ基質要件によって付与される特異性の向上が、ＣからＵへのエディタによって利用さ

れることを可能にする。ＤＮＡ基質上のアデノシンからイノシンへの編集は、ＤＮＡ－ＲＮＡヘテロ二本鎖標的の形成（２７）またはＡＤＡＲドメインの変異誘発のいずれかを通じて、ｄＣａｓ９またはｄＣｐｆ１などの触媒的に不活性なＤＮＡ標的化ＣＲＩＳＰＲエフェクターを用いても可能であり得る。

【０９４０】

ＡからＩ（ＡからＧ）への編集が疾患の進行を逆行または遅延させることができる、様々な治療適応にＲＥＰＡＩＲを適用することができる（図６６Ａ～６６Ｇ）。第一に、疾患関連組織において原因となるメンデルのＧからＡへの変異を標的化するためのＲＥＰＡＩＲの発現を使用して、有害な変異を復帰させ、疾患を治療することができる。例えば、脳組織におけるＡＡＶを介した安定したＲＥＰＡＩＲ発現を使用して、焦点性てんかんを引き起こすＧＲＩＮ２Ａミスセンス変異ｃ．２１９１Ｇ＞Ａ（Ａｓｐ７３１Ａｓｎ）（２８）、または早期発症アルツハイマー病を引き起こすＡＰＰミスセンス変異ｃ．２１４９Ｇ＞Ａ（Ｖａｌ７１７Ｉｌｅ）（２９）を矯正することができる。第二に、ＲＥＰＡＩＲを使用して、疾患関連シグナル形質導入に関与するタンパク質の機能を修飾することによって疾患を治療することができる。例えば、ＲＥＰＡＩＲ編集は、キナーゼの標的であるいくつかのセリン、トレオニン、及びチロシン残基の再コードを可能にする（図６６Ａ～６６Ｇ）。疾患関連タンパク質におけるこれらの残基のリン酸化は、アルツハイマー病及び多発性神経変性疾患を含む多くの障害の疾患進行に影響を及ぼす（３０）。第三に、ＲＥＰＡＩＲを使用して、発現されたリスク修飾ＧからＡへのバリアントの配列を変更して、患者の疾患状態に入る確率を先制的に減少させることができる。最も興味深いケースは、「保護性」のリスク修飾対立遺伝子で、疾患状態に入る確率が劇的に減少し、場合によってはさらなる健康効果をもたらす。例えば、ＲＥＰＡＩＲを使用して、それぞれ心臓血管疾患及び乾癬性関節炎から保護するＰＣＳＫ９及びＩＦＩＨ１のＡからＧへの対立遺伝子を機能的に模倣することができる（３１）。最後に、ＲＥＰＡＩＲを使用して、エキソン調節療法のためのスプライス受容体及びドナー部位を治療的に修飾することができる。ＲＥＰＡＩＲは、それぞれコンセンサス５’スプライスドナーまたは３’スプライス受容体部位の機能的等価物であるＡＵからＩＵへ、またはＡＡからＡＩへの変更を行って、新しいスプライス接合部を作成することができる。加えて、ＲＥＰＡＩＲ編集は、コンセンサス３’スプライス受容体部位をＡＧからＩＧに変異させて、ＤＭＤの治療に対して著しい関心を受けている治療戦略である隣接する下流エキソンのスキップを促進することができる。スプライス部位の調節は、脊髄筋萎縮の治療のためのＳＭＮ２スプライシングの調節など、アンチセンスオリゴがある程度成功した疾患において広範な用途を有し得る（３２）。

【０９４１】

ＲＮＡノックダウン及びＲＮＡ編集ツールの両方としてのＰｓｐＣａｓ１３ｂ酵素の使用を実証している。プログラム可能なＲＮＡ結合のためのｄＣａｓ１３ｂプラットフォームは、生きた転写産物の撮像、スプライシング修飾、標的化された転写産物の局在化、ＲＮＡ結合タンパク質のプルダウン、及びエピトランスクリプトーム修飾を含む、多くの用途を有する。ここで、ｄＣａｓ１３を使用してＲＥＰＡＩＲを作成し、既存の核酸編集技術のスイートに添加した。ＲＥＰＡＩＲは、遺伝子疾患の治療または保護対立遺伝子の模倣のための新しい手法を提供し、遺伝子機能を修飾するための有用なツールとしてＲＮＡ編集を確立する。

【表６】

表６　本研究において使用されるＣａｓ１３オーソログ

Ｃａｓ１３　ＩＤ	Ｃａｓ１３略記	宿主生物	タンパク質アクセッション
Ｃａｓ１３ａ１	ＬｓｈＣａｓ１３ａ	Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｓｈａｈｉｉ	ＷＰ＿０１８４５１５９５．１
Ｃａｓ１３ａ２	ＬｗａＣａｓ１３ａ	Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉ（Ｌｗ２）	ＷＰ＿０２１７４６７７４．１
Ｃａｓ１３ａ３	ＬｓｅＣａｓ１３ａ	Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｓｅｅｌｉｇｅｒｉ	ＷＰ＿０１２９８５４７７．１
Ｃａｓ１３ａ４	ＬｂｍＣａｓ１３ａ	Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＭＡ２０２０	ＷＰ＿０４４９２１１８８．１
Ｃａｓ１３ａ５	ＬｂｎＣａｓ１３ａ	Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＫ４Ａ１７９	ＷＰ＿０２２７８５４４３．１
Ｃａｓ１３ａ６	ＣａｍＣａｓ１３ａ	［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ］ａｍｉｎｏｐｈｉｌｕｍ ＤＳＭ １０７１０	ＷＰ＿０３１４７３３４６．１
Ｃａｓ１３ａ７	ＣｇａＣａｓ１３ａ	Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ ＤＳＭ ４８４７	ＷＰ＿０３４５６０１６３．１
Ｃａｓ１３ａ８	Ｃｇａ２Ｃａｓ１３ａ	Ｃａｒｎｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ ＤＳＭ ４８４７	ＷＰ＿０３４５６３８４２．１
Ｃａｓ１３ａ９	Ｐｐｒｃａｓ１３ａ	Ｐａｌｕｄｉｂａｃｔｅｒ ｐｒｏｐｉｏｎｉｃｉｇｅｎｅｓ ＷＢ４	ＷＰ＿０１３４４３７１０．１
Ｃａｓ１３ａ１０	ＬｗｅＣａｓ１３ａ	Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｗｅｉｈｅｎｓｔｅｐｈａｎｅｎｓｉｓ ＦＳＬ Ｒ９－０３１７	ＷＰ＿０３６０５９１８５．１
Ｃａｓ１３ａ１１	ＬｂｆＣａｓ１３ａ	Ｌｉｓｔｅｒｉａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＦＳＬ Ｍ６－０６３５	ＷＰ＿０３６０９１００２．１
Ｃａｓ１３ａ１２	Ｌｗａ２ｃａｓ１３ａ	Ｌｅｐｔｏｔｒｉｃｈｉａ ｗａｄｅｉ Ｆ０２７９	ＷＰ＿０２１７４６７７４．１
Ｃａｓ１３ａ１３	ＲｃｓＣａｓ１３ａ	Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ ＳＢ １００３	ＷＰ＿０１３０６７７２８．１
Ｃａｓ１３ａ１４	ＲｃｒＣａｓ１３ａ	Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ Ｒ１２１	ＷＰ＿０２３９１１５０７．１
Ｃａｓ１３ａ１５	ＲｃｄＣａｓ１３ａ	Ｒｈｏｄｏｂａｃｔｅｒ ｃａｐｓｕｌａｔｕｓ ＤＥ４４２	ＷＰ＿０２３９１１５０７．１

Cas13a16	LbuCas13a	Leptotrichia buccalis C－1013－b	WP_015770004.1
Cas13a17	HheCas13a	Herbinix hemicellulosilytica	CRZ35554.1
Cas13a18	EreCas13a	[Eubacterium]rectale	WP_055061018.1
Cas13a19	EbaCas13a	Eubacteriaceae bacterium CHKCI004	WP_090127496.1
Cas13a20	BmaCas13a	Blautia sp.Marseille－P2398	WP_062808098.1
Cas13a21	LspCas13a	Leptotrichia sp.口腔タクソン879 str.F0557	WP_021744063.1
Cas13b1	BzoCas13b	Bergeyella zoohelcum	WP_002664492
Cas13b2	PinCas13b	Prevotella intermedia	WP_036860899
Cas13b3	PbuCas13b	Prevotella buccae	WP_004343973
Cas13b4	AspCas13b	Alistipes sp.ZOR0009	WP_047447901
Cas13b5	PsmCas13b	Prevotella sp.MA2016	WP_036929175
Cas13b6	RanCas13b	Riemerella anatipestifer	WP_004919755
Cas13b7	PauCas13b	Prevotella aurantiaca	WP_025000926
Cas13b8	PsaCas13b	Prevotella saccharolytica	WP_051522484
Cas13b9	Pin2Cas13b	Prevotella intermedia	WP_061868553
Cas13b10	CcaCas13b	Capnocytophaga canimorsus	WP_013997271
Cas13b11	PguCas13b	Porphyromonas gulae	WP_039434803
Cas13b12	PspCas13b	Prevotella sp.P5－125	WP_044065294
Cas13b13	FbrCas13b	Flavobacterium branchiophilum	WP_014084666
Cas13b14	PgiCas13b	Porphyromonas gingivalis	WP_053444417

Ｃａｓ１３ｂ１５	Ｐｉｎ３Ｃａｓ１３ｂ	Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａ	ＷＰ＿０５０９５５３６９
Ｃａｓ１３ｃ１	ＦｎｓＣａｓ１３ｃ	Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｎｅｃｒｏｐｈｏｒｕｍ ｓｕｂｓｐ．ｆｕｎｄｕｌｉｆｏｒｍｃ ＡＴＣＣ ５１３５７コンティグ００００３	ＷＰ＿００５９５９２３１．１
Ｃａｓ１３ｃ２	ＦｎｄＣａｓ１３ｃ	Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｎｅｃｒｏｐｈｏｒｕｍ ＤＪ－２コンティグ００６５、全ゲノムショットガン配列	ＷＰ＿０３５９０６５６３．１
Ｃａｓ１３ｃ３	ＦｎｂＣａｓ１３ｃ	Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｎｅｃｒｏｐｈｏｒｕｍ ＢＦＴＲ－１コンティグ００６８	ＷＰ＿０３５９３５６７１．１
Ｃａｓ１３ｃ４	ＦｎｆＣａｓ１３ｃ	Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｎｅｃｒｏｐｈｏｒｕｍ ｓｕｂｓｐ．ｆｕｎｄｕｌｉｆｏｒｍｅ １＿１＿３６Ｓ ｃｏｎｔ１．１４	ＥＨＯ１９０８１．１
Ｃａｓ１３ｃ５	ＦｐｅＣａｓ１３ｃ	Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐｅｒｆｏｅｔｅｎｓ ＡＴＣＣ ２９２５０ Ｔ３６４ ＤＲＡＦＴ＿ｓｃａｆｆｏｌｄ００００９．９＿Ｃ	ＷＰ＿０２７１２８６１６．１
Ｃａｓ１３ｃ６	ＦｕｌＣａｓ１３ｃ	Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｕｌｃｅｒａｎｓ ＡＴＣＣ ４９１８５ ｃｏｎｔ２．３８	ＷＰ＿０４０４９０８７６．１
Ｃａｓ１３ｃ７	ＡｓｐＣａｓ１３ｃ	Ａｎａｅｒｏｓａｌｉｂａｃｔｅｒ ｓｐ．ＮＤ１ゲノムアセンブリＡｎａｃｒｏｓａｌｉｂａｃｔｅｒ ｍａｓｓｉｌｉｅｎｓｉｓ ＮＤ１	ＷＰ＿０４２６７８９３１．１

【表７】

表７　細菌スクリーニングにおけるＰＦＳカットオフ

Ｃａｓ１３ｂオーソログ	キー	－ＰＦＳモチーフを生成するために使用されるＬｏｇ$_2$枯渇スコア
Ｂｅｒｇｅｙｅｌｌａ　ｚｏｏｈｅｌｃｕｍ	１	２
Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａ座位１	２	１
Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｂｕｃｃａｅ	３	３
Ａｌｉｓｔｉｐｅｓ　ｓｐ．ＺＯＲ０００９	４	１
Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｓｐ．ＭＡ２０１６	５	２
Ｒｉｅｍｅｒｅｌｌａ　ａｎａｔｉｐｅｓｔｉｆｅｒ	６	４
Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ａｕｒａｎｔｉａｃａ	７	１
Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｓａｃｃｈａｒｏｌｙｔｉｃａ	８	０
Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａ座位２	９	０
Ｃａｐｎｏｃｙｔｏｐｈａｇａ　ｃａｎｉｍｏｒｓｕｓ	１０	３
Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ　ｇｕｌａｅ	１１	４
Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｓｐ．Ｐ５－１２５	１２	２．１
Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｂｒａｎｃｈｉｏｐｈｉｌｕｍ	１３	１
Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ　ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ	１４	３
Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ　ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａ座位２	１５	４

【表８】

表８　哺乳動物細胞におけるＲＮＡ編集のために本研究において使用されるｄＣａｓ１３ｂ－ＡＤＡＲリンカー配列

図	リンカー
５０Ｃ	ＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２９６）
５０Ｅ	ＧＳ
５７Ｂ	ＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２９６）
５７Ｃ	ＧＳ
５７Ｄ	ＧＳ
５７Ｅ：ＧＳ	ＧＳ
５７Ｅ：ＧＳＧＧＧＧＳ	ＧＳＧＧＧＧＳ
５７Ｅ：（ＧＧＧＳ）３	ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎｏ．８０２）
５７Ｅ：剛性	ＥＡＡＡＫ（配列番号８０３）
５７Ｅ：（ＧＧＳ）６	ＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（配列番号８０４）
５７Ｅ：ＸＴＥＮ	ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号８０５）
５１Ｂ	ＧＳ
５７Ｆ	ＧＳ
５１Ｃ	ＧＳ
５２Ｂ	ＧＳ
５２Ｄ	ＧＳ
５２Ｅ	ＧＳ
５１Ａ：△９８４～１０９０、△１０２６～１０９０、△１０５３～１０９０	ＧＳ
５１Ａ：△１～１２５、△１～８８、△１～７２	ＧＳＧＧＧＧＳ
５３Ｂ	ＧＳ
５３Ｃ	ＧＳ
５３Ｄ	ＧＳ
６０Ａ	ＧＳ
６０Ｃ	ＧＳ
６０Ｄ	ＧＳ
６１Ｄ	ＧＳ
５４Ａ	ＧＳ
６２Ａ	ＧＳ
５４Ｂ	ＧＳ
６２Ｂ	ＧＳ
６２Ｃ	ＧＳ
６３Ａ	ＧＳ
６３Ｂ	ＧＳ
５４Ｃ	ＧＳ
５４Ｄ	ＧＳ

5 4 E	G S
5 4 F	G S
6 6 A	G S
6 6 A	G S

【表９】

表９　疾患関連変異の疾患情報

全長候補	遺伝子	疾患
ＮＭ＿０００００５４．４（ＡＶＰＲ２）：ｃ．８７８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２９３Ｔｅｒ）	ＡＶＰＲ２	腎性尿崩症、Ｘ連鎖性
ＮＭ＿０００１３６．２（ＦＡＮＣＣ）：ｃ．１５１７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５０６Ｔｅｒ）	ＦＡＮＣＣ	Ｆａｎｃｏｎｉ貧血、補体群Ｃ
追加の模擬候補		
候補	遺伝子	疾患
ＮＭ＿０００２０６．２（ＩＬ２ＲＧ）：ｃ．７１０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２３７Ｔｅｒ）	ＩＬ２ＲＧ	Ｘ連鎖重症複合免疫不全症
ＮＭ＿０００１３２．３（Ｆ８）：ｃ．３１４４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１０４８Ｔｅｒ）	Ｆ８	遺伝性第ＶＩＩＩ因子欠乏症
ＮＭ＿０００５２７．４（ＬＤＬＲ）：ｃ．１４４９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４８３Ｔｅｒ）	ＬＤＬＲ	家族性高コレステロール血症
ＮＭ＿０００００７１．２（ＣＢＳ）：ｃ．１６２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５４Ｔｅｒ）	ＣＢＳ	ＣＢＳ欠乏によるホモシスチン尿症
ＮＭ＿０００５１８．４（ＨＢＢ）：ｃ．１１４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３８Ｔｅｒ）	ＨＢＢ	ベータ＾０＾サラセミア｜ベータサラセミア
ＮＭ＿０００００３５．３（ＡＬＤＯＢ）：ｃ．８８８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２９６Ｔｅｒ）	ＡＬＤＯＢ	遺伝性果糖尿症
ＮＭ＿００４００６．２（ＤＭＤ）：ｃ．３７４７Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１２４９Ｔｅｒ）	ＤＭＤ	Ｄｕｃｈｅｎｎｅ型筋ジストロフィー
ＮＭ＿００５３５９．５（ＳＭＡＤ４）：ｃ．９０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３０２Ｔｅｒ）	ＳＭＡＤ４	若年性ポリポーシス症候群
ＮＭ＿０００００５９．３（ＢＲＣＡ２）：ｃ．５８２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１９４Ｔｃｒ）	ＢＲＣＡ２	家族性乳癌｜乳－卵巣癌、家族性２
ＮＭ＿０００８３３．４（ＧＲＩＮ２Ａ）：ｃ．３８１３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１２７１Ｔｅｒ）	ＧＲＩＮ２Ａ	発話障害を有し、精神遅滞を伴うか、または伴わないてんかん、焦点性
ＮＭ＿００２９７７．３（ＳＣＮ９Ａ）：ｃ．２６９１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ８９７Ｔｅｒ）	ＳＣＮ９Ａ	疼痛に不関、先天性、常染色体劣性
ＮＭ＿００７３７５．３（ＴＡＲＤＢＰ）：ｃ．９４３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ａｌａ３１５Ｔｈｒ）	ＴＡＲＤＢＰ	筋萎縮性側索硬化症１０型
ＮＭ＿０００４９２．３（ＣＦＴＲ）：ｃ．３８４６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１２８２Ｔｅｒ）	ＣＦＴＲ	嚢胞性線維症｜遺伝性膵炎｜提供されない｜アタルレン応答－有効性
ＮＭ＿１３０８３８．１（ＵＢＥ３Ａ）：ｃ．２３０４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７６８Ｔｅｒ）	ＵＢＥ３Ａ	Ａｎｇｅｌｍａｎ症候群
ＮＭ＿０００５４３．４（ＳＭＰＤ１）：ｃ．１６８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ５６Ｔｅｒ）	ＳＭＰＤ１	Ｎｉｅｍａｎｎ－Ｐｉｃｋ病、Ａ型
ＮＭ＿２０６９３３．２（ＵＳＨ２Ａ）：ｃ．９３９０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３１３０Ｔｅｒ）	ＵＳＨ２Ａ	Ｕｓｈｅｒ症候群、２Ａ型
ＮＭ＿１３０７９９．２（ＭＥＮ１）：ｃ．１２６９Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４２３Ｔｅｒ）	ＭＥＮ１	遺伝性がん素因症候群
ＮＭ＿１７７９６５．３（Ｃ８ｏｒｆ３７）：ｃ．５５５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１８５Ｔｅｒ）	Ｃ８ｏｒｆ３７	網膜色素変性６４

NM_０００２４９．３（ＭＬＨ１）：ｃ．１９９８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ６６６Ｔｅｒ）	ＭＬＨ１	Ｌｙｎｃｈ症候群
NM_０００５４８．４（ＴＳＣ２）：ｃ．２１０８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７０３Ｔｅｒ）	ＴＳＣ２	結節性硬化症２｜結節性硬化症症候群
NM_０００２６７．３（ＮＦ１）：ｃ．７０４４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２３４８Ｔｅｒ）	ＮＦ１	神経線維腫症、１型
NM_０００１７９．２（ＭＳＨ６）：ｃ．３０２０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１００７Ｔｅｒ）	ＭＳＨ６	Ｌｙｎｃｈ症候群
NM_０００３４４．３（ＳＭＮ１）：ｃ．３０５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１０２Ｔｅｒ）	ＳＭＮ１	脊髄性筋萎縮症、ＩＩ型｜Ｋｕｇｅｌｂｅｒｇ－Ｗｅｌａｎｄｅｒ病
NM_０２４５７７．３（ＳＨ３ＴＣ２）：ｃ．９２０Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ３０７Ｔｅｒ）	ＳＨ３ＴＣ２	Ｃｈａｒｃｏｔ－Ｍａｒｉｅ－Ｔｏｏｔｈ病、４Ｃ型
NM_００１３６９．２（ＤＮＡＨ５）：ｃ．８４６５Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２８２２Ｔｅｒ）	ＤＮＡＨ５	原発性線毛運動不全症
NM_００４９９２．３（ＭＥＣＰ２）：ｃ．３１１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１０４Ｔｅｒ）	ＭＥＣＰ２	Ｒｅｔｔ症候群
NM_０３２１１９．３（ＡＤＧＲＶ１）：ｃ．７４０６Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ２４６９Ｔｅｒ）	ＡＤＧＲＶ１	Ｕｓｈｅｒ症候群、２Ｃ型
NM_０１７６５１．４（ＡＨＩ１）：ｃ．２１７４Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ７２５Ｔｅｒ）	ＡＨＩ１	Ｊｏｕｂｅｒｔ症候群３
NM_００４５６２．２（ＰＲＫＮ）：ｃ．１３５８Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４５３Ｔｅｒ）	ＰＲＫＮ	Ｐａｒｋｉｎｓｏｎ病２
NM_０００９０．３（ＣＯＬ３Ａ１）：ｃ．３８３３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１２７８Ｔｅｒ）	ＣＯＬ３Ａ１	Ｅｈｌｅｒｓ－Ｄａｎｌｏｓ症候群、４型
NM_００７２９４．３（ＢＲＣＡ１）：ｃ．５５１１Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１８３７Ｔｅｒ）	ＢＲＣＡ１	家族性乳癌｜乳－卵巣癌、家族性１
NM_０００２５６．３（ＭＹＢＰＣ３）：ｃ．３２９３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ１０９８Ｔｅｒ）	ＭＹＢＰＣ３	原発性家族性肥大型心筋症
NM_０００３８．５（ＡＰＣ）：ｃ．１２６２Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｔｒｐ４２１Ｔｅｒ）	ＡＰＣ	家族性大腸腺腫症１
NM_００１２０４．６（ＢＭＰＲ２）：ｃ．８９３Ｇ＞Ａ（ｐ．Ｗ２９８＊）	ＢＭＰＲ２	原発性肺高血圧症

【表１０】

表１０：本研究において使用される主要プラスミド

プラスミド名	説明
ｐＡＢ０００６	ＣＭＶ－Ｃルシフェラーゼ－ポリＡ　ＥＦ１ａ－Ｇ－ルシフェラーゼ－ポリＡ
ｐＡＢ００４０	ＣＭＶ－ルシフェラーゼ（ＳＴＯＰ８５）－ポリＡ　ＥＦ１ａ－Ｇ－ルシフェラーゼ－ポリＡ
ｐＡＢ００４８	ｐＣＤＮＡ－ＡＤＡＲ２－Ｎ－末端Ｂ１２－ＨＩＶ　ＮＥＳ
ｐＡＢ００５０	ｐＡＢ０００１－Ａ０２（ｃｒＲＮＡバックボーン）
ｐＡＢ００５１	ｐＡＢ０００１－Ｂ０６（ｃｒＲＮＡバックボーン）
ｐＡＢ００５２	ｐＡＢ０００１－Ｂ１１（ｃｒＲＮＡバックボーン）
ｐＡＢ００５３	ｐＡＢ０００１－Ｂ１２（ｃｒＲＮＡバックボーン）
ｐＡＢ００１４．Ｂ６	ＥＦ１ａ－ＢｓｉＷＩ－Ｃａｓ１３ｂ６－ＮＥＳ－ｍａｐｋ
ｐＡＢ００１３．Ｂ１１	ＥＦ１ａ－ＢｓｉＷＩ－Ｃａｓ１３ｂ１１－ＮＥＳ－ＩＩＩＶ
ｐＡＢ００１３．Ｂ１２	ＥＦ１ａ－ＢｓｉＷＩ－Ｃａｓ１３ｂ１２－ＮＥＳ－ＨＩＶ
ｐＡＢ００５１	ｐＡＢ０００１－Ｂ０６（ｃｒＲＮＡバックボーン）
ｐＡＢ００５２	ｐＡＢ０００１－Ｂ１１（ｃｒＲＮＡバックボーン）
ｐＡＢ００５３	ｐＡＢ０００１－Ｂ１２（ｃｒＲＮＡバックボーン）
ｐＡＢ００７９	ｐＣＤＮＡ－ＡＤＡＲ１ｈｕ－ＥＱ変異体－Ｎ－末端デスティネーションベクター
ｐＡＢ００８５	ｐＣＤＮＡ－ＡＤＡＲ２（Ｅ４８８Ｑ）ｈｕ－ＥＱ変異体－Ｎ－末端デスティネーションベクター
ｐＡＢ００９５	二重Ｈ　ＨＥＰＮ変異体を有するＥＦ１ａ－ＢｓｉＷＩ－Ｃａｓ１３－Ｂ１２－ＮＥＳ－ＨＩＶ
ｐＡＢ０１１４	ｐＣＤＮＡ－ｗｔＡＤＡＲ２ｈｕ－ＥＱ変異体－Ｎ－末端デスティネーションベクター
ｐＡＢ０１２０	ルシフェラーゼＡＤＡＲガイド最適（ｗＣ００５４からのガイド２４）
ｐＡＢ０１２２	ＡＤＡＲ実験用ｐＡＢ０００１－Ｂ１２　ＮＴガイド
ｐＡＢ０１５１	ｐＣＤＮＡ－ＡＤＡＲ２ｈｕ－ＥＱ変異体－Ｎ－末端デスティネーションベクター　Ｃ－ｔｅｒｍデルタ９８４－１０９０
ｐＡＢ０１８０	Ｔ３７５Ｇ特異性変異体
ｐＡＢ０１８１	Ｔ３７５Ｇ　Ｃａｓ１３ｂ　Ｃ－ｔｅｒｍデルタ９８４－１０９０

【表１１】

表１１：哺乳動物細胞におけるノックダウンのために本研究において使用されるガイド／ｓｈＲＮＡ配列

名称	スペーサー配列	干渉機構	備考	最初の図
細菌ＰＦＳガイド	ＧＣＣＡＧＣＵＵＵＣＣＧＧＧＣＡＵＵＧＧＣＵＵＣＣＡＵＣ（配列番号３００）	Ｃａｓ１３ｂ	全てのオーソログに使用される	
Ｃａｓ１３ａ－Ｇｌｕｃガイド１	ＧＣＣＡＧＣＴＴＴＣＣＧＧＧＣＡＴＴＧＧＣＴＴＣＣＡＴＣ（配列番号３０１）	Ｃａｓ１３ａ	全てのＣａｓ１３ａオーソログに使用される	図４９Ｂ
Ｃａｓ１３ａ－Ｇｌｕｃガイド２	ＡＣＣＣＡＧＧＡＡＴＣＴＣＡＧＧＡＡＴＧＴＣＧＡＣＧＡＴ（配列番号３０２）	Ｃａｓ１３ａ	全てのＣａｓ１３ａオーソログに使用される	図４９Ｂ
Ｃａｓ１３ａ－非標的化ガイド（ＬａｃＺ）	ＡＧＧＧＴＴＴＣＣＣＡＧＴＣＡＣＧＡＣＧＴＴＧＴＡＡＡ（配列番号３０３）	Ｃａｓ１３ａ	全てのＣａｓ１３ａオーソログに使用される	図４９Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ－Ｇｌｕｃガイド１．１	ＧＧＧＣＡＴＴＧＧＣＴＴＣＣＡＴＣＴＣＴＴＴＧＡＧＣＡＣＣＴ（配列番号３０４）	Ｃａｓ１３ｂ	オーソログ１～３、６、７、１０、１１、１２、１４、１５に使用される	図４９Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ－Ｇｌｕｃガイド１．２	ＧＵＧＣＡＧＣＣＡＧＣＵＵＵＣＣＧＧＧＣＡＵＵＧＧＣＵＵＣＣ（配列番号３０５）	Ｃａｓ１３ｂ	オーソログ４に使用される	図４９Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ－Ｇｌｕｃガイド１．３	ＧＣＡＧＣＣＡＧＣＵＵＵＣＣＧＧＧＣＡＵＵＧＧＣＵＵＣＣＡＵ（配列番号３０６）	Ｃａｓ１３ｂ	オーソログ５に使用される	図４９Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ－Ｇｌｕｃガイド１．４	ＧＧＣＵＵＣＣＡＵＣＵＣＵＵＵＧＡＧＣＡＣＣＵＣＣＡＧＣＧＧ（配列番号３０７）	Ｃａｓ１３ｂ	オーソログ８、９に使用される	図４９Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ－Ｇｌｕｃガイド１．５	ＧＧＡＡＵＧＵＣＧＡＣＧＡＵＣＧＣＣＵＣＧＣＣＵＡＵＧＣＣＧ（配列番号３０８）	Ｃａｓ１３ｂ	オーソログ１３に使用される	図４９Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ－Ｇｌｕｃガイド２．１	ＧＡＡＵＧＵＣＧＡＣＧＡＵＣＧＣＣＵＣＧＣＣＵＡＵＧＣＣＧＣ（配列番号３０９）	Ｃａｓ１３ｂ	オーソログ１～３、６、７、１０、１１、１４、１５に使用される	図４９Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ－Ｇｌｕｃガイド２．２	ＧＡＣＣＵＧＵＧＣＧＡＵＧＡＡＣＵＧＣＵＣＣＡＵＧＧＧＣＵＣ（配列番号３１０）	Ｃａｓ１３ｂ	オーソログ１２に使用される	図４９Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ－Ｇｌｕｃガイド２．２	ＧＵＧＵＧＧＣＡＧＣＧＵＣＣＵＧＧＧＡＵＧＡＡＣＵＵＣＵＵＣ（配列番号３１１）	Ｃａｓ１３ｂ	オーソログ４に使用される	図４９Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ－Ｇｌｕｃガイド２．３	ＧＵＧＧＣＡＧＣＧＵＣＣＵＧＧＧＡＵＧＡＡＣＵＵＣＵＵＣＡＵ（配列番号３１２）	Ｃａｓ１３ｂ	オーソログ５に使用される	図４９Ｂ

Ｃａｓ１３ｂ－Ｇｌｕｃガイド２．４	ＧＣＵＵＣＵＵＧＣＣＧＧＧＣＡＡＣＵＵＣＣＣＧＣＧＧＵＣＡＧ（配列番号３１３）	Ｃａｓ１３ｂ	オーソログ８、９に使用される	図４９Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ－Ｇｌｕｃガイド２．６	ＧＣＡＧＧＧＵＵＵＵＣＣＣＡＧＵＣＡＣＧＡＣＧＵＵＧＵＡＡＡＡ（配列番号３１４）	Ｃａｓ１３ｂ	オーソログ１３に使用される	図４９Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ－非標的化ガイド	ＧＣＡＧＧＧＵＵＵＵＣＣＣＡＧＵＣＡＣＧＡＣＧＵＵＧＵＡＡＡＡ（配列番号３１５）	Ｃａｓ１３ｂ	全てのオーソログに使用される	図４９Ｂ
Ｃａｓ１３ａ－Ｇｌｕｃガイド－ＲＮＡ配列	ＡＣＣＣＡＧＧＡＡＵＣＵＣＡＧＧＡＡＵＧＵＣＧＡＣＧＡＵ（配列番号３１６）	Ｃａｓ１３ａ		図４９Ｅ
ｓｈＲＮＡ－Ｇｌｕｃガイド	ＣＡＧＣＴＴＴＣＣＧＧＧＣＡＴＴＧＧＣＴＴ（配列番号３１７）	ｓｈＲＮＡ		図４９Ｆ
Ｃａｓ１３ｂ－Ｇｌｕｃガイド－ＲＮＡ配列	ＣＣＧＣＵＧＧＡＧＧＵＧＣＵＣＡＡＡＧＡＧＡＵＧＧＡＡＧＣＣ（配列番号３１８）	Ｃａｓ１３ｂ		図４９Ｆ
Ｃａｓ１３ａ－Ｇｌｕｃ－ガイド－１	ＧＣＣＡＧＣＴＴＴＣＣＧＧＧＣＡＴＴＧＧＣＴＴＣＣＡＴＣ（配列番号３１９）	Ｃａｓ１３ａ		図５６Ａ
Ｃａｓ１３ａ－Ｇｌｕｃ－ガイド－２	ＡＣＣＣＡＧＧＡＡＴＣＴＣＡＧＧＡＡＴＧＴＣＧＡＣＧＡＴ（配列番号３２０）	Ｃａｓ１３ａ		図５６Ａ
Ｃａｓ１３ｂ－Ｇｌｕｃ－ｏｐｔ－ガイド－１	ＧＧＧＣＡＴＴＧＧＣＴＴＣＣＡＴＣＴＣＴＴＴＧＡＧＣＡＣＣＴ（配列番号３２１）	Ｃａｓ１３ｂ		図５６Ａ
Ｃａｓ１３ｂ－Ｇｌｕｃ－ｏｐｔ－ガイド－２	ＧＡＡＵＧＵＣＧＡＣＧＡＵＣＧＣＣＵＣＧＣＣＵＡＵＧＣＣＧＣ（配列番号３２２）	Ｃａｓ１３ｂ		図５６Ａ
Ｃａｓ１３ａ　ＫＲＡＳガイド１	ＣＡＡＧＧＣＡＣＴＣＴＴＧＣＣＴＡＣＧＣＣＡＣＣＡＧＣＴ（配列番号３２３）	Ｃａｓ１３ａ		図５６Ｂ
Ｃａｓ１３ａ　ＫＲＡＳガイド２	ＴＣＡＴＡＴＴＣＧＴＣＣＡＣＡＡＡＡＴＧＡＴＴＣＴＧＡＡ（配列番号３２４）	Ｃａｓ１３ａ		図５６Ｂ
Ｃａｓ１３ａ　ＫＲＡＳガイド３	ＡＴＴＡＴＴＴＡＴＧＧＣＡＡＡＴＡＣＡＣＡＡＡＧＡＡＡＧ（配列番号３２５）	Ｃａｓ１３ａ		図５６Ｂ
Ｃａｓ１３ａ　ＫＲＡＳガイド４	ＧＡＡＴＡＴＣＴＴＣＡＡＡＴＧＡＴＴＴＡＧＴＡＴＴＡＴＴ（配列番号３２６）	Ｃａｓ１３ａ		図５６Ｂ
Ｃａｓ１３ａ　ＫＲＡＳガイド５	ＡＣＣＡＴＡＧＧＴＡＣＡＴＣＴＴＣＡＧＡＧＴＣＣＴＴＡＡ（配列番号３２７）	Ｃａｓ１３ａ		図５６Ｂ

Ｃａｓ１３ｂ　ＫＲＡＳガイド１	ＧＴＣＡＡＧＧＣＡＣＴＣＴＴＧＣＣＴＡＣＧＣＣＡＣＣＡＧＣＴ（配列番号３２８）	Ｃａｓ１３ｂ		図５６Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ　ＫＲＡＳガイド２	ＧＡＴＣＡＴＡＴＴＣＧＴＣＣＡＣＡＡＡＡＴＧＡＴＴＣＴＧＡ（配列番号３２９）	Ｃａｓ１３ｂ		図５６Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ　ＫＲＡＳガイド３	ＧＴＡＴＴＡＴＴＴＡＴＧＧＣＡＡＡＴＡＣＡＣＡＡＡＧＡＡＡＧ（配列番号３３０）	Ｃａｓ１３ｂ		図５６Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ　ＫＲＡＳガイド４	ＧＴＧＡＡＴＡＴＣＴＴＣＡＡＡＴＧＡＴＴＴＡＧＴＡＴＴＡＴＴ（配列番号３３１）	Ｃａｓ１３ｂ		図５６Ｂ
Ｃａｓ１３ｂ　ＫＲＡＳガイド５	ＧＧＡＣＣＡＴＡＧＧＴＡＣＡＴＣＴＴＣＡＧＡＧＴＣＣＴＴＡＡ（配列番号３３２）	Ｃａｓ１３ｂ		図５６Ｂ
ｓｈＲＮＡ　ＫＲＡＳガイド１	ａａｇａｇｔｇｃｃｔｔｇａｃｇａｔａｃａｇｃＣＴＣＧＡＧｇｃｔｇｔａｔｃｇｔｃａａｇｇｃａｃｔｃｔｔ（配列番号３３３）	ｓｈＲＮＡ		図５６Ｂ
ｓｈＲＮＡ　ＫＲＡＳガイド２	ａａｔｃａｔｔｔｔｇｔｇｇａｃｇａａｔａｔＣＴＣＧＡＧａｔａｔｔｃｇｔｃｃａｃａａａａｔｇａｔｔ（配列番号３３４）	ｓｈＲＮＡ		図５６Ｂ
ｓｈＲＮＡ　ＫＲＡＳガイド３	ａａａｔａａｔａｃｔａａａｔｃａｔｔｔｇａＣＴＣＧＡＧｔｃａａａｔｇａｔｔｔａｇｔａｔｔａｔｔｔ（配列番号３３５）	ｓｈＲＮＡ		図５６Ｂ
ｓｈＲＮＡ　ＫＲＡＳガイド４	ａａｔａａｔａｃｔａａａｔｃａｔｔｔｇａａＣＴＣＧＡＧｔｔｃａａａｔｇａｔｔｔａｇｔａｔｔａｔｔ（配列番号３３６）	ｓｈＲＮＡ		図５６Ｂ
ｓｈＲＮＡ　ＫＲＡＳガイド５	ａａｇｇａｃｔｃｔｇａａｇａｔｇｔａｃｃｔＣＴＣＧＡＧａｇｇｔａｃａｔｃｔｔｃａｇａｇｔｃｃｔｔ（配列番号３３７）	ｓｈＲＮＡ		図５６Ｂ

【表１２】

表１２：Ｇｌｕｃノックダウンに使用されるガイド配列

名称	スペーサー配列	位置	備考	最初の図
Ｇｌｕｃタイリングガイド１	ＧＡＧＡＴＣＡＧＧＧＣＡＡＡＣＡＧＡＡＣＴＴＴＧＡＣＴＣＣＣ（配列番号３３８）	２	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド２	ＧＧＡＴＧＣＡＧＡＴＣＡＧＧＧＣＡＡＡＣＡＧＡＡＣＴＴＴＧＡ（配列番号３３９）	７	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド３	ＧＣＡＣＡＧＣＧＡＴＧＣＡＧＡＴＣＡＧＧＧＣＡＡＡＣＡＧＡＡ（配列番号３４０）	１３	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド４	ＧＣＴＣＧＧＣＣＡＣＡＧＣＧＡＴＧＣＡＧＡＴＣＡＧＧＧＣＡＡ（配列番号３４１）	１９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド５	ＧＧＧＧＣＴＴＧＧＣＣＴＣＧＧＣＣＡＣＡＧＣＧＡＴＧＣＡＧＡ（配列番号３４２）	２８	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド６	ＧＴＧＧＧＣＴＴＧＧＣＣＴＣＧＧＣＣＡＣＡＧＣＧＡＴＧＣＡＧ（配列番号３４３）	２９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド７	ＧＴＣＴＣＧＧＴＧＧＧＣＴＴＧＧＣＣＴＣＧＧＣＣＡＣＡＧＣＧ（配列番号３４４）	３５	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド８	ＧＴＴＣＧＴＴＧＴＴＣＴＣＧＧＴＧＧＧＣＴＴＧＧＣＣＴＣＧＧ（配列番号３４５）	４３	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド９	ＧＧＡＡＧＴＣＴＴＣＧＴＴＧＴＴＣＴＣＧＧＴＧＧＧＣＴＴＧＧ（配列番号３４６）	４９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ

Ｇｌｕｃタイリングガイド１０	ＧＡＴＧＴＴＧＡＡＧＴＣＴＴＣＧＴＴＧＴＴＣＴＣＧＧＴＧＧＧ（配列番号３４７）	５４	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド１１	ＧＣＧＧＣＣＡＣＧＡＴＧＴＴＧＡＡＧＴＣＴＴＣＧＴＴＧＴＴＣ（配列番号３４８）	６２	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド１２	ＧＴＧＧＣＣＡＣＧＧＣＣＡＣＧＡＴＧＴＴＧＡＡＧＴＣＴＴＣＧ（配列番号３４９）	６８	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド１３	ＧＧＴＴＧＣＴＧＧＣＣＡＣＧＧＣＣＡＣＧＡＴＧＴＴＧＡＡＧＴ（配列番号３５０）	７３	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド１４	ＧＴＣＧＣＧＡＡＧＴＴＧＣＴＧＧＣＣＡＣＧＧＣＣＡＣＧＡＴＧ（配列番号３５１）	８０	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド１５	ＧＣＣＧＴＧＧＴＣＧＣＧＡＡＧＴＴＧＣＴＧＧＣＣＡＣＧＧＣＣ（配列番号３５２）	８６	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド１６	ＧＣＧＡＧＡＴＣＣＧＴＧＧＴＣＧＣＧＡＡＧＴＴＧＣＴＧＧＣＣ（配列番号３５３）	９２	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド１７	ＧＣＡＧＣＡＴＣＧＡＧＡＴＣＣＧＴＧＧＴＣＧＣＧＡＡＧＴＴＧ（配列番号３５４）	９８	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド１８	ＧＧＧＴＣＡＧＣＡＴＣＧＡＧＡＴＣＣＧＴＧＧＴＣＧＣＧＡＡＧ（配列番号３５５）	１０１	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ

Ｇｌｕｃタイリングガイド１９	ＧＣＴＴＣＣＣＧＣＧＧＴＣＡＧＣＡＴＣＧＡＧＡＴＣＣＧＴＧＧ（配列番号３５６）	１０９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド２０	ＧＧＧＧＣＡＡＣＴＴＣＣＣＧＣＧＧＴＣＡＧＣＡＴＣＧＡＧＡＴ（配列番号３５７）	１１５	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド２１	ＧＴＣＴＴＧＣＣＧＧＧＣＡＡＣＴＴＣＣＣＧＣＧＧＴＣＡＧＣＡ（配列番号３５８）	１２２	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド２２	ＧＧＣＡＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＧＧＧＣＡＡＣＴＴＣＣＣＧＣＧＧ（配列番号３５９）	１２８	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド２３	ＧＣＣＡＧＣＧＧＣＡＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＧＧＧＣＡＡＣＴＴＣ（配列番号３６０）	１３４	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド２４	ＧＣＡＣＣＴＣＣＡＧＣＧＧＣＡＧＣＴＴＣＴＴＧＣＣＧＧＧＣＡ（配列番号３６１）	１３９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド２５	ＧＣＴＴＴＧＡＧＣＡＣＣＴＣＣＡＧＣＧＧＣＡＧＣＴＴＣＴＴＧ（配列番号３６２）	１４６	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド２６	ＧＣＡＴＣＴＣＴＴＴＧＡＧＣＡＣＣＴＣＣＡＧＣＧＧＣＡＧＣＴ（配列番号３６３）	１５１	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド２７	ＧＴＣＣＡＴＣＴＣＴＴＴＧＡＧＣＡＣＣＴＣＣＡＧＣＧＧＣＡＧ（配列番号３６４）	１５３	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ

Ｇｌｕｃタイリングガイド２８	ＧＧＧＣＡＴＴＧＧＣＴＴＣＣＡＴＣＴＣＴＴＴＧＡＧＣＡＣＣＴ（配列番号３６５）	１６３	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド２９	ＧＴＣＣＧＧＧＣＡＴＴＧＧＣＴＴＣＣＡＴＣＴＣＴＴＴＧＡＧＣ（配列番号３６６）	１６７	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド３０	ＧＧＣＣＡＧＣＴＴＴＣＣＧＧＧＣＡＴＴＧＧＣＴＴＣＣＡＴＣＴ（配列番号３６７）	１７５	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド３１	ＧＧＧＴＧＣＡＧＣＣＡＧＣＴＴＴＣＣＧＧＧＣＡＴＴＧＧＣＴＴ（配列番号３６８）	１８１	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド３２	ＧＡＧＣＣＣＣＴＧＧＴＧＣＡＧＣＣＡＧＣＴＴＴＣＣＧＧＧＣＡ（配列番号３６９）	１８８	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド３３	ＧＡＴＣＡＧＡＣＡＧＣＣＣＣＴＧＧＴＧＣＡＧＣＣＡＧＣＴＴＴ（配列番号３７０）	１９５	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド３４	ＧＧＣＡＧＡＴＣＡＧＡＣＡＧＣＣＣＣＴＧＧＴＧＣＡＧＣＣＡＧ（配列番号３７１）	１９９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド３５	ＧＡＣＡＧＧＣＡＧＡＴＣＡＧＡＣＡＧＣＣＣＣＴＧＧＴＧＣＡＧ（配列番号３７２）	２０３	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド３６	ＧＴＧＡＴＧＴＧＧＧＡＣＡＧＧＣＡＧＡＴＣＡＧＡＣＡＧＣＣＣ（配列番号３７３）	２１２	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ

Ｇｌｕｃタイリングガイド３７	ＧＡＣＴＴＧＡＴＧＴＧＧＧＡＣＡＧＧＣＡＧＡＴＣＡＧＡＣＡＧ（配列番号３７４）	２１５	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド３８	ＧＧＧＧＣＧＴＧＣＡＣＴＴＧＡＴＧＴＧＧＧＡＣＡＧＧＣＡＧＡ（配列番号３７５）	２２３	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド３９	ＧＣＴＴＣＡＴＣＴＴＧＧＧＣＧＴＧＣＡＣＴＴＧＡＴＧＴＧＧＧ（配列番号３７６）	２３２	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド４０	ＧＴＧＡＡＣＴＴＣＴＴＣＡＴＣＴＴＧＧＧＣＧＴＧＣＡＣＴＴＧ（配列番号３７７）	２３９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド４１	ＧＧＧＡＴＧＡＡＣＴＴＣＴＴＣＡＴＣＴＴＧＧＧＣＧＴＧＣＡＣ（配列番号３７８）	２４２	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド４２	ＧＴＧＧＧＡＴＧＡＡＣＴＴＣＴＴＣＡＴＣＴＴＧＧＧＣＧＴＧＣ（配列番号３７９）	２４４	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド４３	ＧＧＧＣＡＧＣＧＴＣＣＴＧＧＧＡＴＧＡＡＣＴＴＣＴＴＣＡＴＣ（配列番号３８０）	２５４	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド４４	ＧＧＧＴＧＴＧＧＣＡＧＣＧＴＣＣＴＧＧＧＡＴＧＡＡＣＴＴＣＴ（配列番号３８１）	２５９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド４５	ＧＴＴＣＧＴＡＧＧＴＧＴＧＧＣＡＧＣＧＴＣＣＴＧＧＧＡＴＧＡ（配列番号３８２）	２６５	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ

Ｇｌｕｃタイリングガイド４６	ＧＣＧＣＣＴＴＣＧＴＡＧＧＴＧＴＧＧＣＡＧＣＧＴＣＣＴＧＧＧ（配列番号３８３）	２６９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド４７	ＧＴＣＴＴＴＧＴＣＧＣＣＴＴＣＧＴＡＧＧＴＧＴＧＧＣＡＧＣＧ（配列番号３８４）	２７６	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド４８	ＧＣＴＴＴＧＴＣＧＣＣＴＴＣＧＴＡＧＧＴＧＴＧＧＣＡＧＣＧＴ（配列番号３８５）	２７５	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド４９	ＧＴＧＣＣＧＣＣＣＴＧＴＧＣＧＧＡＣＴＣＴＴＴＧＴＣＧＣＣＴ（配列番号３８６）	２９３	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド５０	ＧＴＡＴＧＣＣＧＣＣＣＴＧＴＧＣＧＧＡＣＴＣＴＴＴＧＴＣＧＣＣ（配列番号３８７）	２９５	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド５１	ＧＣＣＴＣＧＣＣＴＡＴＧＣＣＧＣＣＣＴＧＴＧＣＧＧＡＣＴＣＴ（配列番号３８８）	３０２	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド５２	ＧＧＡＴＣＧＣＣＴＣＧＣＣＴＡＴＧＣＣＧＣＣＣＴＧＴＧＣＧＧ（配列番号３８９）	３０７	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド５３	ＧＡＴＧＴＣＧＡＣＧＡＴＣＧＣＣＴＣＧＣＣＴＡＴＧＣＣＧＣＣ（配列番号３９０）	３１５	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド５４	ＧＣＡＧＧＡＡＴＧＴＣＧＡＣＧＡＴＣＧＣＣＴＣＧＣＣＴＡＴＧ（配列番号３９１）	３２０	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ

Ｇｌｕｃタイリングガイド５５	ＧＡＡＴＣＴＣＡＧＧＡＡＴＧＴＣＧＡＣＧＡＴＣＧＣＣＴＣＧＣ（配列番号３９２）	３２５	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド５６	ＧＣＣＣＡＧＧＡＡＴＣＴＣＡＧＧＡＡＴＧＴＣＧＡＣＧＡＴＣＧ（配列番号３９３）	３３１	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド５７	ＧＣＣＴＴＧＡＡＣＣＣＡＧＧＡＡＴＣＴＣＡＧＧＡＡＴＧＴＣＧ（配列番号３９４）	３３８	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド５８	ＧＣＣＡＡＧＴＣＣＴＴＧＡＡＣＣＣＡＧＧＡＡＴＣＴＣＡＧＧＡ（配列番号３９５）	３４４	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド５９	ＧＴＧＧＧＣＴＣＣＡＡＧＴＣＣＴＴＧＡＡＣＣＣＡＧＧＡＡＴＣ（配列番号３９６）	３５０	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド６０	ＧＣＣＡＴＧＧＧＣＴＣＣＡＡＧＴＣＣＴＴＧＡＡＣＣＣＡＧＧＡ（配列番号３９７）	３５３	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド６１	ＧＧＡＡＣＴＧＣＴＣＣＡＴＧＧＧＣＴＣＣＡＡＧＴＣＣＴＴＧＡ（配列番号３９８）	３６１	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド６２	ＧＴＧＣＧＡＴＧＡＡＣＴＧＣＴＣＣＡＴＧＧＧＣＴＣＣＡＡＧＴ（配列番号３９９）	３６７	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド６３	ＧＧＡＣＣＴＧＴＧＣＧＡＴＧＡＡＣＴＧＣＴＣＣＡＴＧＧＧＣＴ（配列番号４００）	３７３	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ

Ｇｌｕｃタイリングガイド６４	ＧＡＣＡＧＡＴＣＧＡＣＣＴＧＴＧＣＧＡＴＧＡＡＣＴＧＣＴＣＣ（配列番号４０１）	３８０	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド６５	ＧＡＣＡＣＡＣＡＧＡＴＣＧＡＣＣＴＧＴＧＣＧＡＴＧＡＡＣＴＧ（配列番号４０２）	３８４	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド６６	ＧＴＧＣＡＧＴＣＣＡＣＡＣＡＣＡＧＡＴＣＧＡＣＣＴＧＴＧＣＧ（配列番号４０３）	３９２	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド６７	ＧＣＣＡＧＴＴＧＴＧＣＡＧＴＣＣＡＣＡＣＡＣＡＧＡＴＣＧＡＣ（配列番号４０４）	３９９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド６８	ＧＧＧＣＡＧＣＣＡＧＴＴＧＴＧＣＡＧＴＣＣＡＣＡＣＡＣＡＧＡ（配列番号４０５）	４０４	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド６９	ＧＴＴＴＧＡＧＧＣＡＧＣＣＡＧＴＴＧＴＧＣＡＧＴＣＣＡＣＡＣ（配列番号４０６）	４０９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド７０	ＧＡＡＧＣＣＣＴＴＴＧＡＧＧＣＡＧＣＣＡＧＴＴＧＴＧＣＡＧＴ（配列番号４０７）	４１５	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド７１	ＧＣＡＣＧＴＴＧＧＣＡＡＧＣＣＣＴＴＴＧＡＧＧＣＡＧＣＣＡＧ（配列番号４０８）	４２４	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド７２	ＧＡＣＴＧＣＡＣＧＴＴＧＧＣＡＡＧＣＣＣＴＴＴＧＡＧＧＣＡＧ（配列番号４０９）	４２８	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ

Ｇｌｕｃタイリングガイド７３	ＧＧＧＴＣＡＧＡＡＣＡＣＴＧＣＡＣＧＴＴＧＧＣＡＡＧＣＣＣＴ（配列番号４１０）	４３７	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド７４	ＧＣＡＧＧＴＣＡＧＡＡＣＡＣＴＧＣＡＣＧＴＴＧＧＣＡＡＧＣＣ（配列番号４１１）	４３９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド７５	ＧＡＧＣＡＧＧＴＣＡＧＡＡＣＡＣＴＧＣＡＣＧＴＴＧＧＣＡＡＧ（配列番号４１２）	４４１	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド７６	ＧＧＣＣＡＣＴＴＣＴＴＧＡＧＣＡＧＧＴＣＡＧＡＡＣＡＣＴＧＣ（配列番号４１３）	４５２	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド７７	ＧＣＧＧＣＡＧＣＣＡＣＴＴＣＴＴＧＡＧＣＡＧＧＴＣＡＧＡＡＣ（配列番号４１４）	４５７	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド７８	ＧＴＧＣＧＧＣＡＧＣＣＡＣＴＴＣＴＴＧＡＧＣＡＧＧＴＣＡＧＡ（配列番号４１５）	４５９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド７９	ＧＡＧＣＧＴＴＧＣＧＧＣＡＧＣＣＡＣＴＴＣＴＴＧＡＧＣＡＧＧ（配列番号４１６）	４６４	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド８０	ＧＡＡＡＧＧＴＣＧＣＡＣＡＧＣＧＴＴＧＣＧＧＣＡＧＣＣＡＣＴ（配列番号４１７）	４７５	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド８１	ＧＣＴＧＧＣＡＡＡＧＧＴＣＧＣＡＣＡＧＣＧＴＴＧＣＧＧＣＡＧ（配列番号４１８）	４８０	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ

Ｇｌｕｃタイリングガイド８２	ＧＧＧＣＡＡＡＧＧＴＣＧＣＡＣＡＧＣＧＴＴＧＣＧＧＣＡＧＣＣ（配列番号４１９）	４７８	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド８３	ＧＴＧＧＡＴＣＴＴＧＣＴＧＧＣＡＡＡＧＧＴＣＧＣＡＣＡＧＣＧ（配列番号４２０）	４８９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド８４	ＧＣＡＣＣＴＧＧＣＣＣＴＧＧＡＴＣＴＴＧＣＴＧＧＣＡＡＡＧＧ（配列番号４２１）	４９９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド８５	ＧＴＧＧＣＣＣＴＧＧＡＴＣＴＴＧＣＴＧＧＣＡＡＡＧＧＴＣＧＣ（配列番号４２２）	４９５	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド８６	ＧＴＧＡＴＣＴＴＧＴＣＣＡＣＣＴＧＧＣＣＣＴＧＧＡＴＣＴＴＧ（配列番号４２３）	５０９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注日されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド８７	ＧＣＣＣＣＴＴＧＡＴＣＴＴＧＴＣＣＡＣＣＴＧＧＣＣＣＴＧＧＡ（配列番号４２４）	５１４	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド８８	ＧＣＣＣＴＴＧＡＴＣＴＴＧＴＣＣＡＣＣＴＧＧＣＣＣＴＧＧＡＴ（配列番号４２５）	５１３	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド８９	ＧＣＣＴＴＧＡＴＣＴＴＧＴＣＣＡＣＣＴＧＧＣＣＣＴＧＧＡＴＣ（配列番号４２６）	５１２	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド９０	ＧＧＣＡＡＡＧＧＴＣＧＣＡＣＡＧＣＧＴＴＧＣＧＧＣＡＧＣＣＡ（配列番号４２７）	４７７	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ

Ｇｌｕｃタイリングガイド９１	ＧＣＡＡＡＧＧＴＣＧＣＡＣＡＧＣＧＴＴＧＣＧＧＣＡＧＣＣＡＣ（配列番号４２８）	４７６	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド９２	ＧＡＡＧＧＴＣＧＣＡＣＡＧＣＧＴＴＧＣＧＧＣＡＧＣＣＡＣＴＴ（配列番号４２９）	４７４	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
Ｇｌｕｃタイリングガイド９３	ＧＡＧＧＴＣＧＣＡＣＡＧＣＧＴＴＧＣＧＧＣＡＧＣＣＡＣＴＴＣ（配列番号４３０）	４７３	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
非標的化ガイド１	ＧＧＴＡＡＴＧＣＣＴＧＧＣＴＴＧＴＣＧＡＣＧＣＡＴＡＧＴＣＴＧ（配列番号４３１）	該当なし	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
非標的化ガイド２	ＧＧＧＡＡＣＣＴＴＧＧＣＣＧＴＴＡＴＡＡＡＧＴＣＴＧＡＣＣＡＧ（配列番号４３２）	該当なし	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ
非標的化ガイド３	ＧＧＡＧＧＧＴＧＡＧＡＡＴＴＴＡＧＡＡＣＣＡＡＧＡＴＴＧＴＴＧ（配列番号４３３）	該当なし	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｃ

【表１３】

表１３：Ｃｌｕｃノックダウンに使用されるガイド配列

名称	スペーサー配列	位置	備考	最初の図
Ｃｌｕｃタイリングガイド1	ＧＡＧＴＣＣＴＧＧＣＡＡＴＧＡＡＣＡＧＴＧＧＣＧＣＡＧＴＡＧ（配列番号４３４）	３２	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド2	ＧＧＧＴＧＣＣＡＣＡＧＣＴＧＣＴＡＴＣＡＡＴＡＣＡＴＴＣＴＣ（配列番号４３５）	１１８	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド3	ＧＴＴＡＣＡＴＡＣＴＧＡＣＡＣＡＴＴＣＧＧＣＡＡＣＡＴＧＴＴ（配列番号４３６）	１９７	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド4	ＧＴＡＴＧＴＡＣＣＡＧＧＴＴＣＣＴＧＧＡＡＣＴＧＧＡＡＴＣＴ（配列番号４３７）	２７６	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド5	ＧＣＣＴＴＧＧＴＴＣＣＡＴＣＣＡＧＧＴＴＣＴＣＣＡＧＧＧＴＧ（配列番号４３８）	３５０	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド6	ＧＣＡＧＴＧＡＴＧＧＧＡＴＴＣＴＣＡＧＴＡＧＣＴＴＧＡＧＣＧ（配列番号４３９）	４３１	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド7	ＧＡＧＣＣＴＧＧＣＡＴＣＴＣＡＡＣＡＡＣＡＧＣＧＡＴＧＧＴＧ（配列番号４４０）	５１２	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ

Ｃｌｕｃタイリングガイド８	ＧＴＧＴＣＴＧＧＧＧＣＧＡＴＴＣＴＴＡＣＡＧＡＴＣＴＴＣＣＴ（配列番号４４１）	５９３	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド９	ＧＣＴＧＧＡＴＣＴＧＡＡＧＴＧＡＡＧＴＣＴＧＴＡＴＣＴＴＣＣ（配列番号４４２）	６７１	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド１０	ＧＧＣＡＡＣＧＴＣＡＴＣＡＧＧＡＴＴＴＣＣＡＴＡＧＡＧＴＧＧ（配列番号４４３）	７４７	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド１１	ＧＡＧＧＣＧＣＡＧＧＡＧＡＴＧＧＴＧＴＡＧＴＡＧＴＡＧＡＡＧ（配列番号４４４）	８３０	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド１３	ＧＡＧＧＧＡＣＣＣＴＧＧＡＡＴＴＧＧＴＡＴＣＴＴＧＣＴＴＴＧ（配列番号４４５）	９８６	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド１４	ＧＧＴＡＡＧＡＧＴＣＡＡＣＡＴＴＣＣＴＧＴＧＴＧＡＡＡＣＣＴ（配列番号４４６）	１０６６	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド１５	ＧＡＣＣＡＧＡＡＴＣＴＧＴＴＴＴＣＣＡＴＣＡＡＣＡＡＴＧＡＧ（配列番号４４７）	１１４３	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ

Ｃｌｕｃタイリングガイド１６	ＧＡＴＧＧＣＴＧＴＡＧＴＣＡＧＴＡＴＧＴＣＡＣＣＡＴＣＴＴＧ（配列番号４４８）	１２２７	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド１７	ＧＴＡＣＣＡＴＣＧＡＡＴＧＧＡＴＣＴＣＴＡＡＴＡＴＧＴＡＣＧ（配列番号４４９）	１３０４	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド１８	ＧＡＧＡＴＣＡＣＡＧＧＣＴＣＣＴＴＣＡＧＣＡＴＣＡＡＡＡＧＡ（配列番号４５０）	１３８０	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド１９	ＧＣＴＴＴＧＡＣＣＧＧＣＧＡＡＧＡＧＡＣＴＡＴＴＧＣＡＧＡＧ（配列番号４５１）	１４６１	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド２０	ＧＣＣＣＣＴＣＡＧＧＣＡＡＴＡＣＴＣＧＴＡＣＡＴＧＣＡＴＣＧ（配列番号４５２）	１５３９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
Ｃｌｕｃタイリングガイド２１	ＧＣＴＧＧＴＡＣＴＴＣＴＡＧＧＧＴＧＴＣＴＣＣＡＴＧＣＴＴＴ（配列番号４５３）	１６１９	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
非標的化ガイド１	ＧＧＴＡＡＴＧＣＣＴＧＧＣＴＴＧＴＣＧＡＣＧＣＡＴＡＧＴＣＴＧ（配列番号４５４）	該当なし	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ

非標的化ガイド2	ＧＧＧＡＡＣＣＴＴＧＧＣＣＧＴＴＡＴＡＡＡＧＴＣＴＧＡＣＣＡＧ（配列番号４５５）	該当なし	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ
非標的化ガイド3	ＧＧＡＧＧＧＴＧＡＧＡＡＴＴＴＡＧＡＡＣＣＡＡＧＡＴＴＧＴＴＧ（配列番号４５６）	該当なし	Ｃａｓ１３ａスペーサーは５’末端で２つのヌクレオチドによって切断されることに注目されたい	４９Ｄ

【表１４】

表１４：哺乳動物細胞におけるＲＮＡ編集のために本研究において使用されるガイド配列。ミスマッチした塩基フリップを大文字にする。

名称	スペーサー配列	備考	最初の図
タイリング３０ｎｔ３０ミスマッチ距離	ｇＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔ（配列番号４５７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング３０ｎｔ２８ミスマッチ距離	ｇａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａ（配列番号４５８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング３０ｎｔ２６ミスマッチ距離	ｇａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃ（配列番号４５９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング３０ｎｔ２４ミスマッチ距離	ｇｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔ（配列番号４６０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング３０ｎｔ２２ミスマッチ距離	ｇｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃ（配列番号４６１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング３０ｎｔ２０ミスマッチ距離	ｇｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔ（配列番号４６２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング３０ｎｔ１８ミスマッチ距離	ｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔ（配列番号４６３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング３０ｎｔ１６ミスマッチ距離	ｇａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａ（配列番号４６４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング３０ｎｔ１４ミスマッチ距離	ｇａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃ（配列番号４６５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング３０ｎｔ１２ミスマッチ距離	ｇｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃ（配列番号４６６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング３０ｎｔ１０ミスマッチ距離	ｇｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇ（配列番号４６７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング３０ｎｔ８ミスマッチ距離	ｇｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃ（配列番号４６８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング３０ｎｔ６ミスマッチ距離	ｇｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔ（配列番号４６９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング３０ｎｔ４ミスマッチ距離	ｇａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃ（配列番号４７０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ

タイリング３０ｎｔ２ミスマッチ距離	ｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａ（配列番号４７１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ５０ミスマッチ距離	ｇＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａ（配列番号４７２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ４８ミスマッチ距離	ｇａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇ（配列番号４７３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ４６ミスマッチ距離	ｇａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃ（配列番号４７４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ４４ミスマッチ距離	ｇｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔ（配列番号４７５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ４２ミスマッチ距離	ｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃ（配列番号４７６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ４０ミスマッチ距離	ｇｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃ（配列番号４７７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ３８ミスマッチ距離	ｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇ（配列番号４７８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ３６ミスマッチ距離	ｇａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃ（配列番号４７９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ３４ミスマッチ距離	ｇａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔ（配列番号４８０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ３２ミスマッチ距離	ｇｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃ（配列番号４８１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ３０ミスマッチ距離	ｇｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔ（配列番号４８２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ

タイリング５０ｎｔ２８ミスマッチ距離	ｇｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａ（配列番号４８３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ２６ミスマッチ距離	ｇｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃ（配列番号４８４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ２４ミスマッチ距離	ｇａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔ（配列番号４８５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ２２ミスマッチ距離	ｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃ（配列番号４８６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ２０ミスマッチ距離	ｇｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔ（配列番号４８７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ１８ミスマッチ距離	ｇａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔ（配列番号４８８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ１６ミスマッチ距離	ｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａ（配列番号４８９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ１４ミスマッチ距離	ｇｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃ（配列番号４９０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ１２ミスマッチ距離	ｇｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃ（配列番号４９１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ１０ミスマッチ距離	ｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇ（配列番号４９２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ８ミスマッチ距離	ｇｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃ（配列番号４９３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ

タイリング５０ｎｔ６ミスマッチ距離	ｇｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔ（配列番号４９４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ４ミスマッチ距離	ｇａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃ（配列番号４９５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング５０ｎｔ２ミスマッチ距離	ｇｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａ（配列番号４９６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ７０ミスマッチ距離	ｇＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇｇｔｔｔａｔ（配列番号４９７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ６８ミスマッチ距離	ｇａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇｇｔｔｔ（配列番号４９８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ６６ミスマッチ距離	ｇａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇｇｔ（配列番号４９９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ６４ミスマッチ距離	ｇｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇ（配列番号５００）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ６２ミスマッチ距離	ｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃ（配列番号５０１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ６０ミスマッチ距離	ｇｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔ（配列番号５０２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ５８ミスマッチ距離	ｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔ（配列番号５０３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ

タイリング７０ｎｔ５６ミスマッチ距離	ｇａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔ（配列番号５０４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ５４ミスマッチ距離	ｇａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔ（配列番号５０５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ５２ミスマッチ距離	ｇｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃ（配列番号５０６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ５０ミスマッチ距離	ｇｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａ（配列番号５０７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ４８ミスマッチ距離	ｇｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇ（配列番号５０８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ４６ミスマッチ距離	ｇｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃ（配列番号５０９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ４４ミスマッチ距離	ｇａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔ（配列番号５１０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ４２ミスマッチ距離	ｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃ（配列番号５１１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ４０ミスマッチ距離	ｇｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃ（配列番号５１２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ

タイリング７０ｎｔ３８ミスマッチ距離	ｇａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇ（配列番号５１３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ３６ミスマッチ距離	ｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃ（配列番号５１４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ３４ミスマッチ距離	ｇｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔ（配列番号５１５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ３２ミスマッチ距離	ｇｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃ（配列番号５１６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ３０ミスマッチ距離	ｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔ（配列番号５１７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ２８ミスマッチ距離	ｇｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａ（配列番号５１８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ２６ミスマッチ距離	ｇｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃ（配列番号５１９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ２４ミスマッチ距離	ｇａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔ（配列番号５２０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ２２ミスマッチ距離	ｇｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃ（配列番号５２１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ

タイリング７０ｎｔ２０ミスマッチ距離	ｇａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔ配列番号５２２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ１８ミスマッチ距離	ｇｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔ（配列番号５２３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ１６ミスマッチ距離	ｇａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａ（配列番号５２４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ１４ミスマッチ距離	ｇａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃ（配列番号５２５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ１２ミスマッチ距離	ｇｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃ（配列番号５２６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ１０ミスマッチ距離	ｇｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇ（配列番号５２７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ８ミスマッチ距離	ｇｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃ（配列番号５２８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ６ミスマッチ距離	ｇｔｔｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔ（配列番号５２９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング７０ｎｔ４ミスマッチ距離	ｇｃｃｔｔｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃ（配列番号５３０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ

タイリング７０ｎｔ２ミスマッチ距離	ｇｔｔｃｃｔｔｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａ（配列番号５３１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ８４ミスマッチ距離	ｇＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇｇｔｔｔａｔｔｔｔｃａｃａｃａｇｔｃｃａ（配列番号５３２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ８２ミスマッチ距離	ｇａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇｇｔｔｔａｔｔｔｔｃａｃａｃａｇｔｃ（配列番号５３３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ８０ミスマッチ距離	ｇａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇｇｔｔｔａｔｔｔｔｃａｃａｃａｇ（配列番号５３４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ７８ミスマッチ距離	ｇｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇｇｔｔｔａｔｔｔｔｃａｃａｃ（配列番号５３５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ７６ミスマッチ距離	ｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇｇｔｔｔａｔｔｔｔｃａｃ（配列番号５３６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ７４ミスマッチ距離	ｇｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇｇｔｔｔａｔｔｔｔｃ（配列番号５３７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ７２ミスマッチ距離	ｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇｇｔｔｔａｔｔｔ（配列番号５３８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ

タイリング８４ｎｔ７０ミスマッチ距離	ｇａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇｇｔｔｔａｔ（配列番号５３９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ６８ミスマッチ距離	ｇａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇｇｔｔｔ（配列番号５４０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ６６ミスマッチ距離	ｇｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇｇｔ（配列番号５４１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ６４ミスマッチ距離	ｇｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃｔｇ（配列番号５４２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ６２ミスマッチ距離	ｇｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔｃｃ（配列番号５４３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ６０ミスマッチ距離	ｇｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔｔｔ（配列番号５４４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ５８ミスマッチ距離	ｇａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔｔｔ（配列番号５４５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ

タイリング８４ｎｔ５６ミスマッチ距離	ｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔｇｔ（配列番号５４６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ５４ミスマッチ距離	ｇｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃａｔ（配列番号５４７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ５２ミスマッチ距離	ｇａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａａｃ（配列番号５４８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ５０ミスマッチ距離	ｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇｃａ（配列番号５４９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ４８ミスマッチ距離	ｇｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃｇｇ（配列番号５５０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ４６ミスマッチ距離	ｇｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔｔｃ（配列番号５５１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ４４ミスマッチ距離	ｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃａｔ（配列番号５５２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ

タイリング８４ｎｔ４２ミスマッチ距離	ｇｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃａｃ（配列番号５５３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ４０ミスマッチ距離	ｇｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇａｃ（配列番号５５４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ３８ミスマッチ距離	ｇａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃｔｇ（配列番号５５５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ３６ミスマッチ距離	ｇｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔａｃ（配列番号５５６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ３４ミスマッチ距離	ｇａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔ（配列番号５５７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ３２ミスマッチ距離	ｇｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃ（配列番号５５８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ３０ミスマッチ距離	ｇａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔ（配列番号５５９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ

タイリング８４ｎｔ２８ミスマッチ距離	ｇａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａ（配列番号５６０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ２６ミスマッチ距離	ｇｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃ（配列番号５６１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ２４ミスマッチ距離	ｇｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔ（配列番号５６２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ２２ミスマッチ距離	ｇｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃ（配列番号５６３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ２０ミスマッチ距離	ｇｔｔｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔ（配列番号５６４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ１８ミスマッチ距離	ｇｃｃｔｔｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔ（配列番号５６５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ１６ミスマッチ距離	ｇｔｔｃｃｔｔｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａ（配列番号５６６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ

タイリング８４ｎｔ１４ミスマッチ距離	ｇｇｇｔｔｃｃｔｔｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃ（配列番号５６７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ１２ミスマッチ距離	ｇｔｔｇｇｔｔｃｃｔｔｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃ（配列番号５６８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ１０ミスマッチ距離	ｇｃｃｔｔｇｇｔｔｃｃｔｔｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇ（配列番号５６９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ８ミスマッチ距離	ｇｇｃｃｃｔｔｇｇｔｔｃｃｔｔｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃ（配列番号５７０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ６ミスマッチ距離	ｇｃｃｇｃｃｃｔｔｇｇｔｔｃｃｔｔｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔ（配列番号５７１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ４ミスマッチ距離	ｇｃｇｃｃｇｃｃｃｔｔｇｇｔｔｃｃｔｔｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃ（配列番号５７２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
タイリング８４ｎｔ２ミスマッチ距離	ｇｇｔｃｇｃｃｇｃｃｃｔｔｇｇｔｔｃｃｔｔｇａｃｃｃａａｃａｃｇｔａｔｇｔａｃｃａｇｇｔｔｃｃｔｇｇａａｃｔｇｇａａｔｃｔｃｔｔｔｃｃａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａ（配列番号５７３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ
ＡＤＡＲ非標的化ガイド	ＧＴＡＡＴＧＣＣＴＧＧＣＴＴＧＴＣＧＡＣＧＣＡＴＡＧＴＣＴＧ（配列番号５７４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５０Ｃ

ＴＡＧモチーフのためのＰＦＳ結合スクリーニングガイド	ｇａａａａｃｇｃａｇｇｔｔｃｃｔｃＣａｇｔｔｔｃｇｇｇａｇｃａｇｃｇｃａｃｇｔｃｔｃｃｃｔｇｔａｇｔｃ（配列番号５７５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５１Ｂ
ＡＡＣモチーフのためのＰＦＳ結合スクリーニングガイド	ｇａｃｇｃａｇｇｔｔｃｃｔｃｔａｇＣｔｔｃｇｇｇａｇｃａｇｃｇｃａｃｇｔｃｔｃｃｃｔｇｔａｇｔｃａａｇ（配列番号５７６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５１Ｂ
ＰＦＳ結合スクリーニング非標的化	ＧＴＡＡＴＧＣＣＴＧＧＣＴＴＧＴＣＧＡＣＧＣＡＴＡＧＴＣＴＧ（配列番号５７７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５１Ｂ
モチーフ嗜好性標的化ガイド	ｇａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔ（配列番号５７８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５１Ｃ
モチーフ嗜好性非標的化ガイド	ＧＴＡＡＴＧＣＣＴＧＧＣＴＴＧＴＣＧＡＣＧＣＡＴＡＧＴＣＴＧ（配列番号５７９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５１Ｃ
ＰＰＩＢタイリングガイド５０ミスマッチ距離	ｇＣａａｇｇｃｃａｃａａａａｔｔａｔｃｃａｃｔｇｔｔｔｔｔｇｇａａｃａｇｔｃｔｔｔｃｃｇａａｇａｇａｃ（配列番号５８０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５７Ｄ
ＰＰＩＢタイリングガイド４２ミスマッチ距離	ｇｃｃｔｇｔａｇｃＣａａｇｇｃｃａｃａａａａｔｔａｔｃｃａｃｔｇｔｔｔｔｔｇｇａａｃａｇｔｃｔｔｔｃｃ（配列番号５８１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５７Ｄ
ＰＰＩＢタイリングガイド３４ミスマッチ距離	ｇｃｔｔｔｃｔｃｔｃｃｔｇｔａｇｃＣａａｇｇｃｃａｃａａａａｔｔａｔｃｃａｃｔｇｔｔｔｔｔｇｇａａｃａ（配列番号５８２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５７Ｄ
ＰＰＩＢタイリングガイド２６ミスマッチ距離	ｇｇｃｃａａａｔｃｃｔｔｔｃｔｃｔｃｃｔｇｔａｇｃＣａａｇｇｃｃａｃａａａａｔｔａｔｃｃａｃｔｇｔｔｔ（配列番号５８３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５７Ｄ
ＰＰＩＢタイリングガイド１８ミスマッチ距離	ｇｔｔｔｔｔｇｔａｇｃｃａａａｔｃｃｔｔｔｃｔｃｔｃｃｔｇｔａｇｃＣａａｇｇｃｃａｃａａａａｔｔａｔｃ（配列番号５８４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５７Ｄ
ＰＰＩＢタイリングガイド１０ミスマッチ距離	ｇａｔｔｔｇｃｔｇｔｔｔｔｔｇｔａｇｃｃａａａｔｃｃｔｔｔｃｔｃｔｃｃｔｇｔａｇｃＣａａｇｇｃｃａｃａ（配列番号５８５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５７Ｄ
ＰＰＩＢタイリングガイド２ミスマッチ距離	ｇａｃｇａｔｇｇａａｔｔｔｇｃｔｇｔｔｔｔｔｇｔａｇｃｃａａａｔｃｃｔｔｔｃｔｃｔｃｃｔｇｔａｇｃＣａ（配列番号５８６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５７Ｄ

標的化ガイド、対向塩基G	ｇａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃ Ｇａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃ ｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔ （配列番号５８７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５７Ｄ
標的化ガイド、対向塩基Ａ	ｇａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃ Ａａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃ ｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔ （配列番号５８８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５７Ｄ
標的化ガイド、対向塩基Ｃ	ｇａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃ Ｔａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃ ｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔ （配列番号５８９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５７Ｄ
ＡＶＰＲ２ガイド３７ミスマッチ距離	ｇｇｔｃｃｃａｃｇｃｇｇｃｃＣａｃ ａｇｃｔｇｃａｃｃａｇｇａａｇａａ ｇｇｇｔｇｃｃｃａｇｃａｃａｇｃａ （配列番号５９０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ａ
ＡＶＰＲ２ガイド３５ミスマッチ距離	ｇｇｇｇｔｃｃｃａｃｇｃｇｇｃｃＣ ａｃａｇｃｔｇｃａｃｃａｇｇａａｇ ａａｇｇｇｔｇｃｃｃａｇｃａｃａｇ （配列番号５９１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ａ
ＡＶＰＲ２ガイド３３ミスマッチ距離	ｇｃｃｇｇｇｔｃｃｃａｃｇｃｇｇｃ ｃＣａｃａｇｃｔｇｃａｃｃａｇｇａ ａｇａａｇｇｇｔｇｃｃｃａｇｃａｃ （配列番号５９２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ａ
ＦＡＮＣＣガイド３７ミスマッチ距離	ｇｇｇｔｇａｔｇａｃａｔｃｃＣａｇ ｇｃｇａｔｃｇｔｇｔｇｇｃｃｔｃｃ ａｇｇａｇｃｃｃａｇａｇｃａｇｇａ （配列番号５９３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｂ
ＦＡＮＣＣガイド３５ミスマッチ距離	ｇａｇｇｇｔｇａｔｇａｃａｔｃｃＣ ａｇｇｃｇａｔｃｇｔｇｔｇｇｃｃｔ ｃｃａｇｇａｇｃｃｃａｇａｇｃａｇ （配列番号５９４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｂ
ＦＡＮＣＣガイド３２ミスマッチ距離	ｇａｔｃａｇｇｇｔｇａｔｇａｃａｔ ｃｃＣａｇｇｃｇａｔｃｇｔｇｔｇｇ ｃｃｔｃｃａｇｇａｇｃｃｃａｇａｇ （配列番号５９５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｂ
合成疾患遺伝子標的ＩＬ２ＲＧ	ｇｇｔｇｇｃｔｃｃａｔｔｃａｃｔｃ Ｃａａｔｇｃｔｇａｇｃａｃｔｔｃｃ ａｃａｇａｇｔｇｇｇｔｔａａａｇｃ （配列番号５９６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的Ｆ８	ｇｔｔｔｃｔａａｔａｔａｔｔｔｔｇ Ｃｃａｇａｃｔｇａｔｇｇａｃｔａｔ ｔｃｔｃａａｔｔａａｔａａｔｇａｔ （配列番号５９７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ

合成疾患遺伝子標的 ＬＤＬＲ	ｇａｇａｔｇｔｔｇｃｔｇｔｇｇａｔ Ｃｃａｇｔｃｃａｃａｇｃｃａｇｃｃ ｃｇｔｃｇｇｇｇｇｃｃｔｇｇａｔｇ （配列番号５９８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＣＢＳ	ｇｃａｇｇｃｃｇｇｃｃｃａｇｃｔｇ Ｃｃａｇｇｔｇｃａｃｃｔｇｃｔｃｇ ｇａｇｃａｔｃｇｇｇｃｃｇｇａｔｃ （配列番号５９９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＨＢＢ	ｇｃａａａｇａａｃｃｔｃｔｇｇｇｔ Ｃｃａａｇｇｇｔａｇａｃｃａｃｃａ ｇｃａｇｃｃｔｇｃｃｃａｇｇｇｃｃ （配列番号６００）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＡＬＤＯＢ	ｇａａｇａｇａａａｃｔｔａｇｔｔｔ Ｃｃａｇｇｇｃｔｔｔｇｇｔａｇａｇ ｇｇｃａａａｇｇｔｔｇａｔａｇｃａ （配列番号６０１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＤＭＤ	ｇｔｃａｇｃｃｔａｇｔｇｃａｇａｇ Ｃｃａｃｔｇｇｔａｇｔｔｇｇｔｇｇ ｔｔａｇａｇｔｔｔｃａａｇｔｔｃｃ （配列番号６０２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＳＭＡＤ４	ｇｇｃｔｃａｔｔｇｔｇａａｃａｇｇ Ｃｃａｇｔａａｔｇｔｃｃｇｇｇａｔ ｇｇｇｇｃｇｇｃａｔａｇｇｃｇｇｇ （配列番号６０３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＢＲＣＡ２	ｇｔａｇｃｔａａａｇａａｃｔｔｇａ Ｃｃａａｇａｃａｔａｔｃａｇｇａｔ ｃｃａｃｃｔｃａｇｃｔｃｃｔａｇａ （配列番号６０４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＧＲＩＮ２Ａ	ｇｇｇｇｃａｔｔｇｔｔｃｔｇｔｇｃ Ｃｃａｇｔｃｃｔｇｃｔｇｇｔａｇａ ｃｃｔｇｃｔｃｃｃｃｇｇｔｇｇｃｔ （配列番号６０５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＳＣＮ９Ａ	ｇａｇａａｇｔｃｇｔｔｃａｔｇｔｇ Ｃｃａｃｃｇｔｇｇｇａｇｃｇｔａｃ ａｇｔｃａｔｃａｔｔｇａｔｃｔｔｇ （配列番号６０６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＴＡＲＤＢＰ	ｇｇｇａｔｔａａｔｇｃｔｇａａｃｇ Ｃａｃｃａａａｇｔｔｃａｔｃｃｃａ ｃｃａｃｃｃａｔａｔｔａｃｔａｃｃ （配列番号６０７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＣＦＴＲ	ｇｃｔｃｃａａａｇｇｃｔｔｔｃｃｔ Ｃｃａｃｔｇｔｔｇｃａａａｇｔｔａ ｔｔｇａａｔｃｃｃａａｇａｃａｃａ （配列番号６０８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ

合成疾患遺伝子標的 ＵＢＥ３Ａ	ｇａｔｇａａｔｇａａｃｇａｔｔｔｃ Ｃｃａｇａａｃｔｃｃｃｔａａｔｃａ ｇａａｃａｇａｇｔｃｃｃｔｇｇｔａ （配列番号６０９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＳＭＰＤ１	ｇｇａｇｃｃｔｃｔｇｃｃｇｇａｇｃ Ｃｃａｇａｇａａｃｃｃｇａｇａｇｔ ｃａｇａｃａｇａｇｃｃａｇｃｇｃｃ （配列番号６１０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＵＳＨ２Ａ	ｇｇｃｔｔｃｃｇｔｇｇａｇａｃａｃ Ｃｃａａｔｃａａｔｔｔｇａａｇａｇ ａｔｃｔｔｇａａｇｔｇａｔｇｃｃａ （配列番号６１１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＭＥＮ１	ｇｔｇｇｇａｃｔｇｃｃｃｔｃｃｔｃ Ｃｃａｔｔｔｇｃａｇａｔｇｃｃｇｔ ｃｇｔａｇａａｔｃｇｃａｇｃａｇｇ （配列番号６１２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 Ｃ８ｏｒｆ３７	ｇｃｔｔｃｔｔｃａａｔａｇｔｔｃｔ Ｃｃａｇｃｔａｃａｃｔｇｇｃａｇｇ ｃａｔａｔｇｃｃｃｇｔｇｔｔｃｃｔ （配列番号６１３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＭＬＨ１	ｇａｔｔｃｃｔｔｔｔｃｔｔｃｇｔｃ Ｃｃａａｔｔｃａｃｃｔｃａｇｔｇｇ ｃｔａｇｔｃｇａａｇａａｔｇａａｇ （配列番号６１４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＴＳＣ２	ｇｃａｇｃｔｔｃａｇｃａｃｃｔｔｃ Ｃａｇｔｃａｇａｃｔｃｃｔｇｃｔｔ ｃａａｇｃａｃｔｇｃａｇｃａｇｇａ （配列番号６１５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＮＦ１	ｇｃｃａｔｔｔｇｃｔｔｇｃａｇｔｇ Ｃｃａｃｔｃｃａｇａｇｇａｔｔｃｃ ｇｇａｔｔｇｃｃａｔａａａｔａｃｔ （配列番号６１６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＭＳＨ６	ｇｔｔｃａａｔａｇｔｔｔｔｇｇｔｃ Ｃａｇｔａｔｃｇｔｔｔａｃａｇｃｃ ｃｔｔｃｔｔｇｇｔａｇａｔｔｔｃａ （配列番号６１７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＳＭＮ１	ｇｇｃａａｃｃｇｔｃｔｔｃｔｇａｃ Ｃａａａｔｇｇｃａｇａａｃａｔｔｔ ｇｔｃｃｃｃａａｃｔｔｔｃｃａｃｔ （配列番号６１８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＳＨ３ＴＣ２	ｇｃｇａｃｔｔｔｃｃａａｔｇａａｃ Ｃａｃｔｇａａｇｃｃｃａｇｇｔａｔ ｇａｃａａａｇｃｃｇａｔｇａｔｃｔ （配列番号６１９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ

合成疾患遺伝子標的 ＤＮＡＨ５	ｇｔｔｔａｃａｃｔｃａｔｇｃｔｔｃ Ｃａｃａｇｃｔｔｔａａｃａｇａｔｃ ａｔｔｔｇｇｔｔｃｃｔｔｇａｔｇａ （配列番号６２０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＭＥＣＰ２	ｇｃｔｔａａｇｃｔｔｃｃｇｔｇｔｃ Ｃａｇｃｃｔｔｃａｇｇｃａｇｇｇｔ ｇｇｇｇｔｃａｔｃａｔａｃａｔｇｇ （配列番号６２１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＡＤＧＲＶ１	ｇｇａｃａｇｃｔｇｇｇｃｔｇａｔｃ Ｃａｔｇａｔｇｔｃａｔｃｃａｇａａ ａｃａｃｔｇｇｇｇａｃｃｃｔｃａｇ （配列番号６２２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＡＨＩ１	ｇｔｃｔｃａｔｃｔｃａａｃｔｔｔｃ Ｃａｔａｔｃｃｇｔａｔｃａｔｇｇａ ａｔｃａｔａｇｃａｔｃｃｔｇｔａａ （配列番号６２３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＰＲＫＮ	ｇｃａｔｇｃａｇａｃｇｃｇｇｔｔｃ Ｃａｃｔｃｇｃａｇｃｃａｃａｇｔｔ ｃｃａｇｃａｃｃａｃｔｃｇａｇｃｃ （配列番号６２４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＣＯＬ３Ａ１	ｇｔｔｇｇｔｔａｇｇｇｔｃａａｃｃ Ｃａｇｔａｔｔｃｔｃｃａｃｔｃｔｔ ｇａｇｔｔｃａｇｇａｔｇｇｃａｇａ （配列番号６２５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＢＲＣＡ１	ｇｃｔａｃａｃｔｇｔｃｃａａｃａｃ Ｃｃａｃｔｃｔｃｇｇｇｔｃａｃｃａ ｃａｇｇｔｇｃｃｔｃａｃａｃａｔｃ （配列番号６２６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＭＹＢＰＣ３	ｇｃｔｇｃａｃｔｇｔｇｔａｃｃｃｃ Ｃａｇａｇｃｔｃｃｇｔｇｔｔｇｃｃ ｇａｃａｔｃｃｔｇｇｇｇｔｇｇｃｔ （配列番号６２７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＡＰＣ	ｇａｇｃｔｔｃｃｔｇｃｃａｃｔｃｃ Ｃａａｃａｇｇｔｔｔｃａｃａｇｔａ ａｇｃｇｃｇｔａｔｃｔｇｔｔｃｃａ （配列番号６２８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
合成疾患遺伝子標的 ＢＭＰＲ２	ｇａｃｇｇｃａａｇａｇｃｔｔａｃｃ Ｃａｇｔｃａｃｔｔｇｔｇｔｇｇａｇ ａｃｔｔａａａｔａｃｔｔｇｃａｔａ （配列番号６２９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５２Ｅ
ＫＲＡＳタイリング ガイド５０ミスマッチ距離	ｇＣａａｇｇｃｃａｃａａａａｔｔａ ｔｃｃａｃｔｇｔｔｔｔｔｇｇａａｃ ａｇｔｃｔｔｔｃｃｇａａｇａｇａｃ （配列番号６３０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５３Ａ

ＫＲＡＳタイリングガイド４２ミスマッチ距離	ｇｃｃｔｇｔａｇｃＣａａｇｇｃｃａｃａａａａｔｔａｔｃｃａｃｔｇｔｔｔｔｔｇｇａａｃａｇｔｃｔｔｔｃｃ（配列番号６３１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５３Ａ
ＫＲＡＳタイリングガイド３４ミスマッチ距離	ｇｃｔｔｔｃｔｃｔｃｃｔｇｔａｇｃＣａａｇｇｃｃａｃａａａａｔｔａｔｃｃａｃｔｇｔｔｔｔｔｇｇａａｃａ（配列番号６３２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５３Ａ
ＫＲＡＳタイリングガイド２６ミスマッチ距離	ｇｇｃｃａａａｔｃｃｔｔｔｃｔｃｔｃｃｔｇｔａｇｃＣａａｇｇｃｃａｃａａａａｔｔａｔｃｃａｃｔｇｔｔｔ（配列番号６３３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５３Ａ
ＫＲＡＳタイリングガイド１８ミスマッチ距離	ｇｔｔｔｔｔｇｔａｇｃｃａａａｔｃｃｔｔｔｃｔｃｔｃｃｔｇｔａｇｃＣａａｇｇｃｃａｃａａａａｔｔａｔｃ（配列番号６３４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５３Ａ
ＫＲＡＳタイリングガイド１０ミスマッチ距離	ｇａｔｔｔｇｃｔｇｔｔｔｔｔｇｔａｇｃｃａａａｔｃｃｔｔｔｃｔｃｔｃｃｔｇｔａｇｃＣａａｇｇｃｃａｃａ（配列番号６３５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５３Ａ
ＫＲＡＳタイリングガイド２ミスマッチ距離	ｇａｃｇａｔｇｇａａｔｔｔｇｃｔｇｔｔｔｔｔｇｔａｇｃｃａａａｔｃｃｔｔｔｃｔｃｔｃｃｔｇｔａｇｃＣａ（配列番号６３６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５３Ａ
ＫＲＡＳタイリング非標的化ガイド	ＧＴＡＡＴＧＣＣＴＧＧＣＴＴＧＴＣＧＡＣＧＣＡＴＡＧＴＣＴＧ（配列番号６３７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５３Ａ
トランスクリプトーム特異性のルシフェラーゼＷ８５Ｘ標的化ガイド	ｇａｔａｇａａｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃｔｇｃａｔｔｃａａｔｔａｃａｔ（配列番号６３８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５３Ｂ
トランスクリプトーム特異性の非標的化ガイド	ＧＣＡＧＧＧＴＴＴＴＣＣＣＡＧＴＣＡＣＧＡＣＧＴＴＧＴＡＡＡＧＴＴＧ（配列番号６３９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５３Ｃ
内因性ＫＲＡＳガイド２	ｇｔｃａａｇｇｃａｃｔｃｔｔｇｃｃＣａｃｇｃｃａｃｃａｇｃｔｃｃａａｃｔａｃｃａｃａａｇｔｔｔａｔａｔ（配列番号６４０）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５４Ｆ
内因性ＰＰＩＢガイド１	ｇｃａａａｇａｔｃａｃｃｃｇｇｃｃＣａｃａｔｃｔｔｃａｔｃｔｃｃａａｔｔｃｇｔａｇｇｔｃａａａａｔａｃ（配列番号６４１）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５４Ｇ
内因性ＫＲＡＳガイド１	ＧｃｇｃｃａｃｃａｇｃｔｃｃａａｃＣａｃｃａｃａａｇｔｔｔａｔａｔｔｃａｇｔｃａｔｔｔｔｃａｇｃａｇｇ（配列番号６４２）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５４Ｆ

内因性ＫＲＡＳガイド３	ＧｔｔｔｃｔｃｃａｔｃａａｔｔａｃＣａｃｔｔｇｃｔｔｃｃｔｇｔａｇｇａａｔｃｃｔｃｔａｔｔＧＴｔｇｇａ（配列番号６４３）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５４Ｆ
内因性ＰＰＩＢガイド２	ＧｃｔｔｔｃｔｃｔｃｃｔｇｔａｇｃＣａａｇｇｃｃａｃａａａａｔｔａｔｃｃａｃｔｇｔｔｔｔｔｇｇａａｃａ（配列番号６４４）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５４Ｇ
内因性非標的化ガイド	ＧＴＡＡＴＧＣＣＴＧＧＣＴＴＧＴＣＧＡＣＧＣＡＴＡＧＴＣＴＧ（配列番号６４５）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	５４Ｆ
ＢｏｘＢ　Ｃｌｕｃガイド	ｔｃｔｔｔｃｃａｔａＧＧＣＣＣＴＧＡＡＡＡＡＧＧＧＣＣｔｇｔｔｃｔａａａｃＣａｔｃｃｔｇｃｇｇｃｃｔｃｔａｃｔｃＧＧＣＣＣＴＧＡＡＡＡＡＧＧＧＣＣａｔｔｃａａｔｔａｃ（配列番号６４６）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	６２Ｂ
ＢｏｘＢ非標的化ガイド	ｃａｇｃｔｇｇｃｇａＧＧＣＣＣＴＧＡＡＡＡＡＧＧＧＣＣｇｇｇｇａｔｇｔｇｃＣｇｃａａｇｇｃｇａｔｔａａｇｔｔｇｇＧＧＣＣＣＴＧＡＡＡＡＡＧＧＧＣＣａｃｇｃｃａｇｇｇｔ（配列番号６４７）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	６２Ｂ
Ｓｔａｆｆｏｒｓｔ全長ＡＤＡＲ２ガイド１	ＧＴＧＧＡＡＴＡＧＴＡＴＡＡＣＡＡＴＡＴＧＣＴＡＡＡＴＧＴＴＧＴＴＡＴＡＧＴＡＴＣＣＣＡＣｔｃｔａａａＣＣＡｔｃｃｔｇｃｇＧＧＧＣＣＣＴＣＴＴＣＡＧＧＧＣＣＣ（配列番号６４８）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	６２Ｃ
Ｓｔａｆｆｏｒｓｔ全長ＡＤＡＲ２非標的化ガイド	ＧＴＧＧＡＡＴＡＧＴＡＴＡＡＣＡＡＴＡＴＧＣＴＡＡＡＴＧＴＴＧＴＴＡＴＡＧＴＡＴＣＣＣＡＣａｃｃｃｔｇｇｃｇｔｔａｃｃｃａＧＧＧＣＣＣＴＣＴＴＣＡＧＧＧＣＣＣ（配列番号６４９）	Ｕ６発現について５’Ｇを有する	６２Ｃ

参考文献

１．Ｐ．Ｄ．Ｈｓｕ，Ｅ．Ｓ．Ｌａｎｄｅｒ，Ｆ．Ｚｈａｎｇ，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９ ｆｏｒ ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ．Ｃｅｌｌ １５７，１２６２－１２７８（２０１４）。
２．Ａ．Ｃ．Ｋｏｍｏｒ，Ａ．Ｈ．Ｂａｄｒａｎ，Ｄ．Ｒ．Ｌｉｕ，ＣＲＩＳＰＲ－Ｂａｓｅｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ Ｇｅｎｏｍｅｓ．Ｃｅｌｌ １６８，２０－３６（２０１７）。
３．Ｌ．Ｃｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘ ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｕｓｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３９，８１９－８２３（２０１３）。
４．Ｐ．Ｍａｌｉ ｅｔ ａｌ．，ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｈｕｍａｎ ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｖｉａ Ｃａｓ９．Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３９，８２３－８２６（２０１３）。
５．Ｂ．Ｚｅｔｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｐｆ１ ｉｓ ａ ｓｉｎｇｌｅ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｅｎｄｏｎｕｃｌｅａｓｅ ｏｆ ａ ｃｌａｓｓ ２ ＣＲＩＳＰＲ

−Cas system. Cell 163, 759−771 (2015)。
6. H. Kim, J. S. Kim, A guide to genome engineering with programmable nucleases. Nat Rev Genet 15, 321−334 (2014)。
7. A. C. Komor, Y. B. Kim, M. S. Packer, J. A. Zuris, D. R. Liu, Programmable editing of a target base in genomic DNA without double−stranded DNA cleavage. Nature 533, 420−424 (2016)。
8. K. Nishida et al., Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. Science 353, (2016)。
9. Y. B. Kim et al., Increasing the genome−targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9−cytidine deaminase fusions. Nat Biotechnol 35, 371−376 (2017)。
10. O. O. Abudayyeh et al., C2c2 is a single−component programmable RNA−guided RNA−targeting CRISPR effector. Science 353, aaf5573 (2016)。
11. S. Shmakov et al., Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR−Cas Systems. Mol Cell 60, 385−397 (2015)。
12. S. Shmakov et al., Diversity and evolution of class 2 CRISPR−Cas systems. Nat Rev Microbiol 15, 169−182 (2017)。
13. A. A. Smargon et al., Cas13b Is a Type VI−B CRISPR−Associated RNA−Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28. Mol Cell 65, 618−630 e617 (2017)。
14. J. S. Gootenberg et al., Nucleic acid detection with CRISPR−Cas13a／C2c2. Science 356, 438−442 (2017)。
15. O. O. Abudayyeh et al., RNA targeting with CRISPR−Cas13a. Nature in press, (2017)。
16. K. Nishikura, Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. Annu Rev Biochem 79, 321−349 (2010)。
17. B. L. Bass, H. Weintraub, An unwinding activity that covalently modifies its double−stranded RNA substrate. Cell 55, 1089−1098 (1988)。
18. M. M. Matthews et al., Structures of human ADAR2 bound to dsRNA reveal base−flipping mechanism and basis for site selec

tivity. Nat Struct Mol Biol 23, 426-433 (2016)。
19. A. Kuttan, B. L. Bass, Mechanistic insights into editing-site specificity of ADARs. Proc Natl Acad Sci USA 109, E3295-3304 (2012)。
20. S. K. Wong, S. Sato, D. W. Lazinski, Substrate recognition by ADAR1 and ADAR2. RNA 7, 846-858 (2001)。
21. M. Fukuda et al., Construction of a guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilising intracellular A-to-I RNA editing. Sci Rep 7, 41478 (2017)。
22. M. F. Montiel-Gonzalez, I. Vallecillo-Viejo, G. A. Yudowski, J. J. Rosenthal, Correction of mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by site-directed RNA editing. Proc Natl Acad Sci USA 110, 18285-18290 (2013)。
23. M. F. Montiel-Gonzalez, I. C. Vallecillo-Viejo, J. J. Rosenthal, An efficient system for selectively altering genetic information within mRNAs. Nucleic Acids Res 44, e157 (2016)。
24. J. Wettengel, P. Reautschnig, S. Geisler, P. J. Kahle, T. Stafforst, Harnessing human ADAR2 for RNA repair - Recoding a PINK1 mutation rescues mitophagy. Nucleic Acids Res 45, 2797-2808 (2017)。
25. Y. Wang, J. Havel, P. A. Beal, A Phenotypic Screen for Functional Mutants of Human Adenosine Deaminase Acting on RNA 1. ACS Chem Biol 10, 2512-2519 (2015)。
26. K. A. Lehmann, B. L. Bass, Double-stranded RNA adenosine deaminases ADAR1 and ADAR2 have overlapping specificities. Biochemistry 39, 12875-12884 (2000)。
27. Y. Zheng, C. Lorenzo, P. A. Beal, DNA editing in DNA/RNA hybrids by adenosine deaminases that act on RNA. Nucleic Acids Res 45, 3369-3377 (2017)。
28. K. Gao et al., A de novo loss-of-function GRIN2A mutation associated with childhood focal epilepsy and acquired epileptic aphasia. PLoS One 12, e0170818 (2017)。
29. H. M. Lanoiselee et al., APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. PLoS Med 14, e1002270 (2017)。

30. C. Ballatore, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. Nat Rev Neurosci 8, 663-672 (2007).
31. Y. Li et al., Carriers of rare missense variants in IFIH1 are protected from psoriasis. J Invest Dermatol 130, 2768-2772 (2010).
32. R. S. Finkel et al., Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. Lancet 388, 3017-3026 (2016).

【0942】

実施例4

ＡＤＡＲ活性に影響を及ぼすＡＤＡＲにおける変異を、酵母スクリーニングを用いてスクリーニングした。スクリーニングを複数ラウンド実施した。スクリーニングの各ラウンドは、一連の候補変異を得た。次いで、候補変異を哺乳動物細胞において検証した。最高性能の変異を最終バージョンの変異に添加し、再スクリーニングした。８ラウンドでスクリーニングされた変異を以下の表に示す。ラウンドｎにおいて特定された変異体を「ＲＥＳＣＵＥ　ｖｎ」と指定した。本明細書で考察されるように、ＲＥＳＣＵＥは、アデノシンデアミナーゼ活性をシチジンデアミナーゼ活性に変換する変異を指す。

RESCUE ラウンド	ADAR変異	プラスミド数
RESCUEv0	E488Q	pAB0048
RESCUEv1	E488Q、V351G	
RESCUEv2	E488Q、V351G、S486A	
RESCUEv3	E488Q、V351G、S486A、T375S	pAB0642
RESCUEv4	E488Q、V351G、S486A、T375S、S370C、	pAB1072
RESCUEv5	E488Q、V351G、S486A、T375S、S370C、P462A	pAB1135
RESCUEv6	E488Q、V351G、S486A、T375S、S370C、P462A、N597I	pAB1146

【0943】

追加のＡＤＡＲ変異もスクリーニングした。これらの変異の活性を試験した（図６９）。スクリーニングにおいて、変異Ｐ４６２Ａは、試験された全てのモチーフでより良く機能した（図７０）。変異Ｐ４６２はモチーフを改善した（図７１）。

【0944】

出願者は、特定の活性を増強する別の変異Ｎ５７９Ｉをさらに特定した（図７２）。Ｎ５７９Ｉを、この変異をＲＥＳＣＵＥｖ３（すなわち、ｐＡＢ０６４２）、ＲＥＳＣＵＥｖ４（すなわち、ｐＡＢ１０７２）、ＲＥＳＣＵＥｖ５（すなわち、ｐＡＢ１１３５）、及びＲＥＳＣＵＥｖ６（すなわち、ｐＡＢ１１４６）に添加することによって検証した。プラスミドｐＡＢ１１４３及びｐＡＢ１１４４は、それぞれ、ＲＥＳＣＵＥｖ４及びＲＥＳＣＵＥｖ５でＧ３３３Ａであった（図７３）。

【0945】

出願者はまた、３０ｂｐのガイドを有するＲＥＳＣＵＥｖ３の性能を試験した（図７４）。３０ｂｐのガイドを以下のように名付けた：第１の数はガイドの長さ（すなわち、３０ｂｐ）であり、第２の数はガイドの５’端からのミスマッチの位置である。

【0946】

次いで、出願者は、５０ｂｐのガイドを２つの３０ｂｐのガイド（３０＿５及び３０＿１１）と比較した。これらのガイドを有するＲＥＳＣＵＥ変異体の様々なモチーフにおける活性を図７５に示す。結果は、ＲＥＳＣＵＥｖ６が全ての５’モチーフ（ＴＣ、ＧＣ、ＡＣ、及びＣＣ）において全ての他の構築物を上回り、各潜在的モチーフにおいて１０％超の編集を可能にしたことを示す。ＧＣの最適なガイド設計は、ＴＣ、ＡＣ、及びＣＣの設計とはわずかに異なっていたことに留意されたい。したがって、本明細書に提供されるのは、各実施形態のガイド設計を最適化するためのプロセスである。

【０９４７】

ある特定の実施形態では、デアミナーゼドメイン単独または標的化Ｃａｓ１３ガイドと共に送達された全長ＡＤＡＲにおけるＲＥＳＣＵＥ変異の位置は、編集を可能にしなかった。デアミナーゼドメインは、プログラム可能な活性のためにＣａｓ１３に融合されたときに活性を示した（図７６）。

＊＊＊

【０９４８】

本発明の説明される方法、医薬組成物、及びキットの様々な修正及び変形は、本発明の範囲及び趣旨から逸脱することなく当業者には明らかであろう。本発明は、特定の実施形態に関連して説明されているが、さらなる修正が可能であり、特許請求される本発明は、そのような特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことが理解されるであろう。実際に、当業者には明らかである本発明を実施するために説明された様式の様々な修正は、本発明の範囲内であることが意図される。本出願は、一般的に、本発明の原理に従った本発明の任意の変形、使用、または適応を網羅することを意図しており、本開示からのそのような逸脱を含むことは、本発明が関連する技術分野内の既知の慣習の範囲内にあり、記載される前に本明細書の本質的な特徴に適用され得る。

【図１】

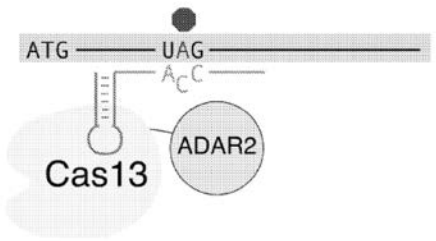


図１

【図２】

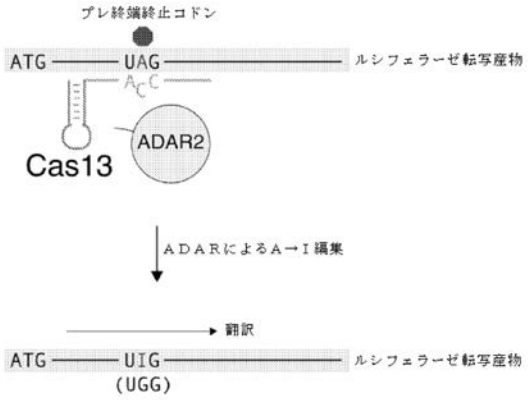


図２

【図３】

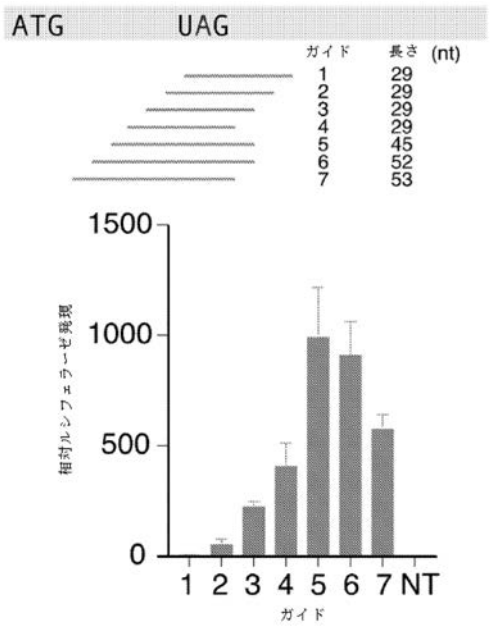


図３

【図４－１】

ＡＤＡＲ名	タンパク質配列
Homo sapiens_ADAR2_E_Q_変異体（配列番号６５０）	QLHLPQVLADAVSRLVLGKFGDLTDNFSSPHARRKVLAGVVMT TGTDVKDAKVISVSTGTKCINGEYMSDRGLALNDCHAEIISRRSL LRFLYTQLELYLNNKDDQKRSIFQKSERGGFRLKENVQFHLYIST SPCGDARIFSPHEPILEEPADRHPNRKARGQLRTKIESGQGTIPVR SNASIQTWDGVLQGERLLTMSCSDKIARWNVVGIQGSLLSIFVEP IYFSSIILGSLYHGDHLSRAMYQRISNIEDLPPLYTLNKPLLSGISN AEARQPGKAPNFSVNWTVGDSAIEVINATTGKDELGRASRLCKH ALYCRWMRVHGKVPSHLLRSKITKPNVYHESKLAAKEYQAAKA RLFTAFIKAGLGAWVEKPTEQDQFSLT*
Homo sapiens_ADAR1_E_Q_変異体（配列番号６５１）	SLGTGNRCVKGDSLSLKGETVNDCHAEIISRRGFIRFLYSELMKY NSQTAKDSIFEPAKGGEKLQIKKTVSFHLYISTAPCGDGALFDKS CSDRAMESTESRHYPVFENPKQGKLRTKVENGQGTIPVESSDIVP TWDGIRLGERLRTMSCSDKILRWNVLGLQGALLTHFLQPIYLKS VTLGYLFSQGHLTRAICCRVTRDGSAFEDGLRHPFIVNHPKVGR VSIYDSKRQSGKTKETSVNWCLADGYDLEILDGTRGTVDGPRNE LSRVSKKNIFLLFKKLCSFRYRRDLLRLSYGEAKKAARDYETAK NYFKKGLKDMGYGNWISKPQEEKNF
Octopus vulgaris_ADAR1_E_Q_変異体（配列番号６５２）	SVGTGNRCLTGDHLSLEGNSVNDSHAEMITRRGFLRYLYRHLLE YDAEVPNDLFEKGERSICRIKTNITFHLYISTAPCGDGALFSPRDT DSSNAKMEEENKHIHNPTFSSSVQGLLRTKVEGGQGTIPIDADFT EQTWDGIQRGERLRTMSCSDKICRWNVVGLQGALLSHFIEPIYL DSLTLGYLYDHGHLARAVCCRIERGEASVNQLLPEGYRLNHPW LGRVTACDPPRETQKTKSLSINWCYDDEKSEVLDGTAGICYTAIE KNLFSRLTKHNLYEEFKRVCRKFDRNDLLTAPSYNKAKMMATP FQTAKNVMLKKLKENNCGTWVSKPIEEEMF
Sepia_ADAR1_E_Q_変異体（配列番号６５３）	SVGTGNRCLTGDRLSLEGNSVNDSHAEMVTRRGFLRYLYKHLL EYDPEKPHDLFEKGERSLCRIKTNITFHLYISTAPCGDGALFSPRD TDSSNVKVDEENKHVHNPTFSSSVQGLLRTKVEGGQGTIPIDADF TEQTWDGIQRGERLRTMSCSDKICRWNVVGLQGALLSHFVEPIY LESLTLGYLYDHGHLARAVCCRIERGEASVNQLLPEGYRLNHPW LGRVTACDPPRETQKTKSLSINWCYDDEKSEVLDGTAGICYTAIE KNLFSRLTKHSLYEEFKKVCQKFEREDLLNVTSYNKAKMMAIPF QTAKNVMLKKLKENNCGTWVSKPIEEEMF

図４

【図４－２】

Octopus vulgaris_ADAR2_E_Q_変異体（配列番号６５４）	GIGTGTKCINGEHMSDRGFGVNDCHAEIIARRCFLRYIYDQLELH LSDNSDVRNSSIFELRDKGGYQLKENIQFHLYISTAPCGDARIFSP HGQDVETGDRHPNRKARGQLRTKIESGQGTIPVRTSGVIQTWDG VLEGERLLTMSCSDKIARWNVLGIQGSLLSHFMNPIYLESIILGSL YHSDHLSRAMYSRISIIENLPEPFHLNRPFLSGISSPESRQPGKAPN FGINWRKEDETFEVINAMTGRVEGGSVSRICKQALFGRFMSLYG KLSSLTGQSVTTRPTHYSDAKAAVMEYQLAKQCVFQAFQKAGL GNWVQKPIEQDQF
Sepia_ADAR2_E_Q_変異体（配列番号６５５）	GIGTGTKCINGEYMNDRGFAVNDCHAEIIARRCFLRFIYDQLEMH LSEDPEVRGQSVFELRDGGGYKLKPNIHFHLYISTAPCGDARIFSP HGQDVETGDRHPNRKARGQLRTKIESGQGTIPVRSSGFIQTWDG VLEGERLLTMSCSDKIARWNVLGIQGALLCHFMHPIYLESIILGSL YHSDHLSRAVYCRIASIENLPDLFQLNRPFLSGISSPESRQPGKAP NFGINWRRNDDTFEVINAMTGRVEGGNMSRICKQALFDRFMNL YGRLSSLTGQSVTTRPALYSEAKATVMEYQLAKQCVFQAFQKA GLGNWVQKPIEQDQF
Doryteusthis opalescens_ADAR2_E_Q_変異体（配列番号６５６）	GIGTGTKCINGEYMNDRGFAVNDCHAEIIARRCFLRFIYDQLELH LSDNAEVRGQSIFELRDAGGYKLKPNIQFHLYISTAPCGDARIFSP HGQDVETGDRHPNRKARGQLRTKIESGQGTIPVRSSGFIQTWDG VLEGERLLTMSCSDKIARWNVLGVQGALLCHFMHPIYLESIILGS LYHSDHLSRAVYCRIAAIENLPDLFRLNRPFLSGISSPESRQPGKA PNFGINWRRNDDSFEVINAMTGRVEGGSMSRICKQALFDRFMNL YGKLSSLTGQSVTTRPALYSEAKATVMEYQLAKQCVFQAFQKA GLGNWVQKPIEQDQF

図４（続き）

【図５】

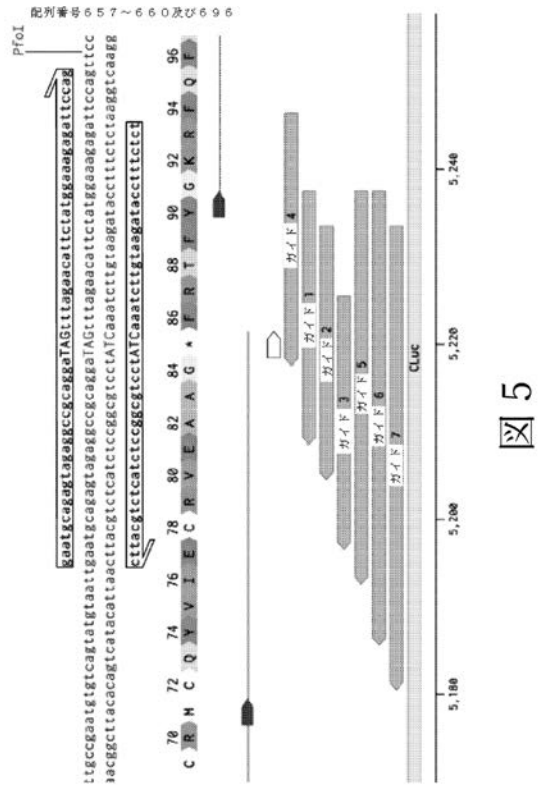


図５

【図６】

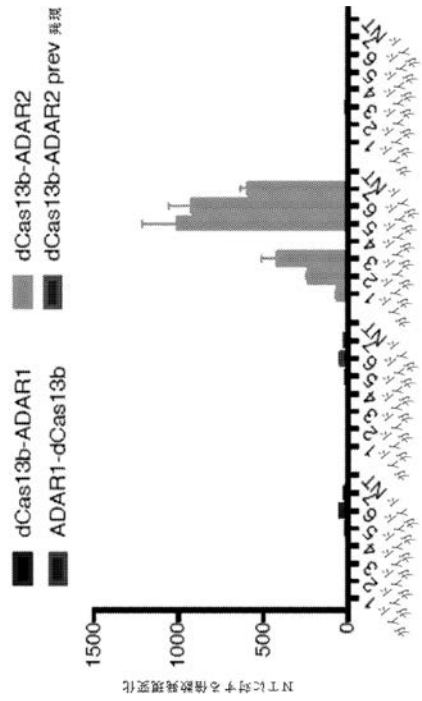


図６

【図７】

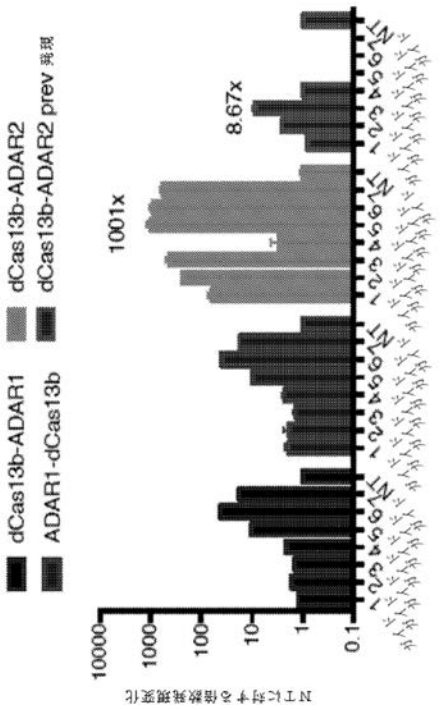


図７

【図８】

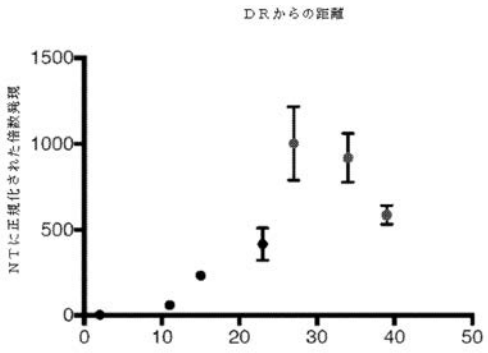


図８

【図９Ａ】

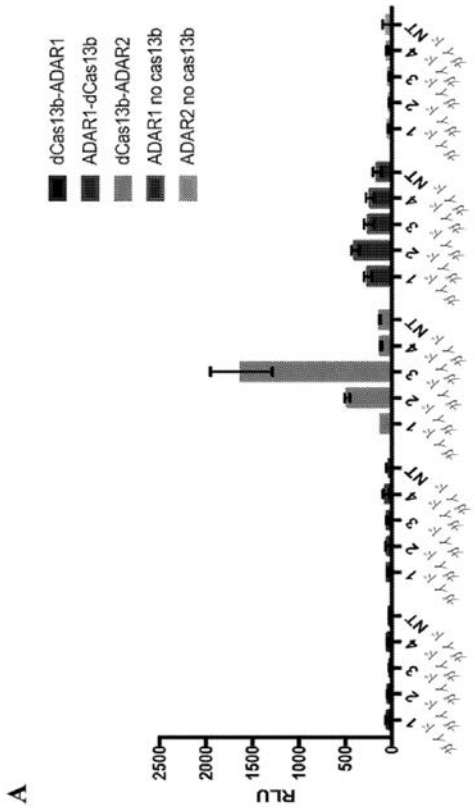


図９Ａ

【図９Ｂ】

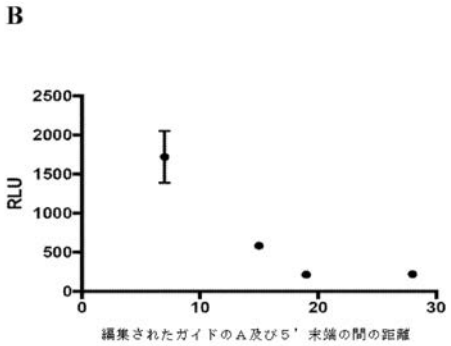


図９Ｂ

【図１０】

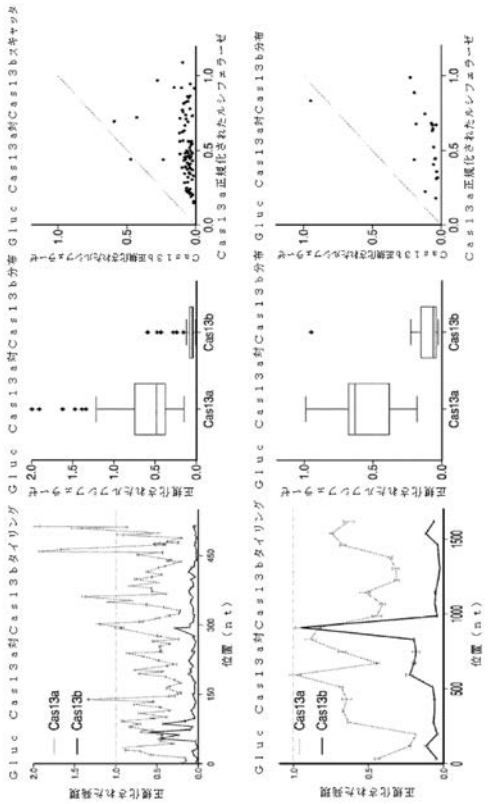


図１０

【図１１Ａ】

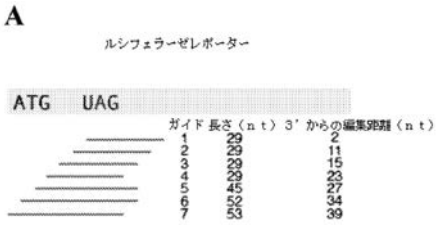


図11A

【図１１Ｂ】

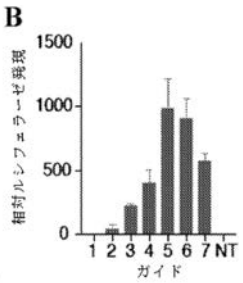


図11B

【図１１Ｃ】

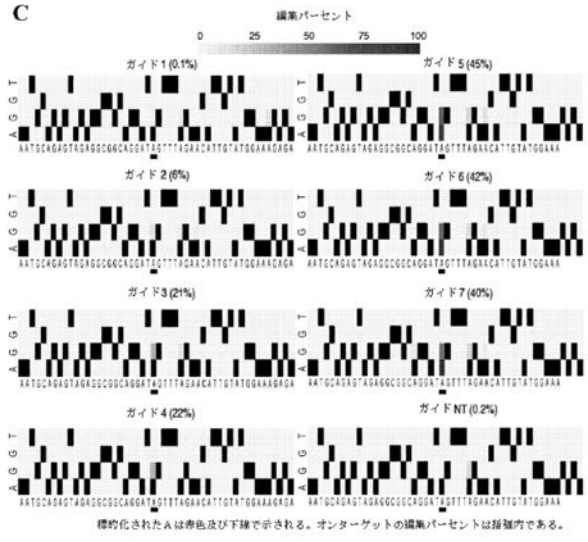


図11C

【図１２】

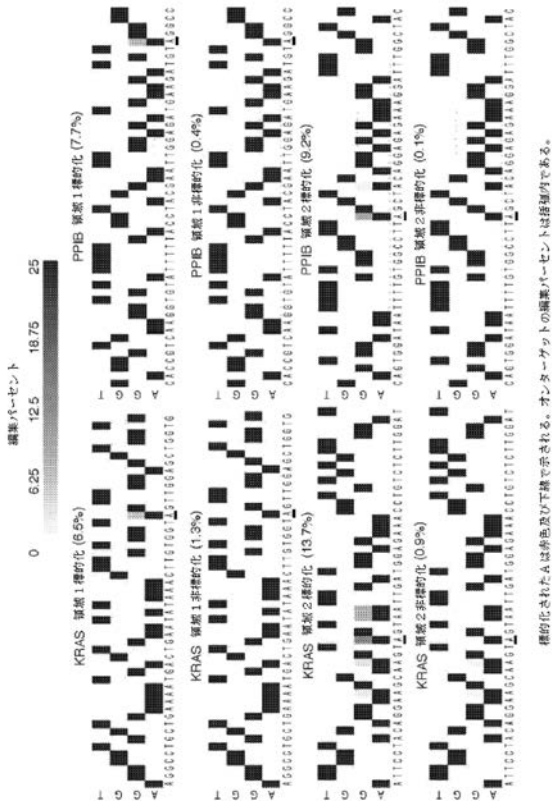


図１２

【図１３Ａ】

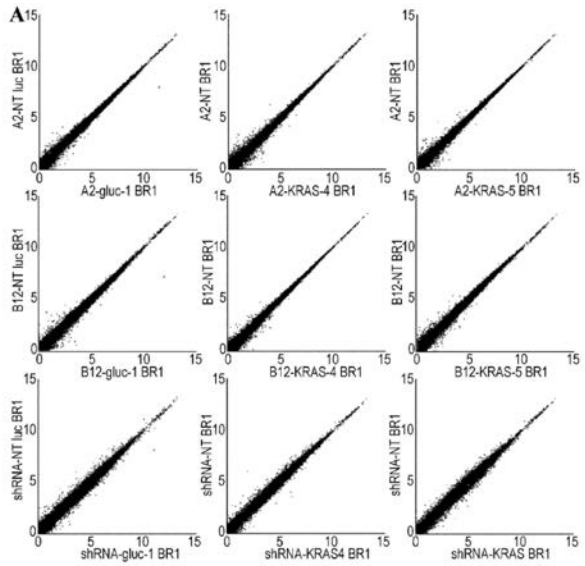


図１３Ａ

【図１３Ｂ】

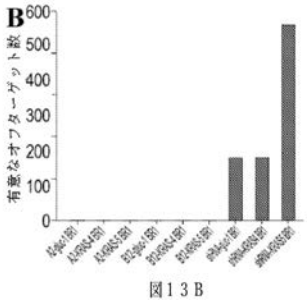


図１３Ｂ

【図１３Ｃ】

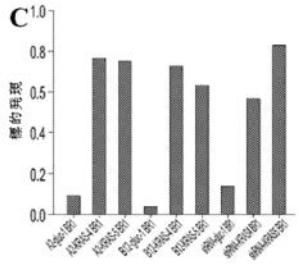


図１３Ｃ

【図１４】

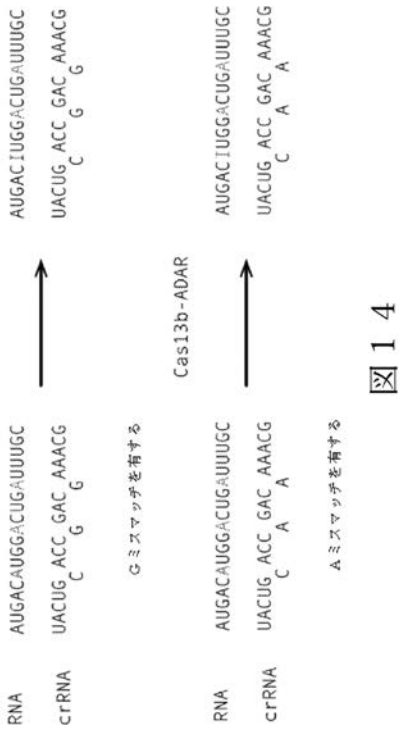


図１４

【図１５】

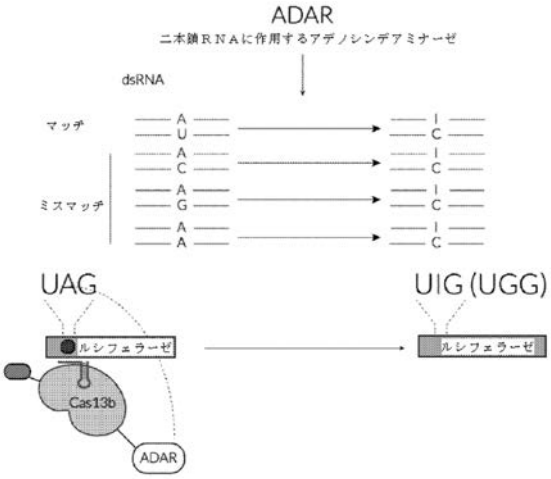


図１５

【図１６】

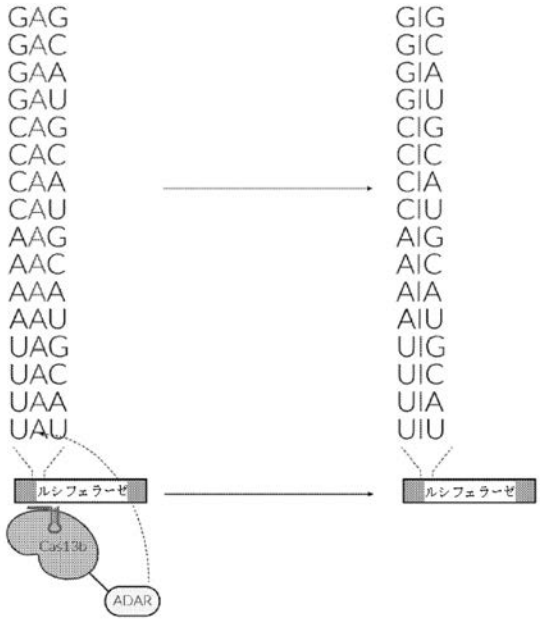


図１６

【図１７】

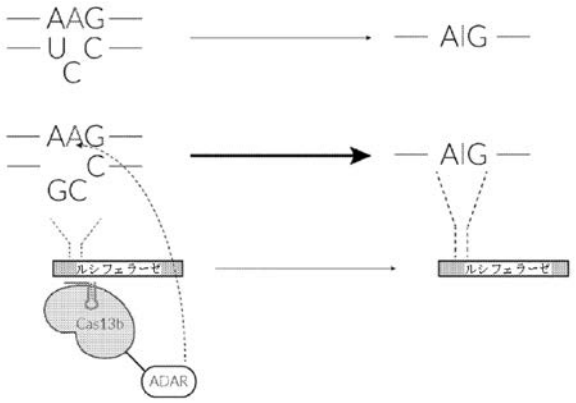


図１７

【図１８】



図１８

【図１９】

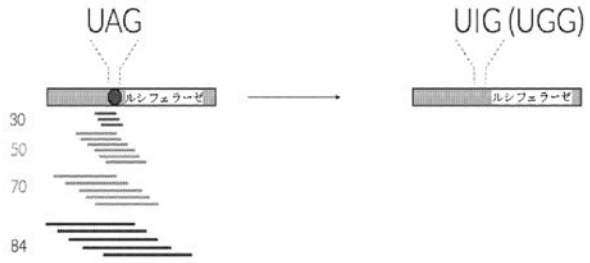


図１９

【図２０Ａ】

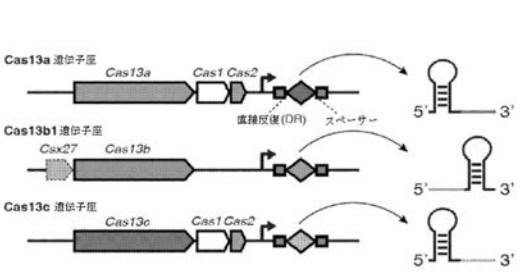


図２０Ａ

【図２０Ｂ】

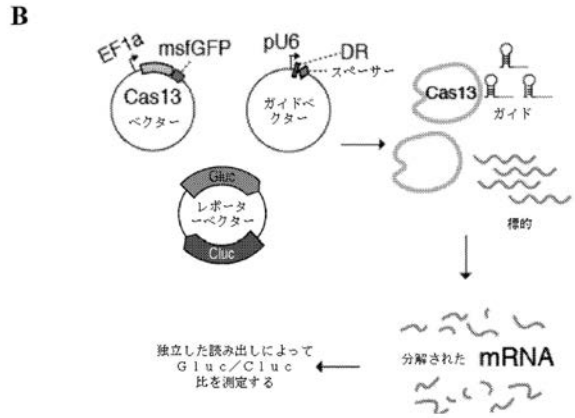


図２０Ｂ

【図２０Ｃ】

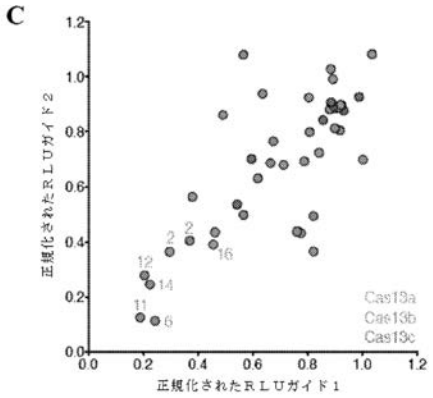


図２０Ｃ

【図２０Ｄ】

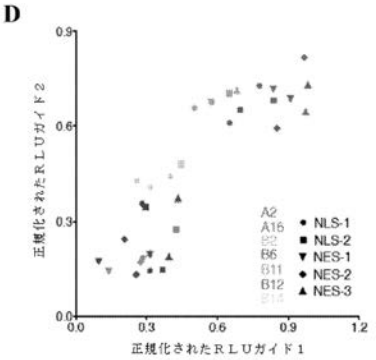


図２０Ｄ

【図２０Ｅ】

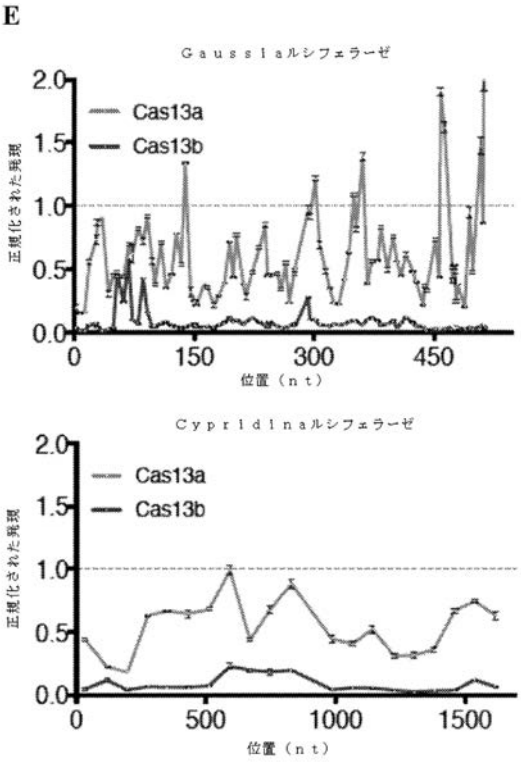


図２０Ｅ

【図２０Ｆ】

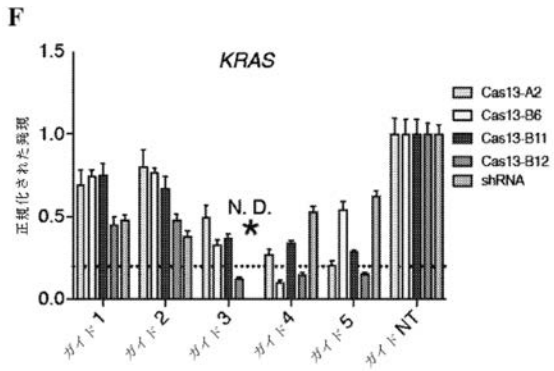


図２０Ｆ

【図２１Ａ－１】



図２１Ａ

【図２１Ａ－２】



図２１Ａ（続き）

【図２１Ｂ】

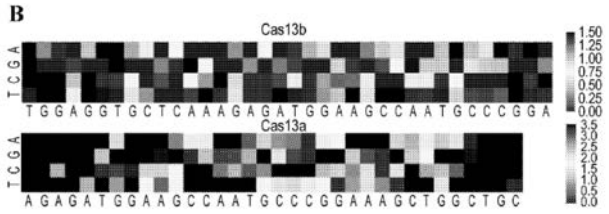


図２１Ｂ

【図２１Ｃ】

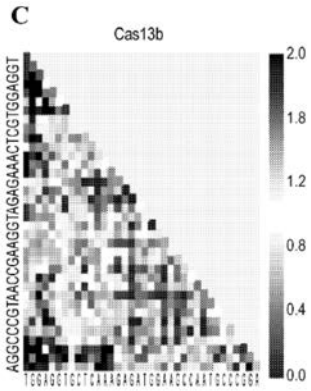


図２１Ｃ

【図２１Ｄ】

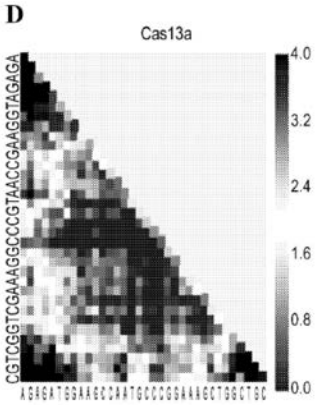


図２１Ｄ

【図２１Ｅ】

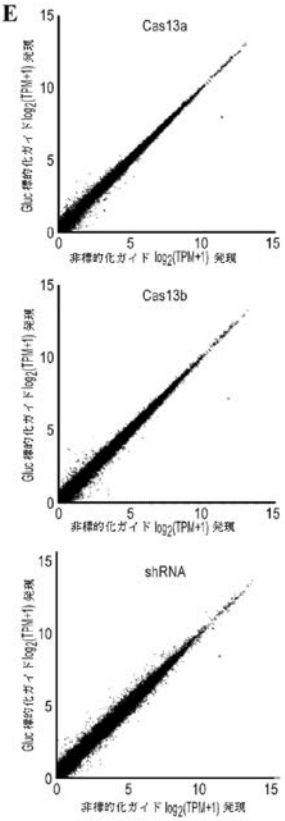


図２１Ｅ

【図２１Ｆ】

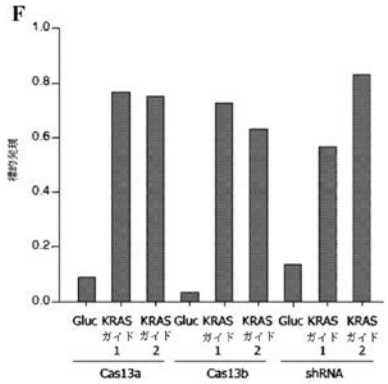


図２１Ｆ

【図２１Ｇ】

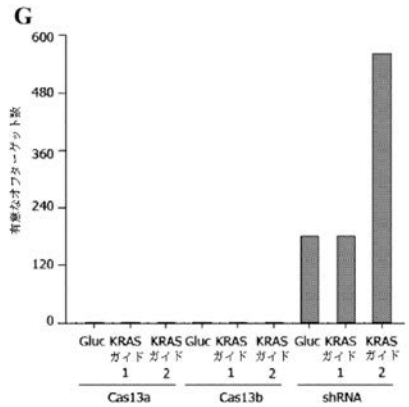


図２１Ｇ

【図２２Ａ】

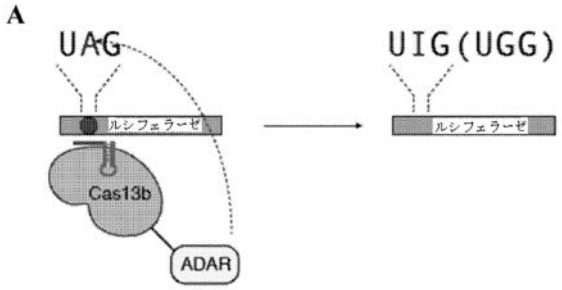


図２２Ａ

【図２２Ｂ】

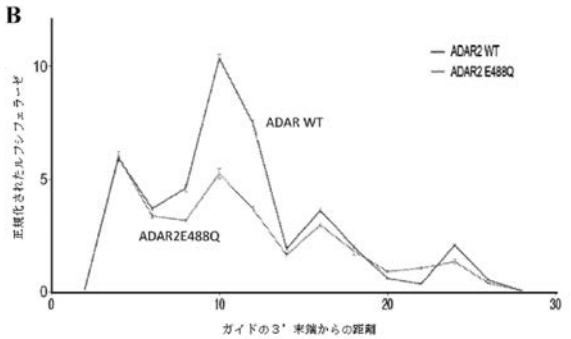


図２２Ｂ

【図２２Ｃ】

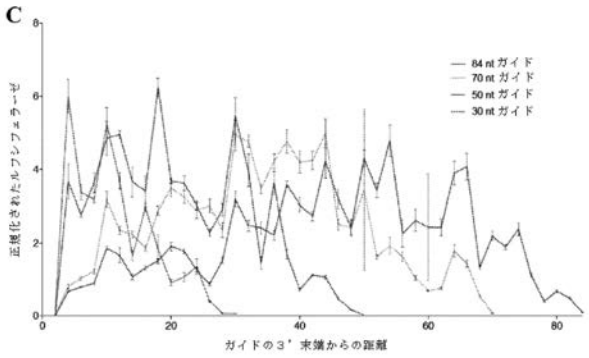


図２２Ｃ

【図２２Ｄ】

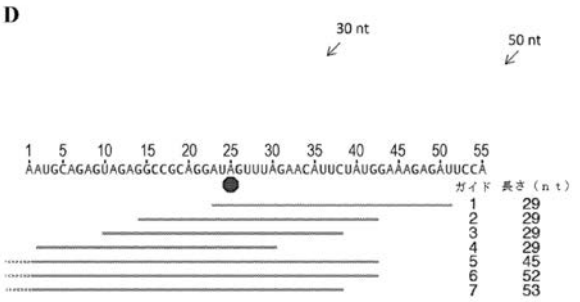


図２２Ｄ

【図２２Ｅ】

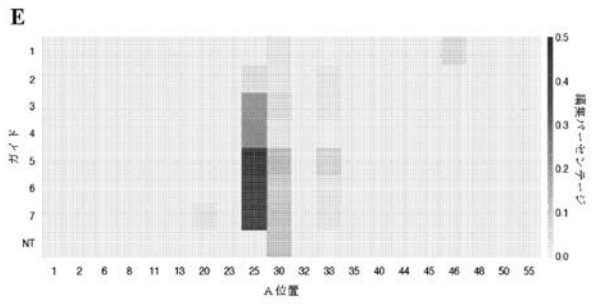


図２２Ｅ

【図２２Ｆ】

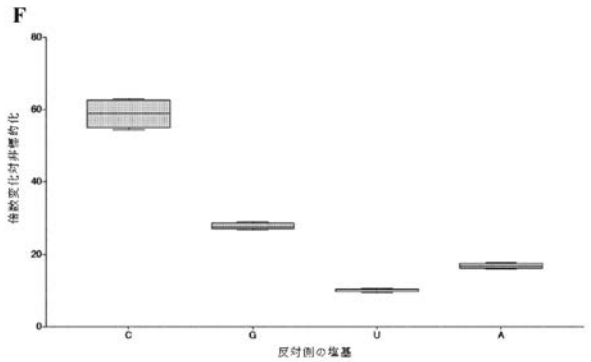


図２２Ｆ

【図２３】

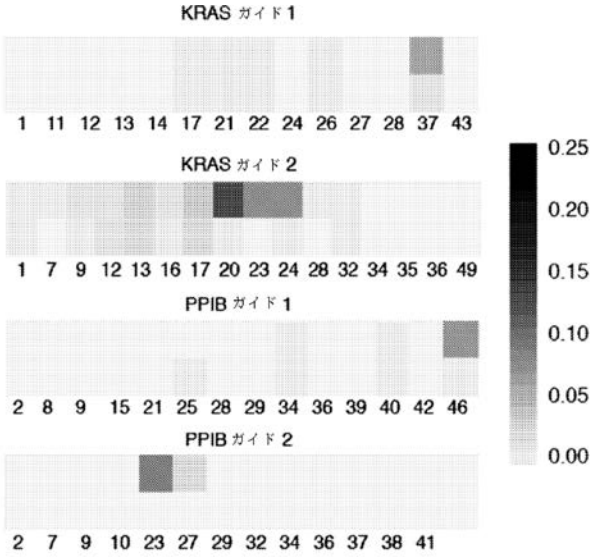


図２３

【図２４】

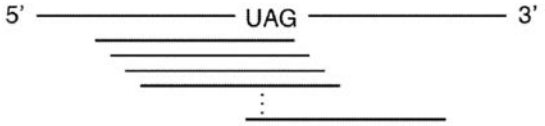


図２４

【図２５Ａ】

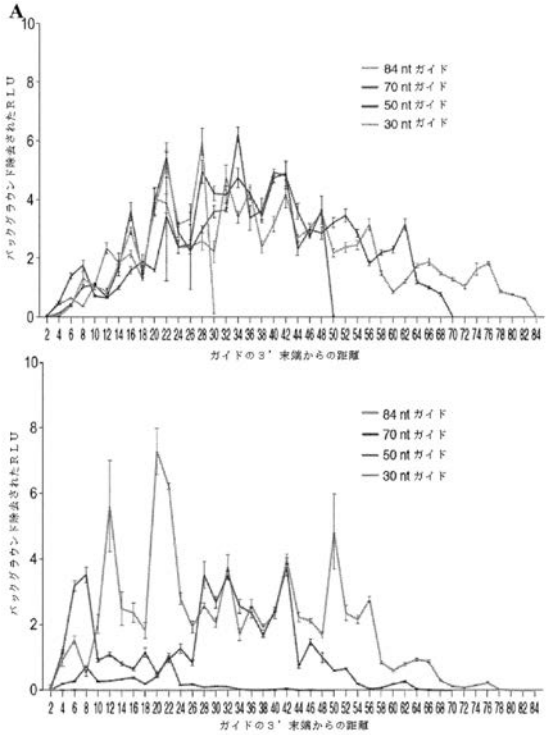


図２５Ａ

【図２５Ｂ】

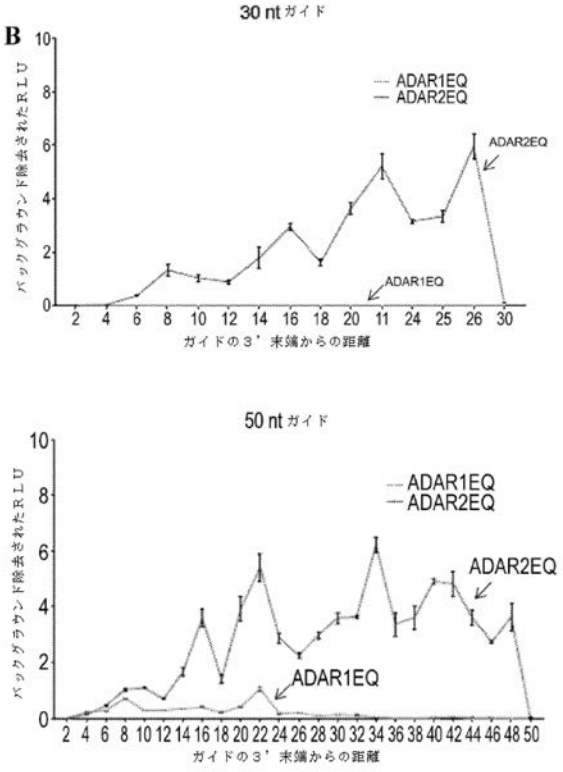


図２５Ｂ

【図２５Ｃ】

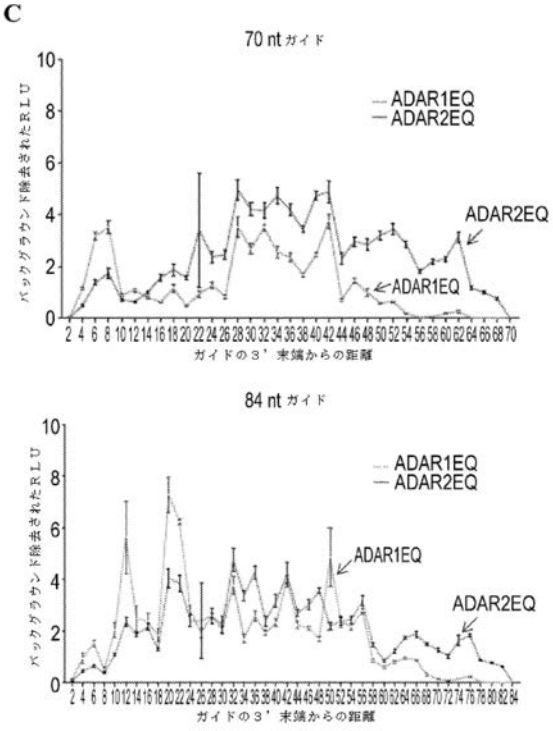


図２５Ｃ

【図２６】

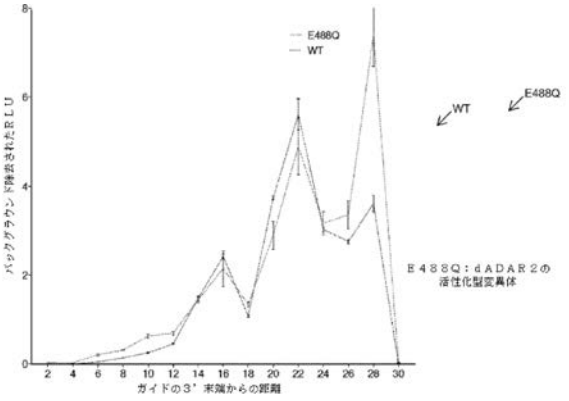


図２６

【図２７Ａ】

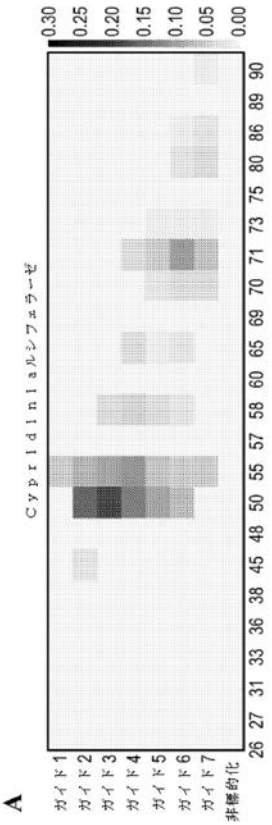


図２７Ａ

【図２７Ｂ】

B

ガイド	3’開始位置	5’開始位置	A－C位置
1	1	50	50
2	9	59	50
3	17	67	50
4	25	75	50
5	33	83	50
6	41	90	50
7	49	99	50
NT			

図２７Ｂ

【図２８Ａ】

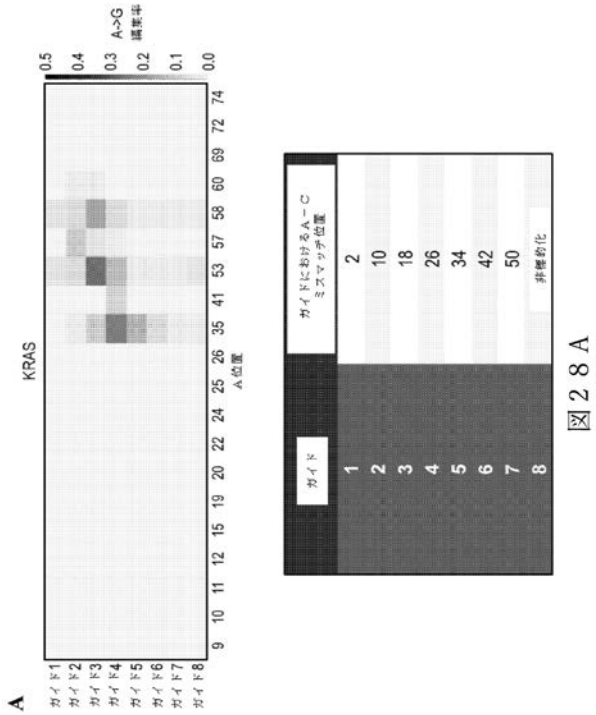


図２８Ａ

【図２８Ｂ】

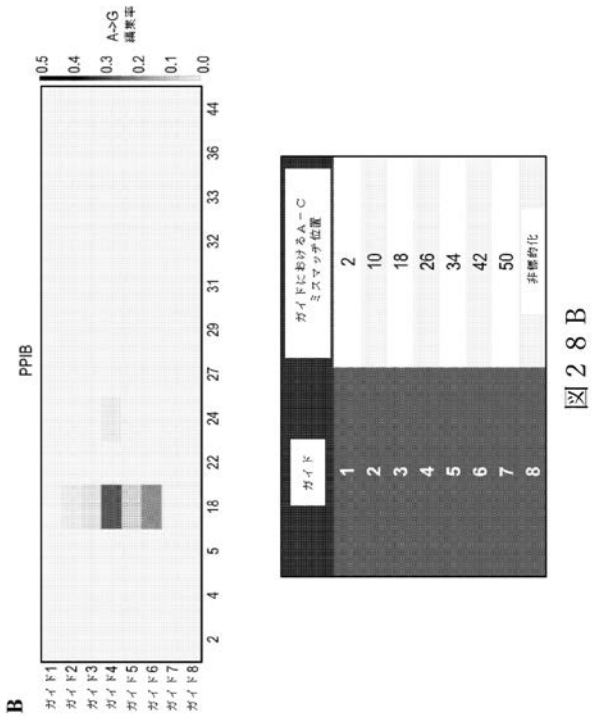


図２８Ｂ

【図２９】

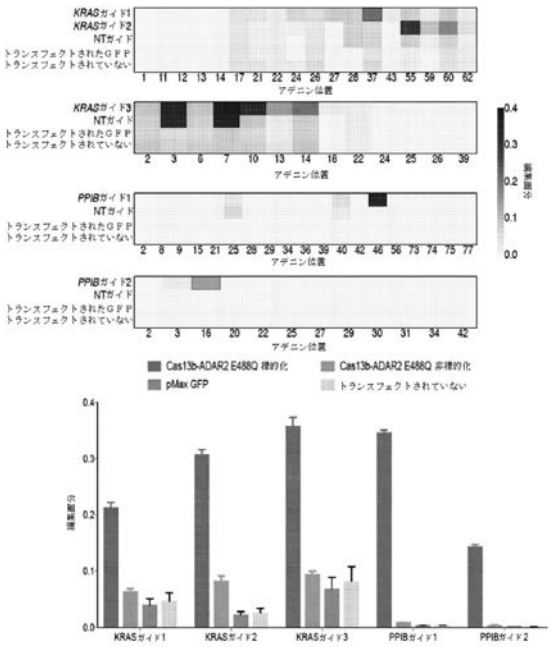


図２９

【図３０】

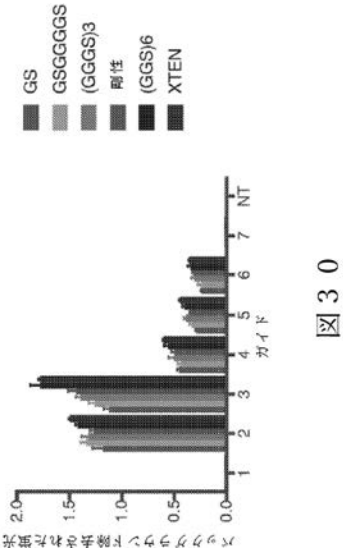


図３０

【図３１】

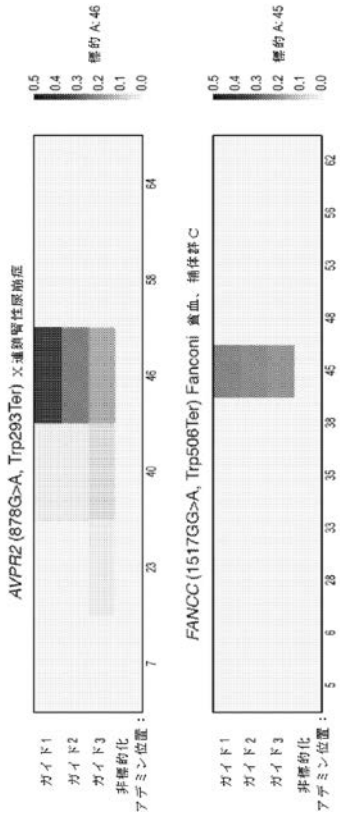


図３１

【図３２】

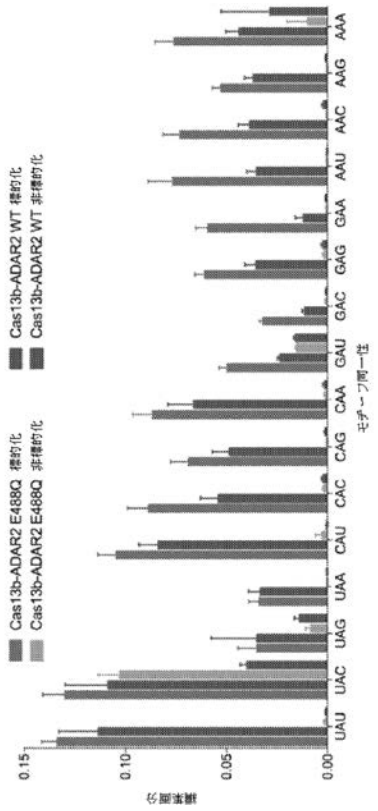


図３２

【図３３Ａ】

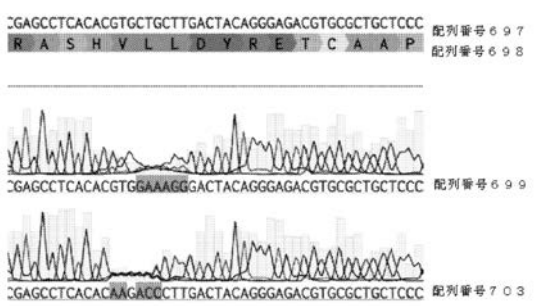


図３３Ａ

【図３３Ｂ】

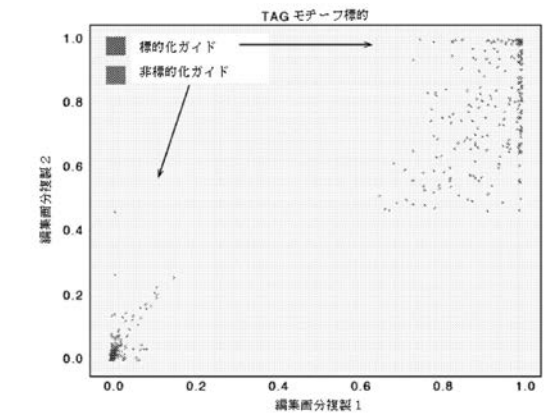


図３３Ｂ

【図３３Ｃ】

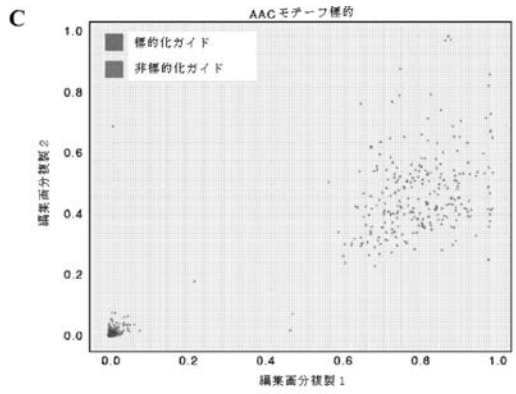


図３３Ｃ

【図３３Ｄ】

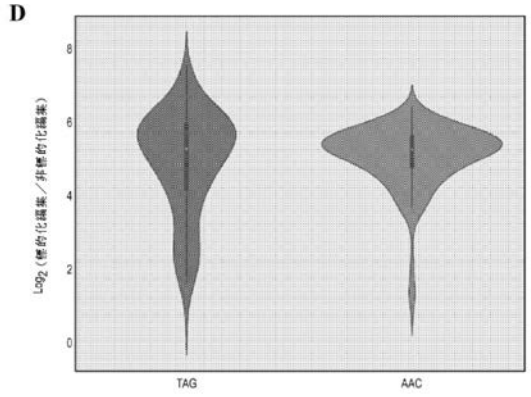


図３３Ｄ

【図３４】

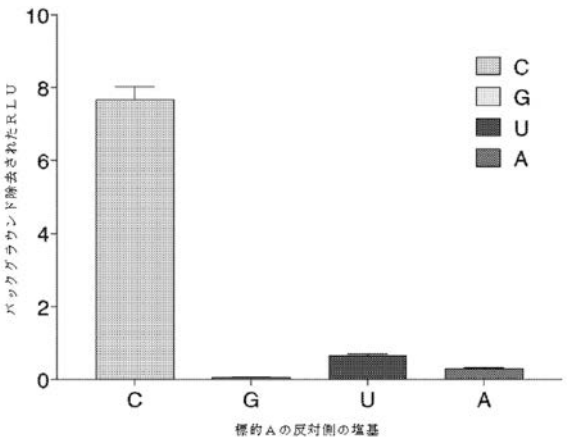


図３４

【図３５】

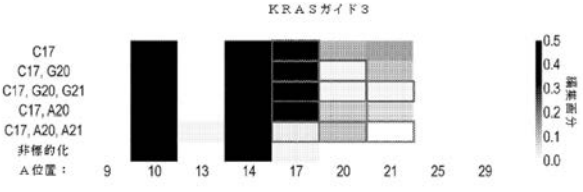


図３５

【図３６Ａ】

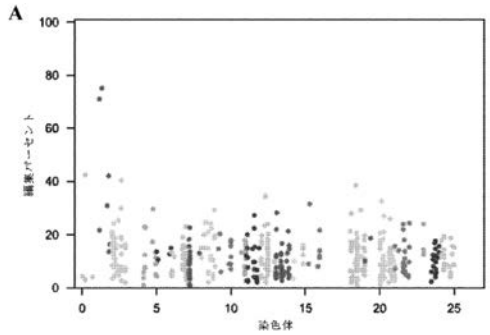


図３６Ａ

【図３６Ｂ】

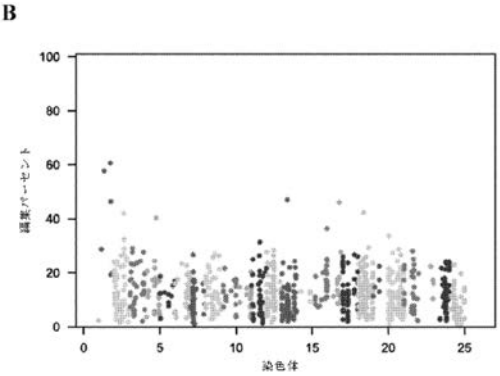
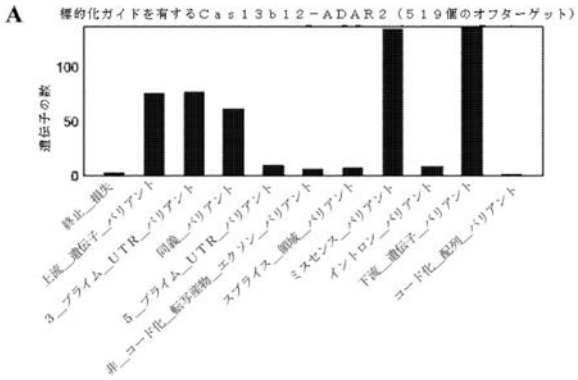


図３６Ｂ

【図３７Ａ】



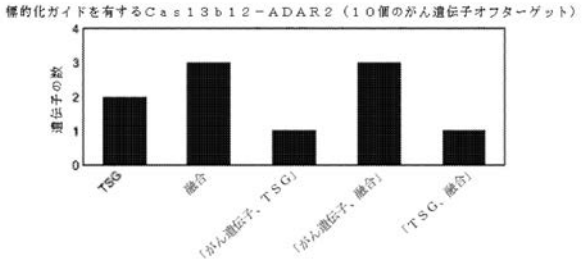
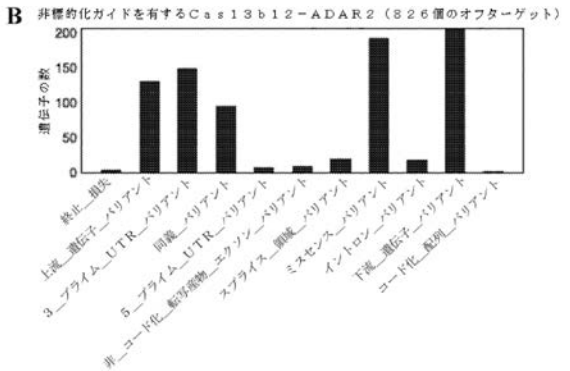


図３７Ａ

【図３７Ｂ】



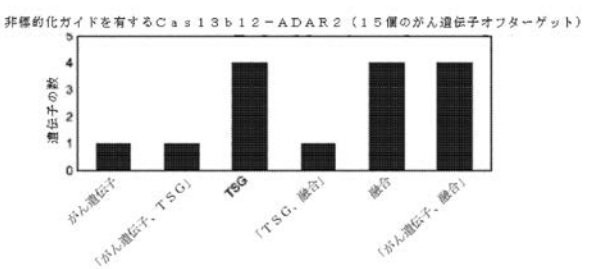


図３７Ｂ

【図３８】

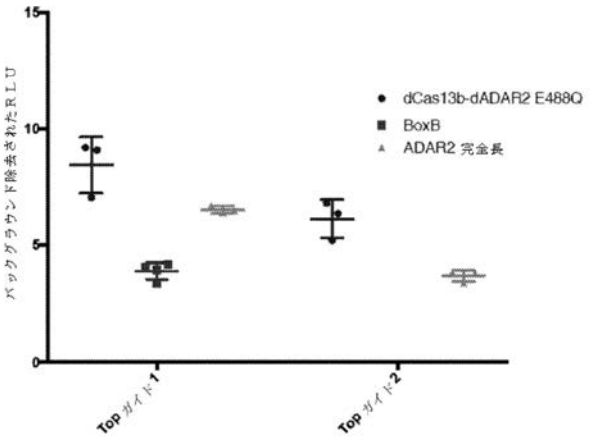


図３８

【図３９Ａ】

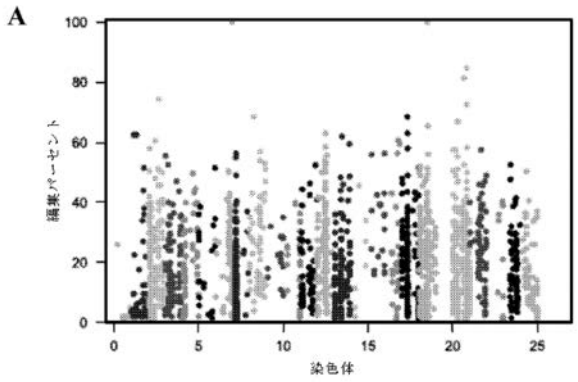


図３９Ａ

【図３９Ｂ】

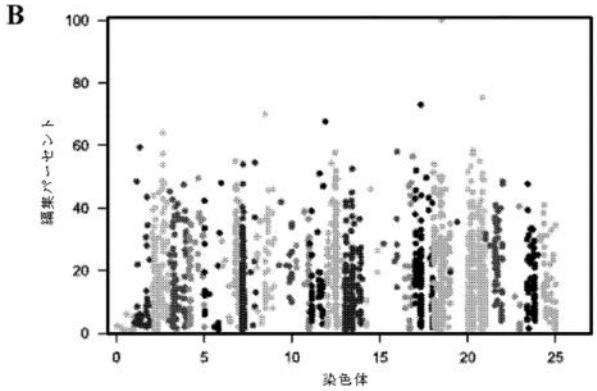


図３９Ｂ

【図３９Ｃ】

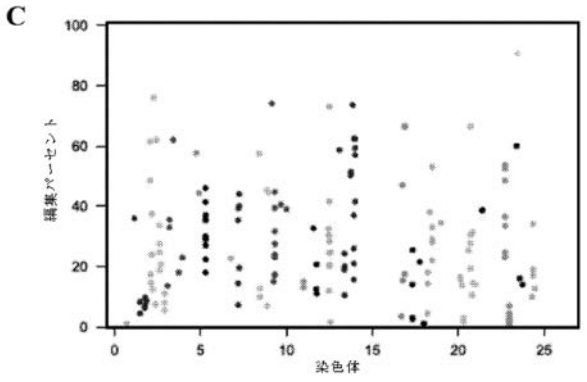


図３９Ｃ

【図３９Ｄ】

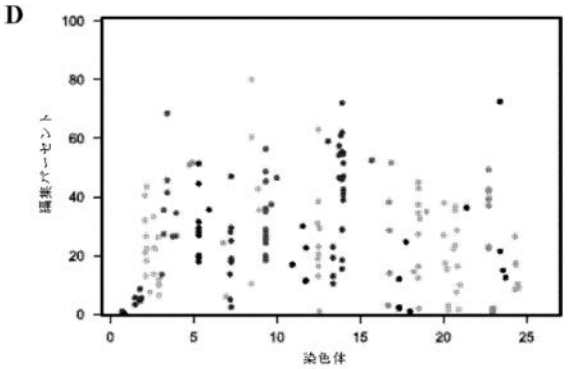


図３９Ｄ

【図４０】

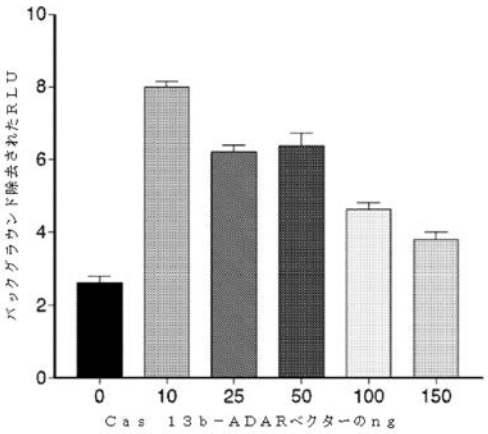


図４０

【図４１Ａ】

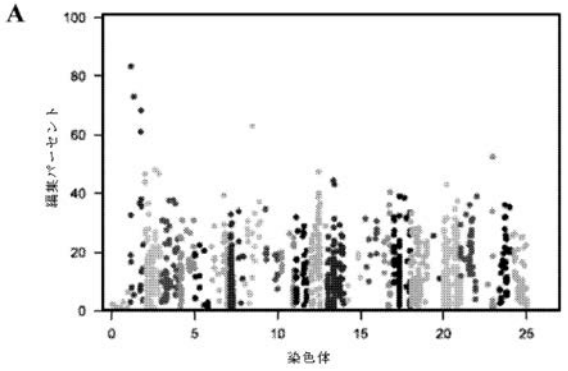


図４１Ａ

【図４１Ｂ】

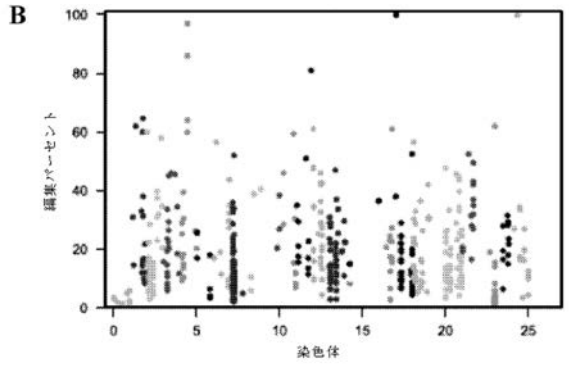


図４１Ｂ

【図４１Ｃ】

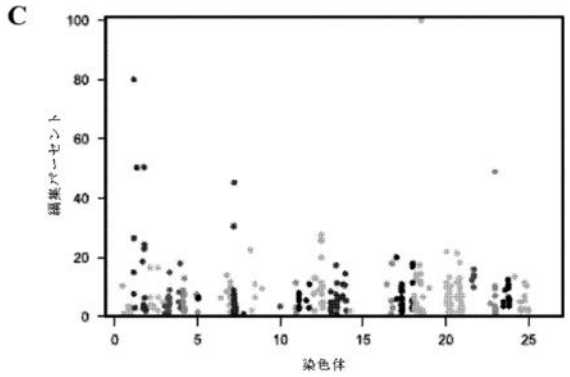


図４１Ｃ

【図４１Ｄ】

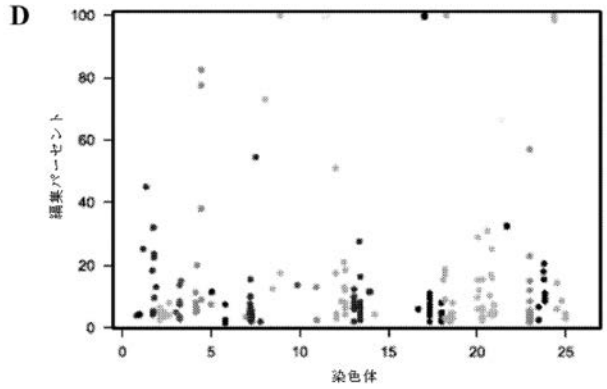


図４１Ｄ

【図４２Ａ】

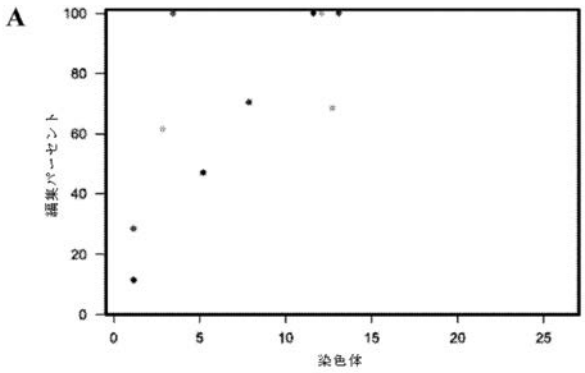


図４２Ａ

【図４２Ｂ】

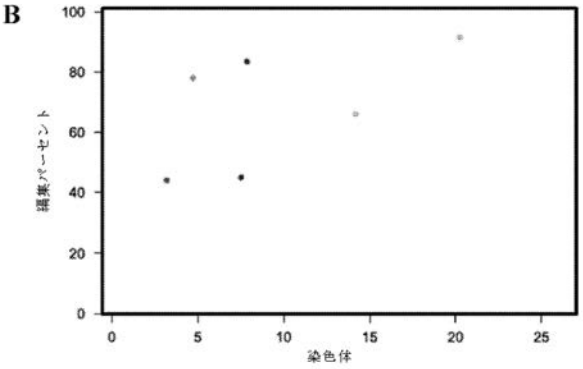


図４２Ｂ

【図４３Ａ】

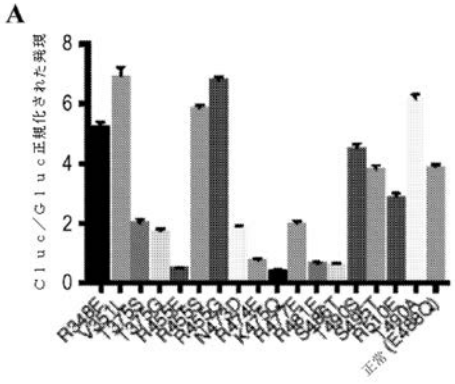


図４３Ａ

【図４３Ｂ】

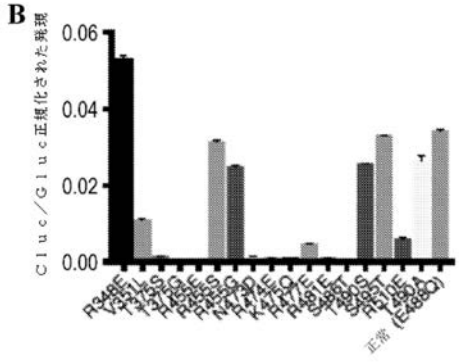


図４３Ｂ

【図４３Ｃ】

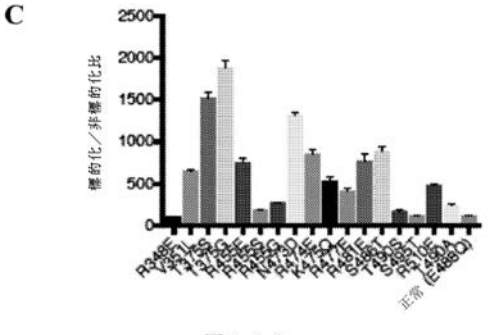


図４３Ｃ

【図４３Ｄ】

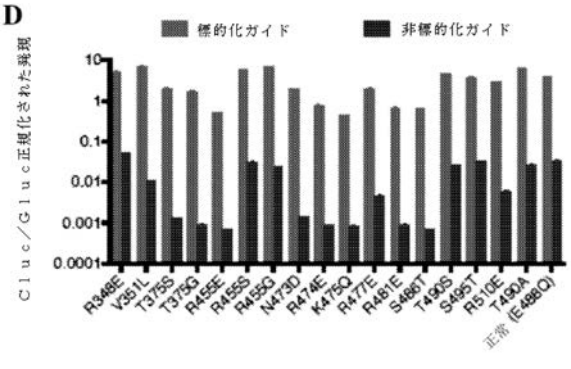


図４３Ｄ

【図４４】

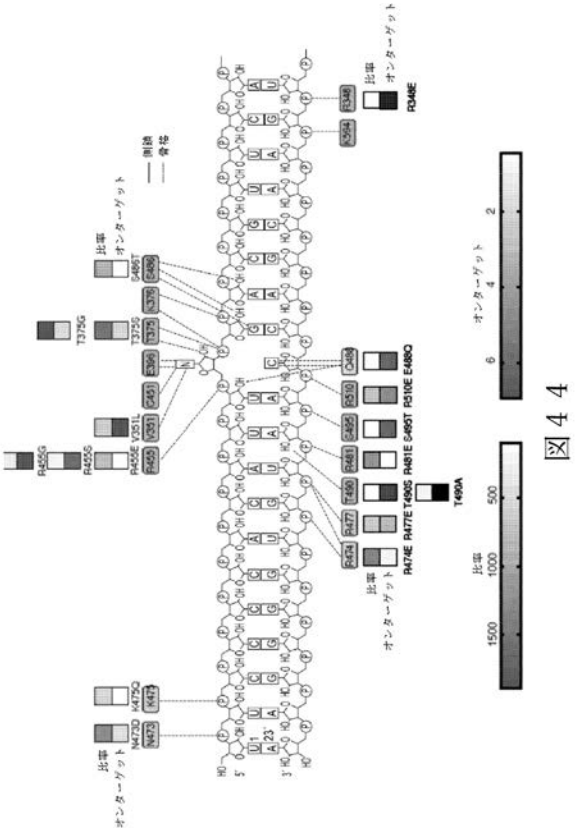


図４４

【図４５】

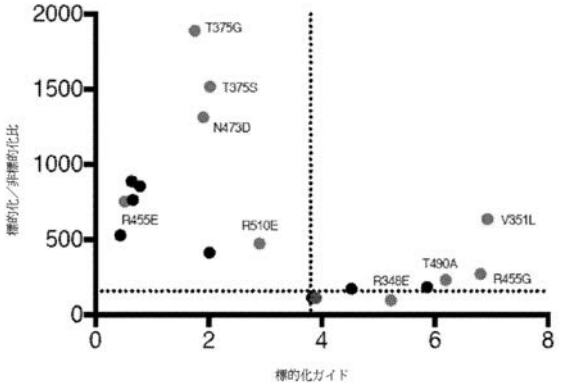


図４５

【図４６Ａ】

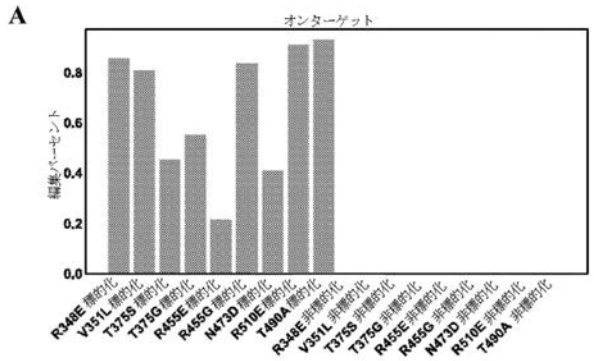


図４６Ａ

【図４６Ｂ】

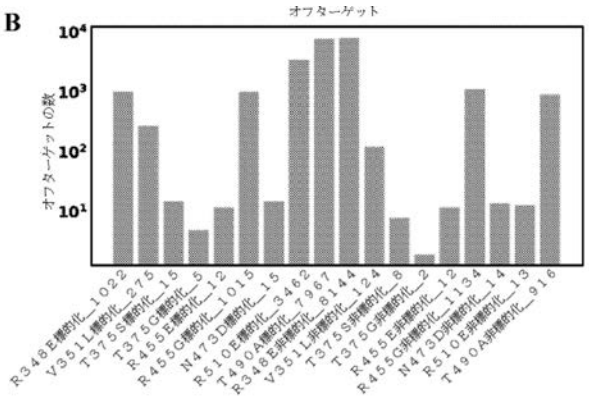


図４６Ｂ

【図４７Ａ】

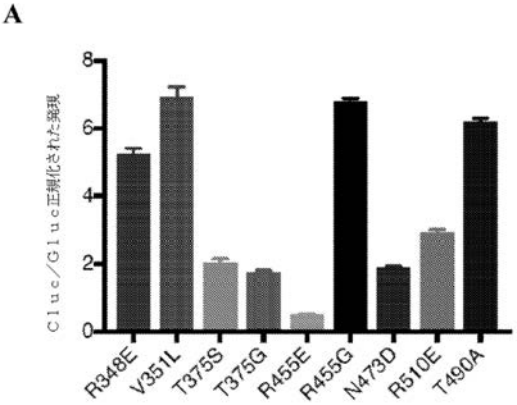


図４７Ａ

【図４７Ｂ】

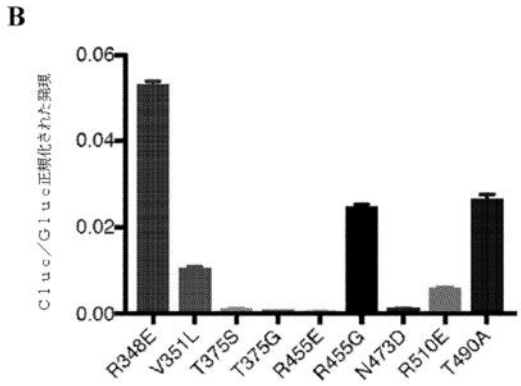


図４７Ｂ

【図４８Ａ】

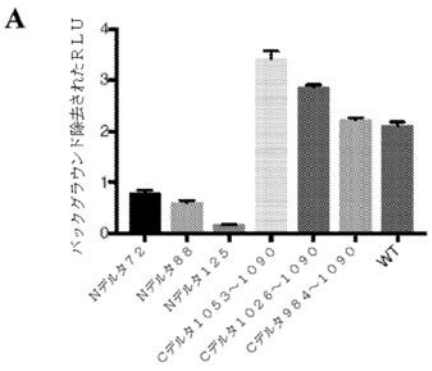


図４８Ａ

【図４８Ｂ】

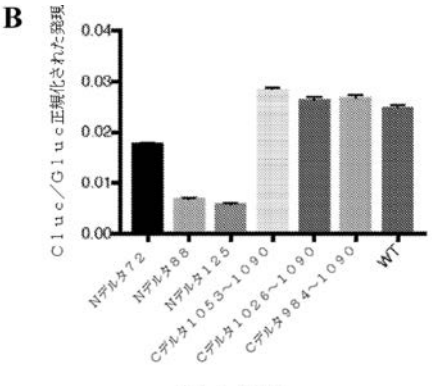


図４８Ｂ

【図４８Ｃ】

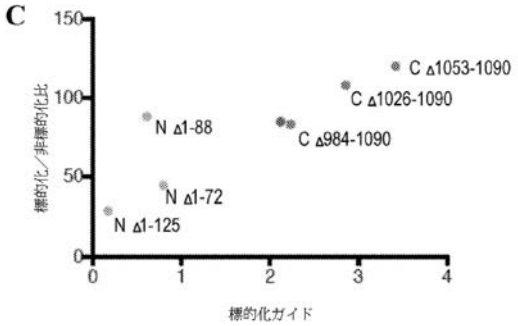


図４８Ｃ

【図４９Ａ】

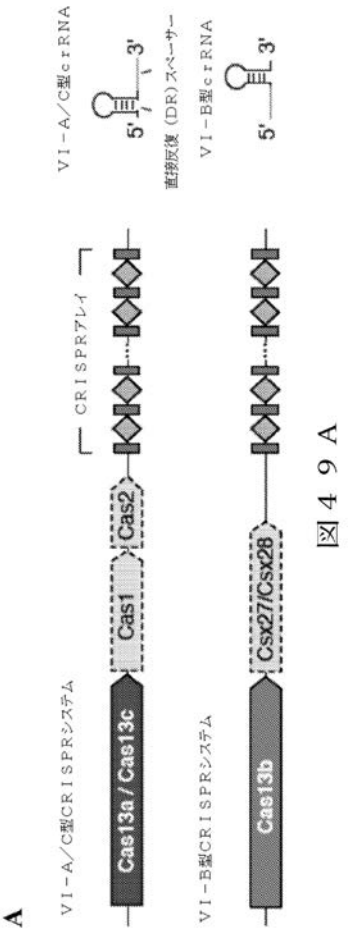


図４９Ａ

【図４９Ｂ】

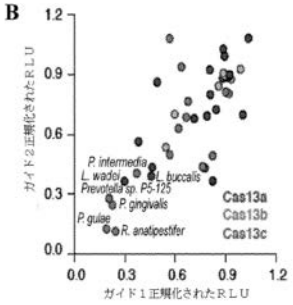


図４９Ｂ

【図４９Ｃ】

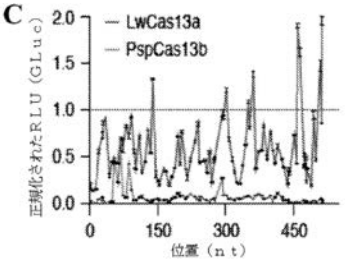


図４９Ｃ

【図４９Ｄ】

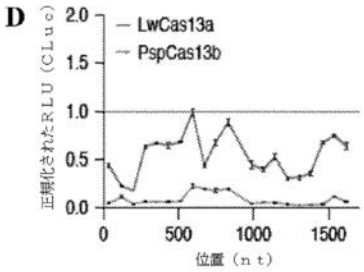


図４９Ｄ

【図４９Ｅ】

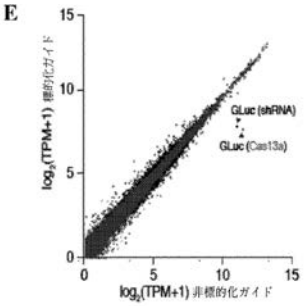


図４９Ｅ

【図４９Ｆ】

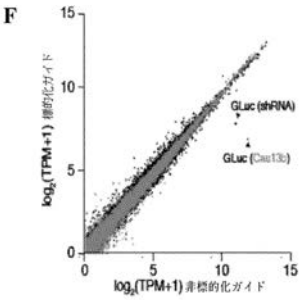


図４９Ｆ

【図４９Ｇ】

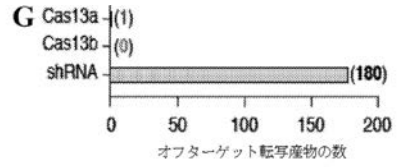


図４９Ｇ

【図５０Ａ】

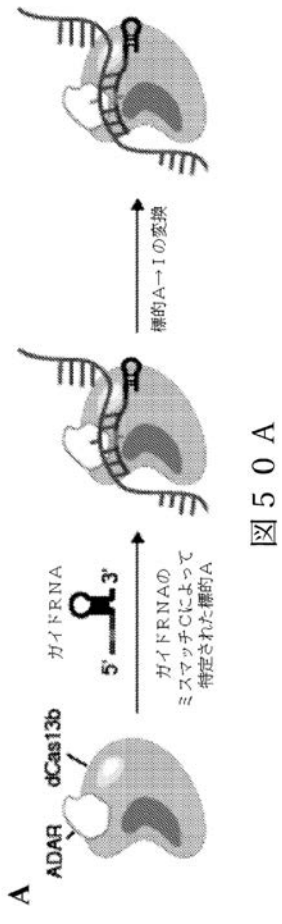


図５０Ａ

【図５０Ｂ】

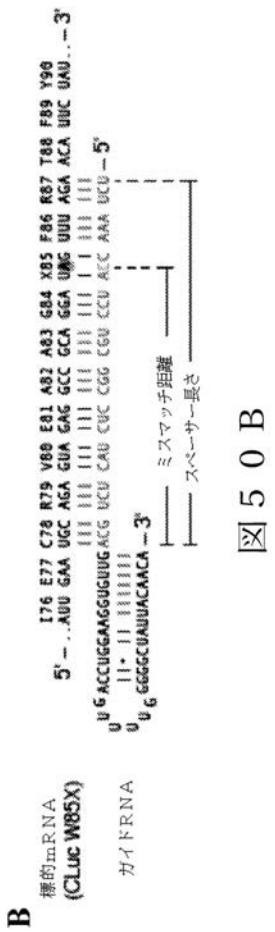


図５０Ｂ

【図５０Ｃ】

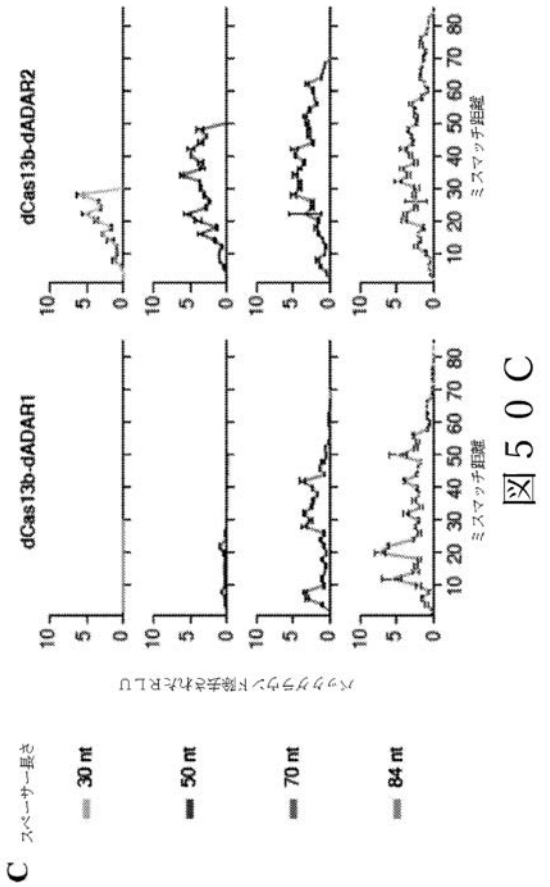


図５０Ｃ

【図５０Ｄ】

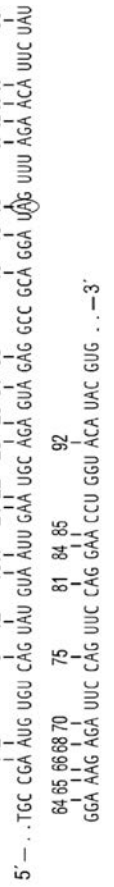


図５０Ｄ

【図５０Ｅ】

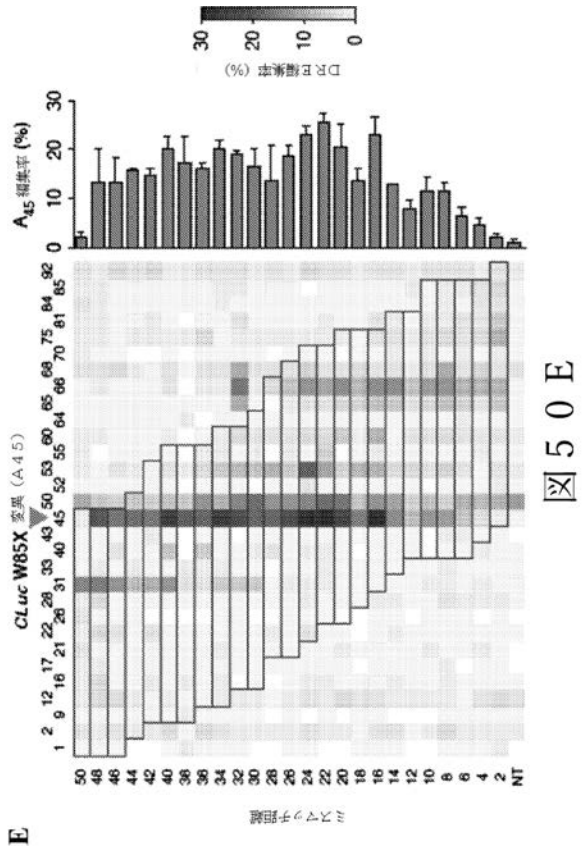


図５０Ｅ

【図５１Ａ】

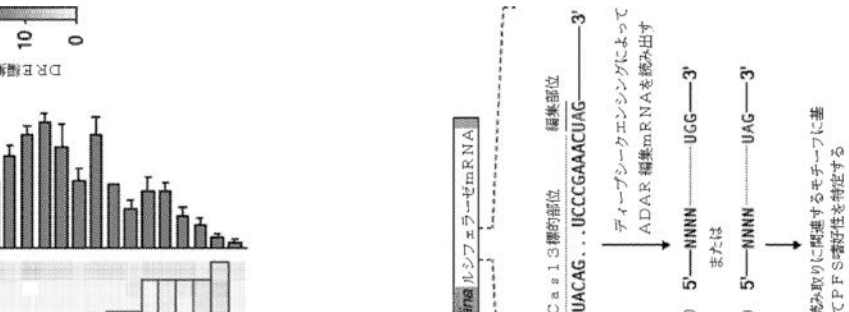


図５１Ａ

【図５１Ｂ】

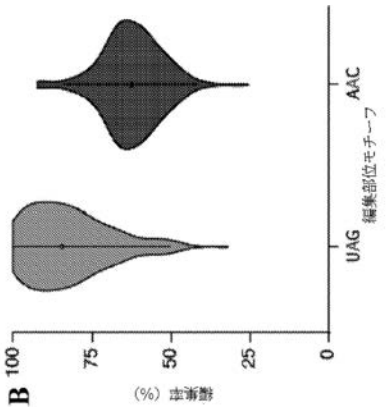


図５１Ｂ

【図５１Ｃ】

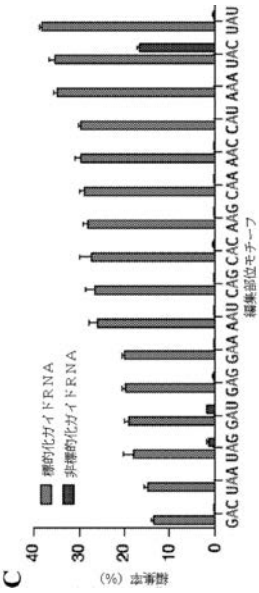


図５１Ｃ

【図５１Ｄ】

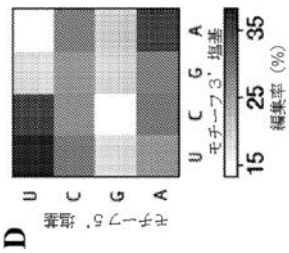


図５１Ｄ

【図５２Ａ】



図５２Ａ

【図５２Ｂ】

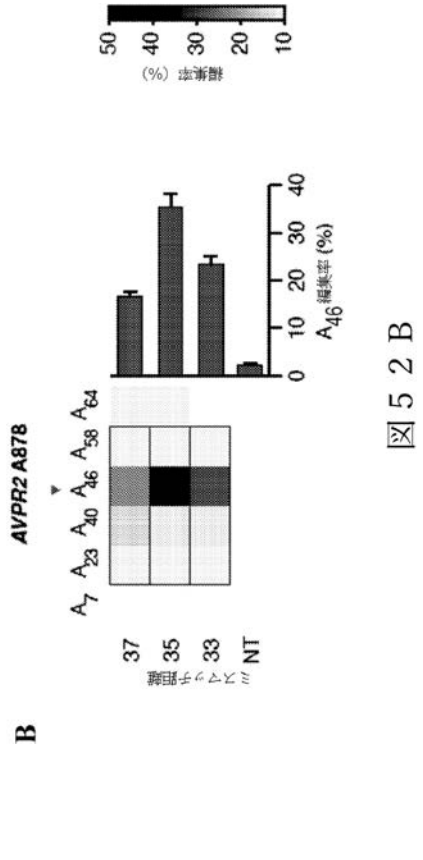


図５２Ｂ

【図５２Ｃ】



図５２Ｃ

【図５２Ｄ】

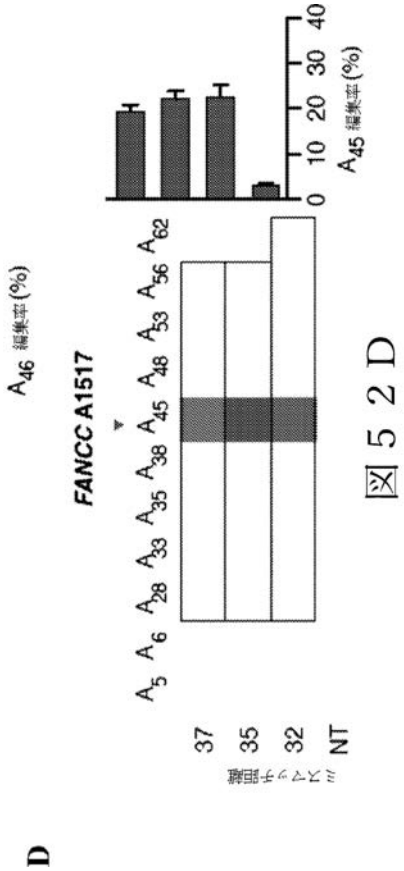


図５２Ｄ

【図５２Ｅ】

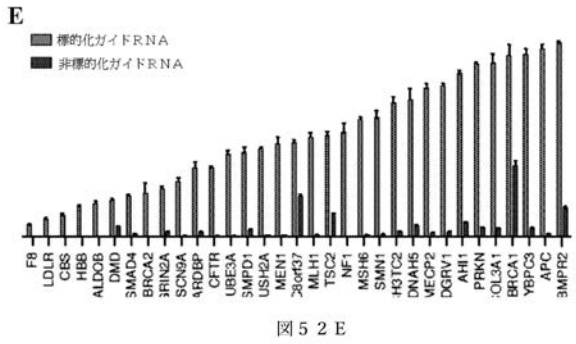


図５２Ｅ

【図５２Ｆ】

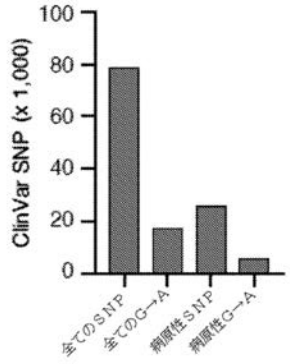


図５２Ｆ

【図５２Ｇ】

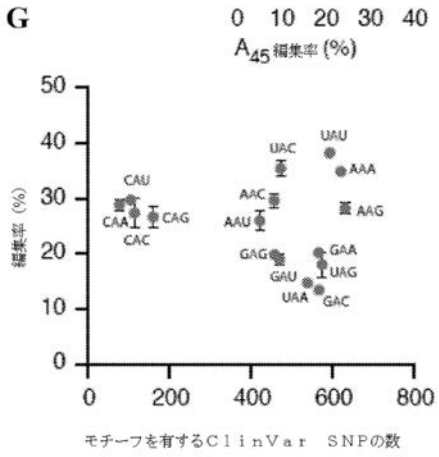


図５２Ｇ

【図５３Ａ】

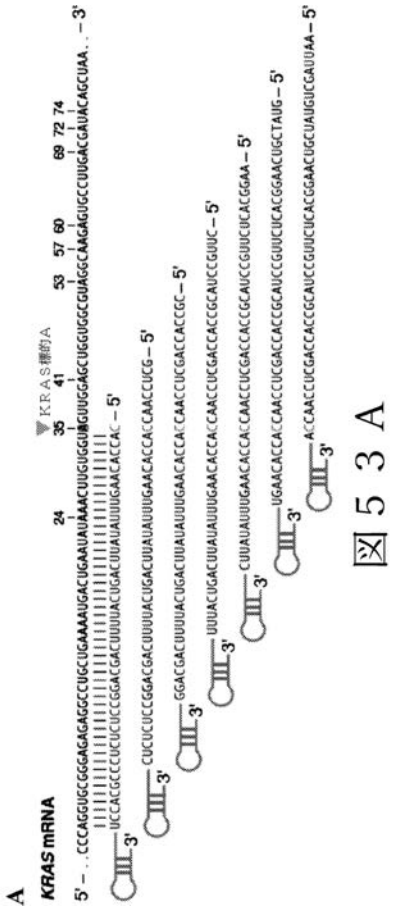


図５３Ａ

【図５３Ｂ】

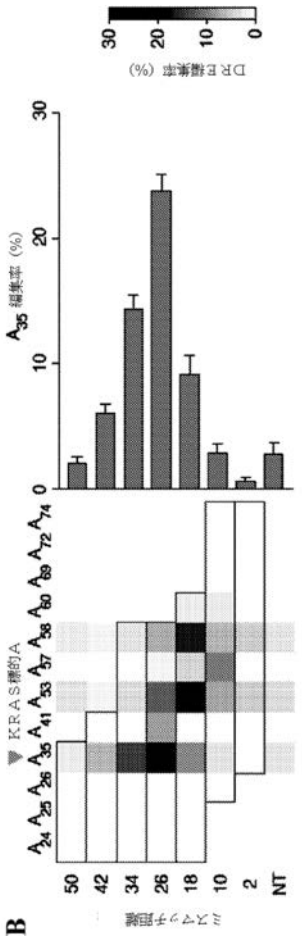


図５３Ｂ

【図５３Ｃ】

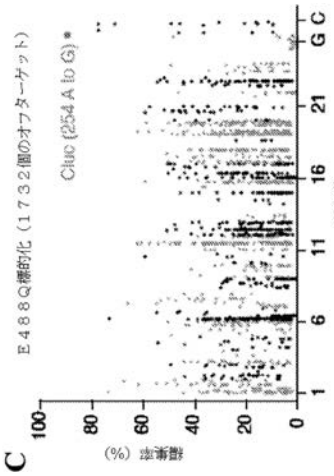


図５３Ｃ

【図５３Ｄ】

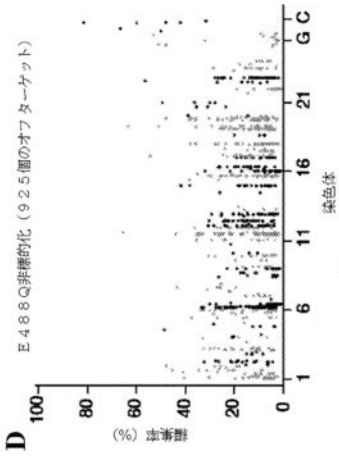


図５３Ｄ

【図５４Ａ】

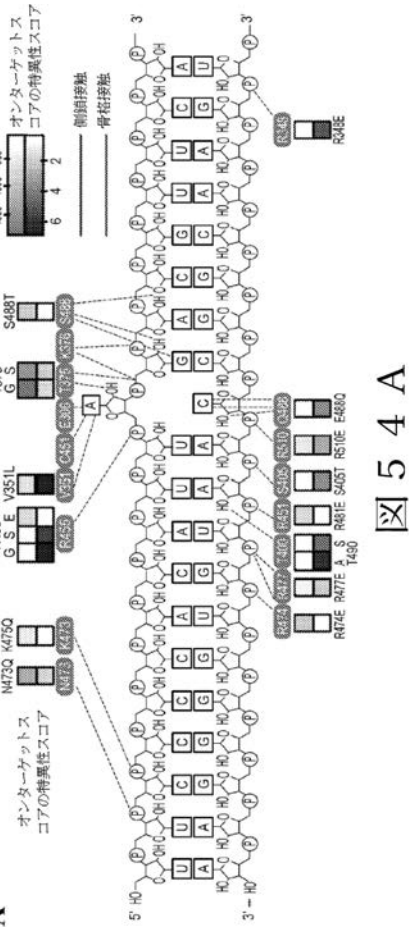


図５４Ａ

【図５４Ｂ】

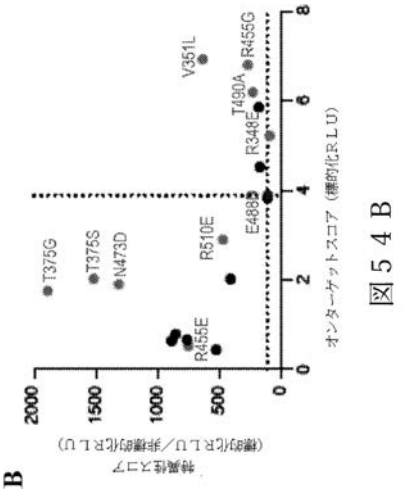


図５４Ｂ

【図５４Ｃ】

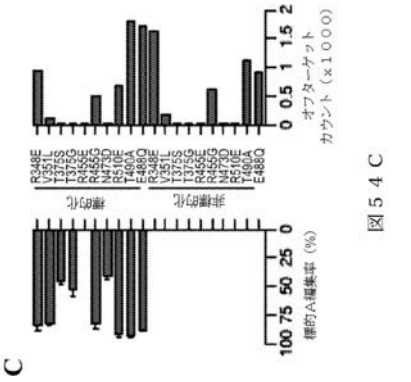


図５４Ｃ

【図５４Ｄ】

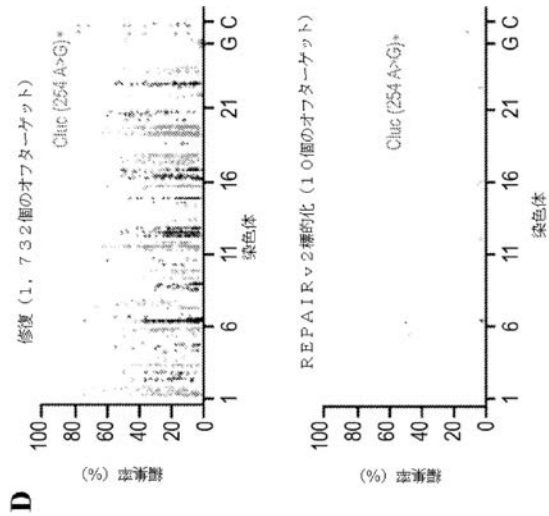


図５４Ｄ

【図５４Ｅ】

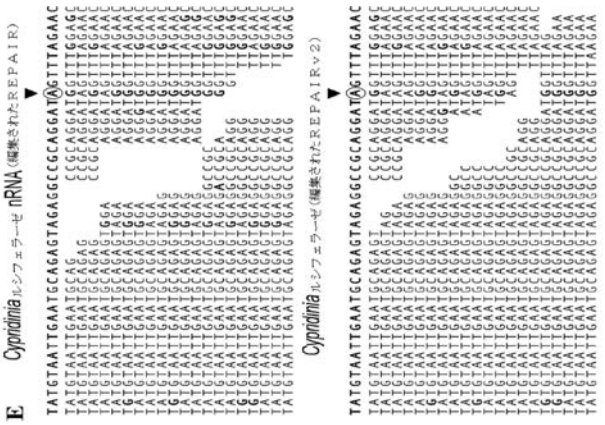


図５４Ｅ

【図５４Ｆ】

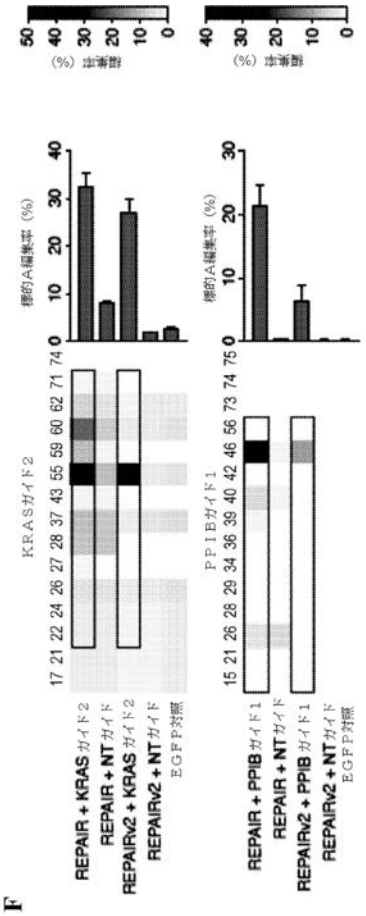


図５４Ｆ

【図５５Ａ】

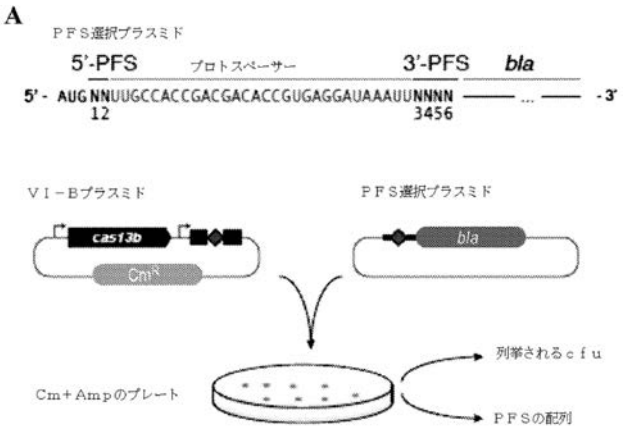


図５５Ａ

【図５５Ｂ】

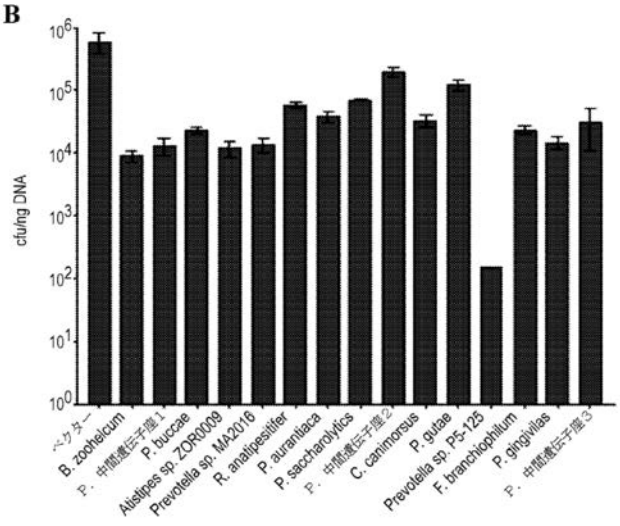


図５５Ｂ

【図５５Ｃ】

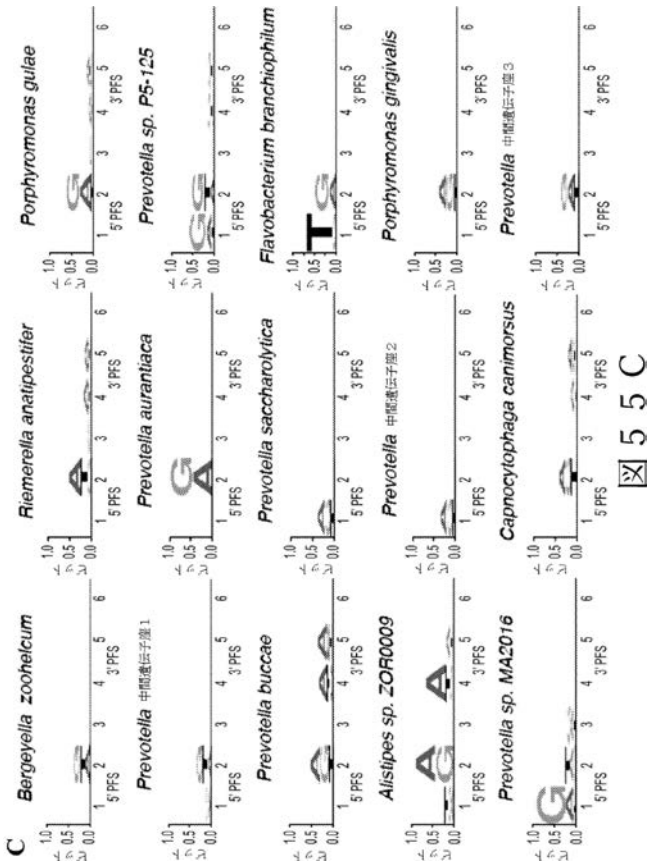


図５５Ｃ

【図５６Ａ】

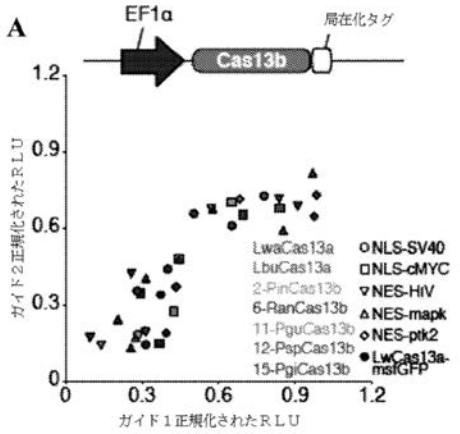


図５６Ａ

【図５６Ｂ】

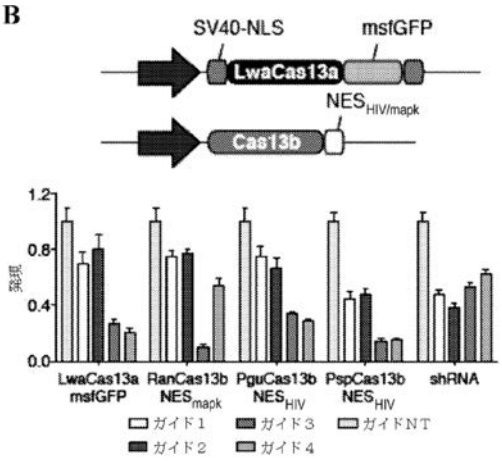


図５６Ｂ

【図５６Ｃ】



図５６Ｃ

【図５６Ｄ】

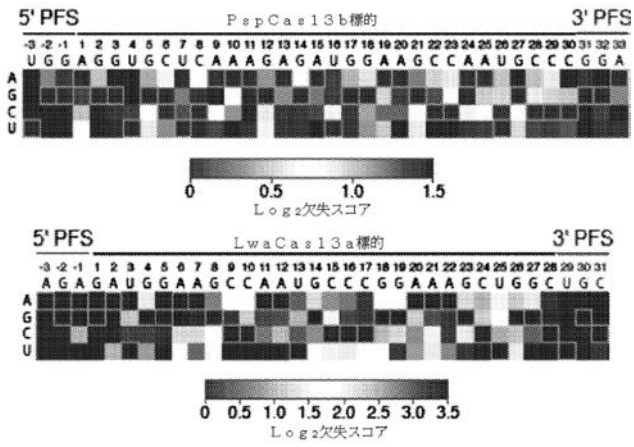


図５６Ｄ

【図５６Ｅ】

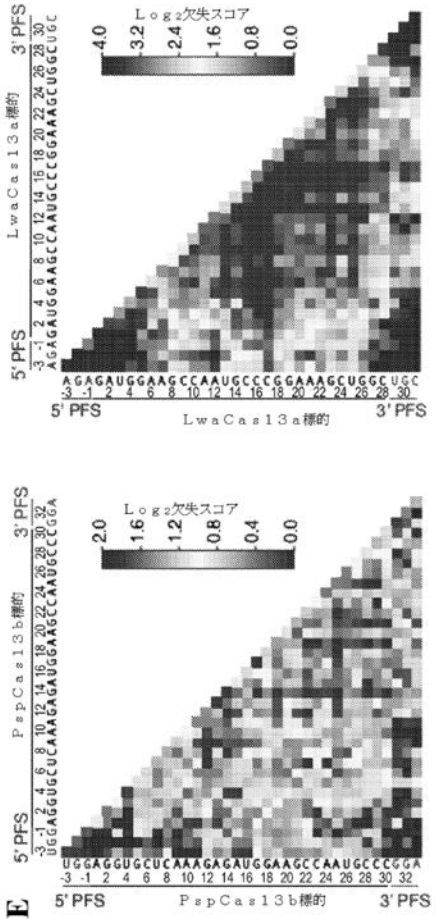


図５６Ｅ

【図５７Ａ】

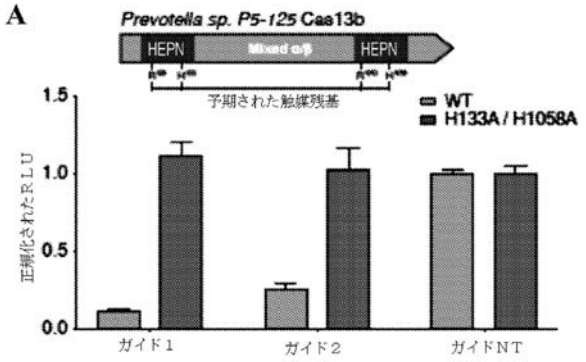


図５７Ａ

【図５７Ｂ】

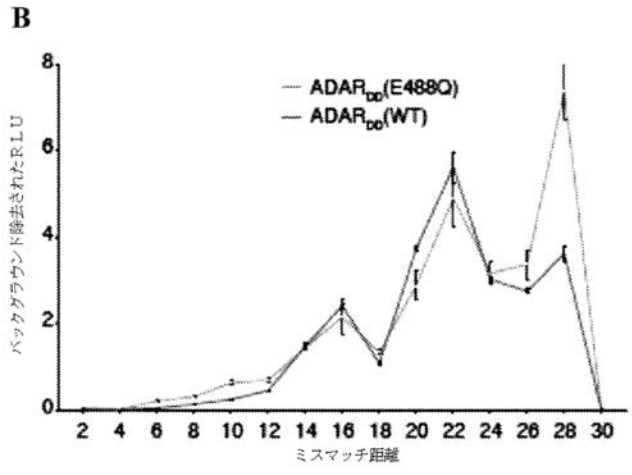


図５７Ｂ

【図５７Ｃ】

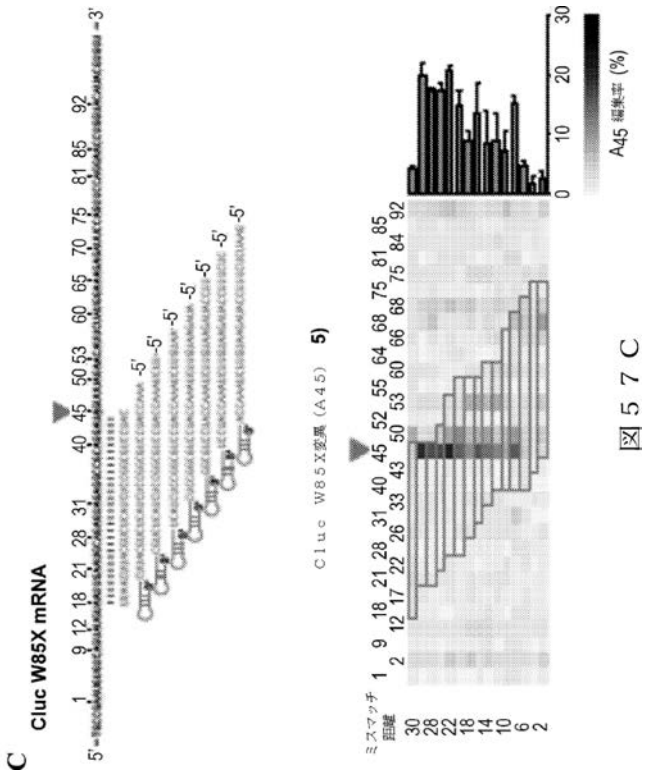


図５７Ｃ

【図５７Ｄ】

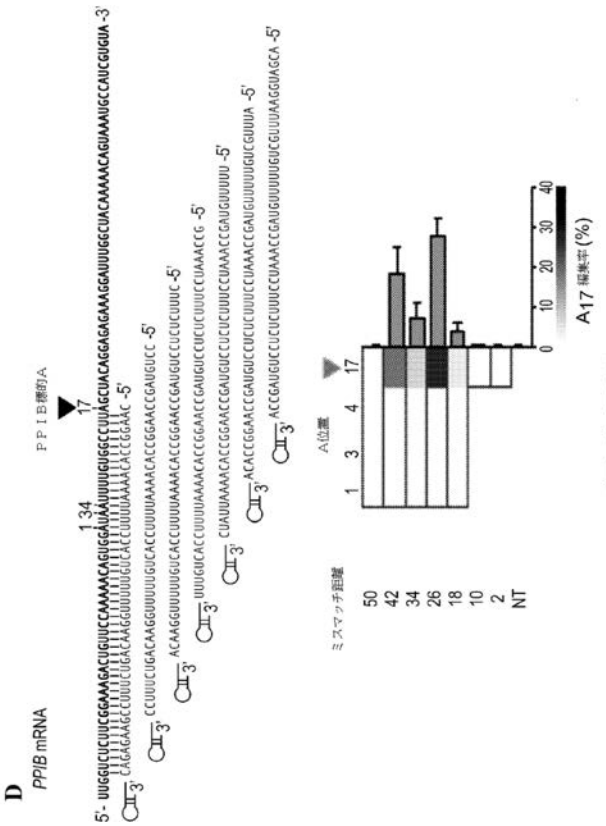


図５７Ｄ

【図５７Ｅ】

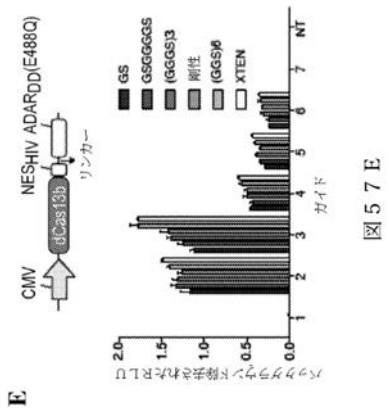


図５７Ｅ

【図５７Ｆ】

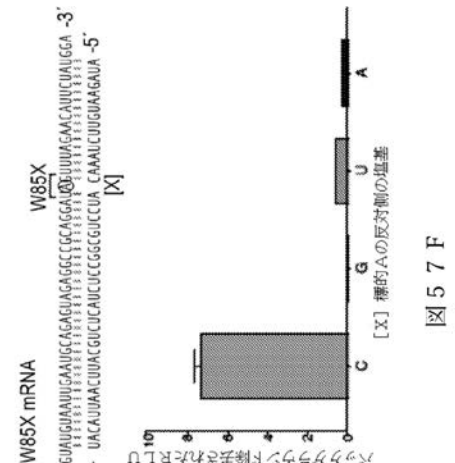


図５７Ｆ

【図５８】



図５８

【図５９】

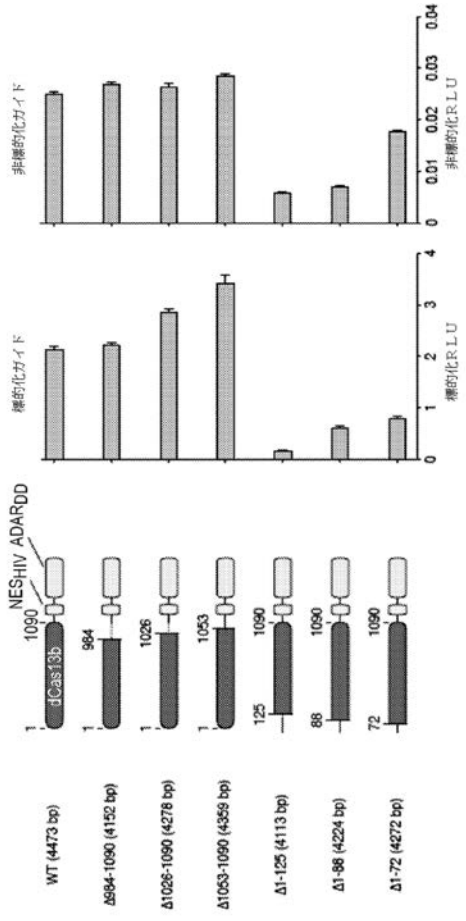


図５９

【図６０Ａ】

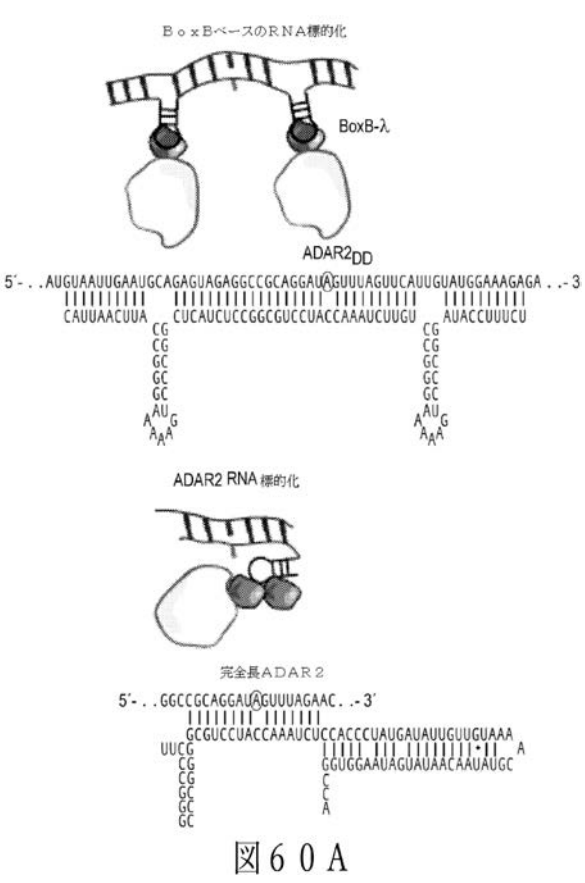


図６０Ａ

【図６０Ｂ】

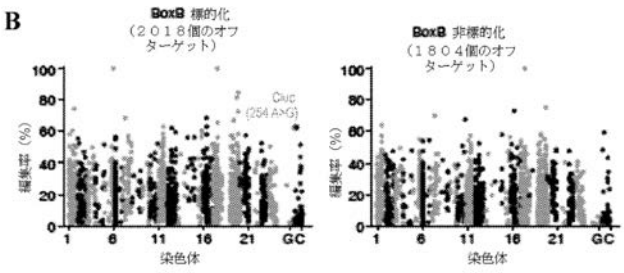


図６０Ｂ

【図６０Ｃ】

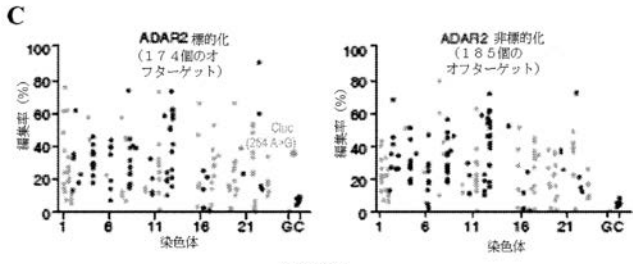


図６０Ｃ

【図６０Ｄ】

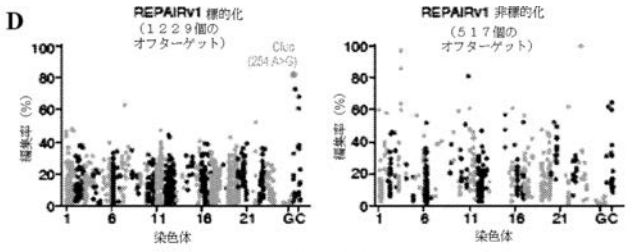


図６０Ｄ

【図６０Ｅ】

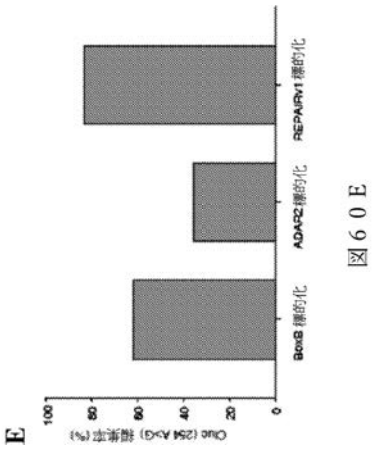


図６０Ｅ

【図６０Ｆ】

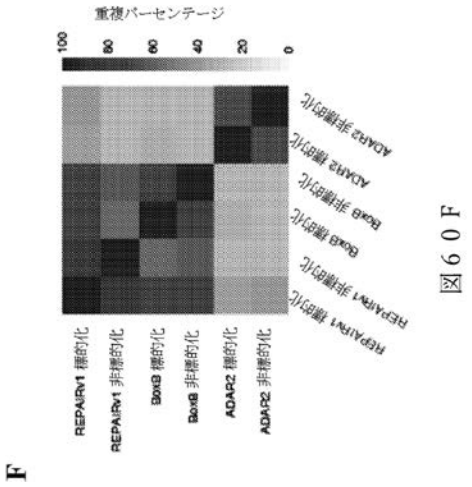


図６０Ｆ

【図６１Ａ】

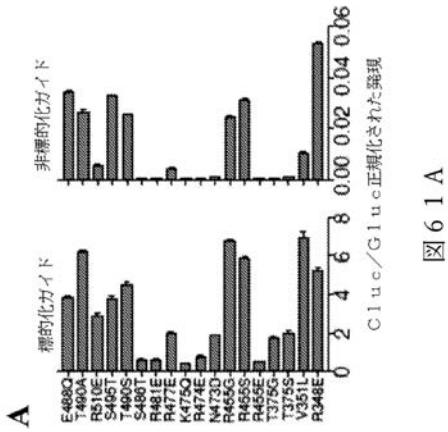


図６１Ａ

【図６１Ｂ】

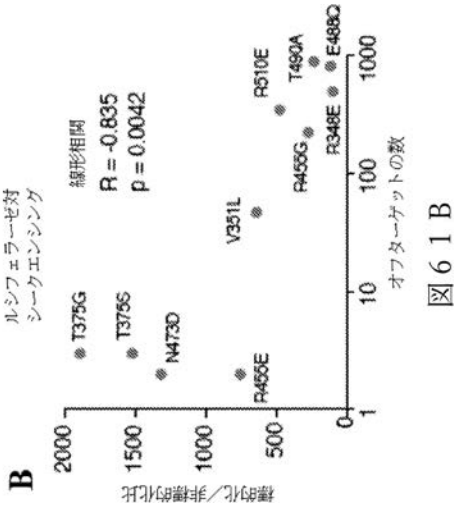


図６１Ｂ

【図６１Ｃ】

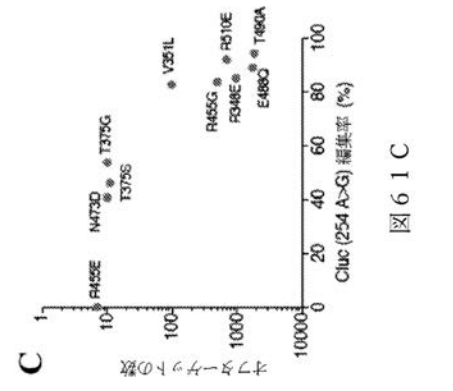


図６１Ｃ

【図６２Ａ】

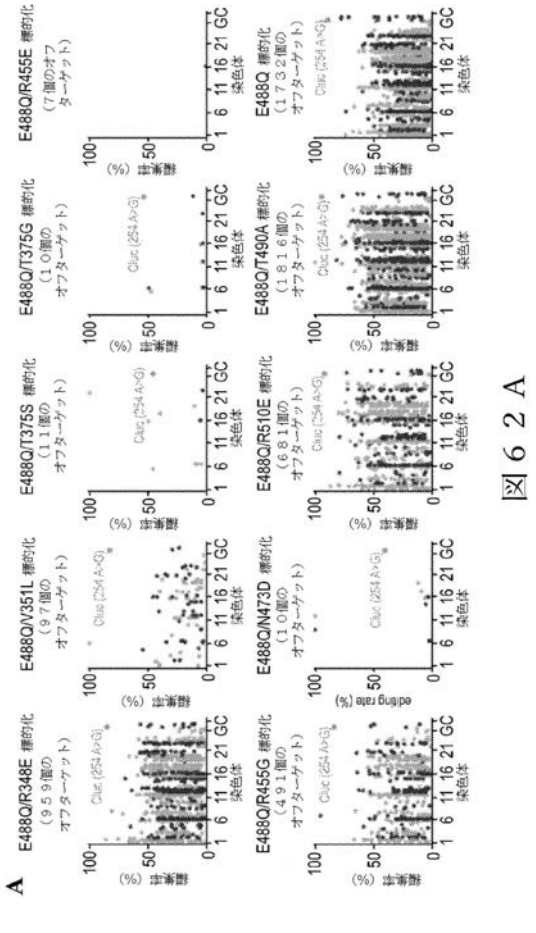


図６２Ａ

【図６２Ｂ】

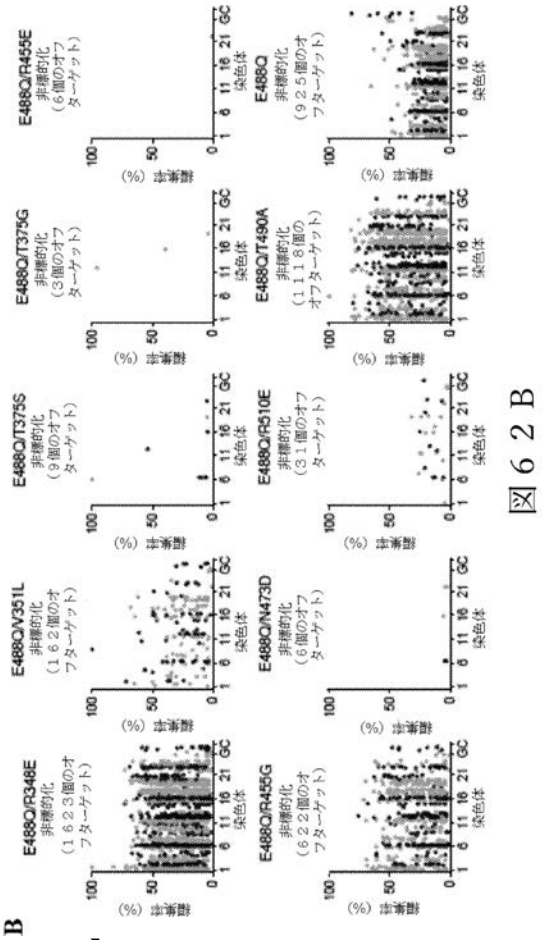


図６２Ｂ

【図６３Ａ】

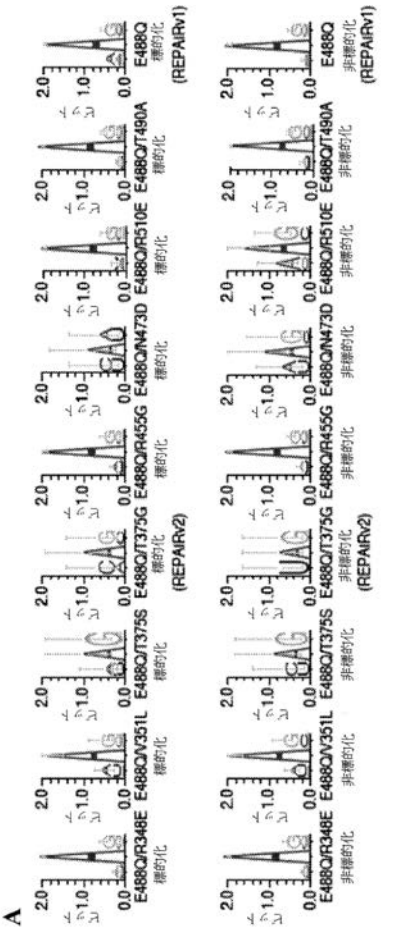


図６３Ａ

【図６３Ｂ】

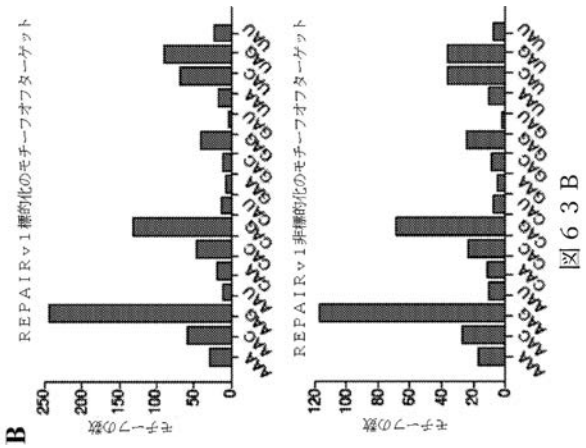


図６３Ｂ

【図６３Ｃ】

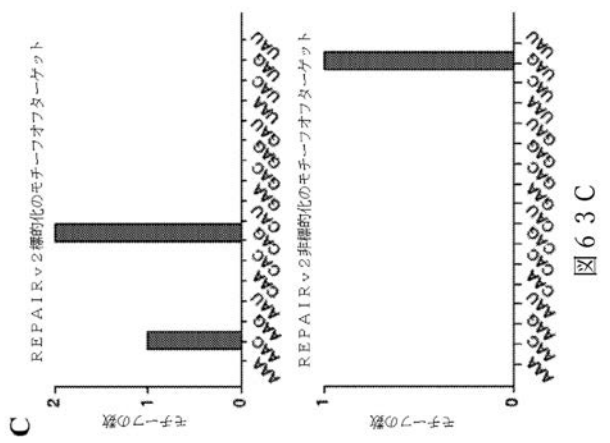


図６３Ｃ

【図６４Ａ】

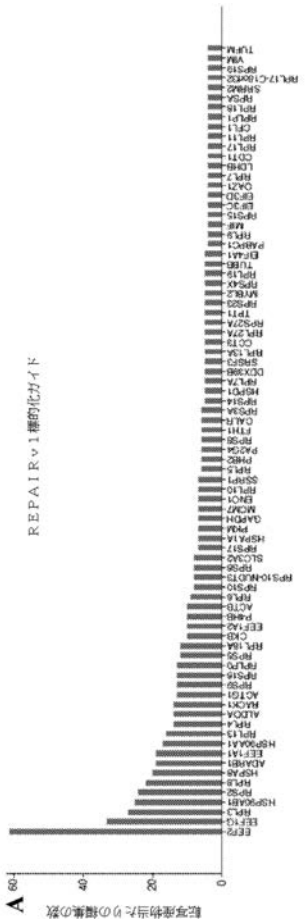


図６４Ａ

【図６４Ｂ】

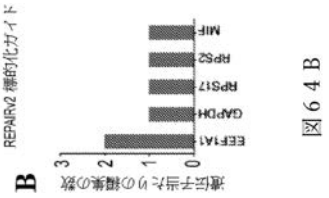


図６４Ｂ

【図６４Ｃ】

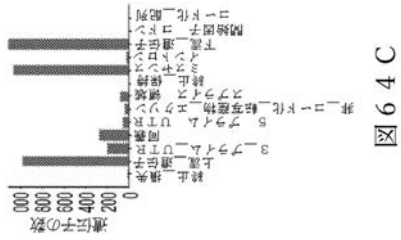


図６４Ｃ

【図６４Ｄ】

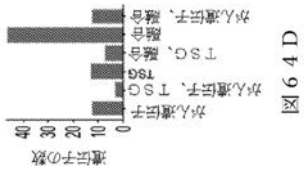


図６４Ｄ

【図６４Ｅ】

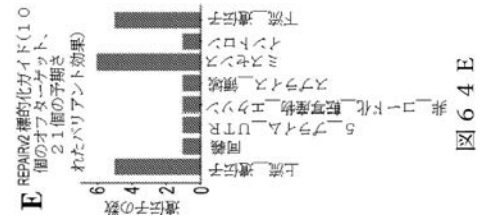


図６４Ｅ

【図６４Ｆ】

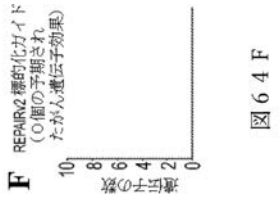


図６４Ｆ

【図６５Ａ】

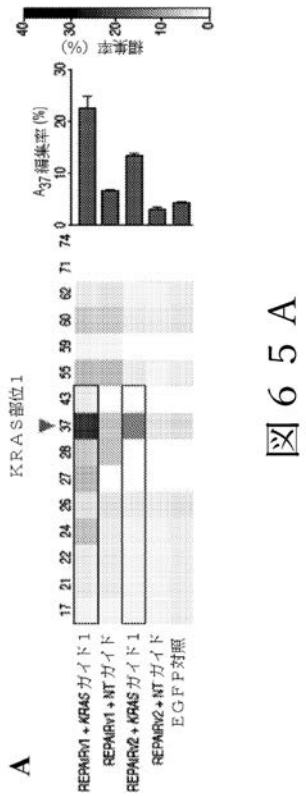


図６５Ａ

【図６５Ｂ】

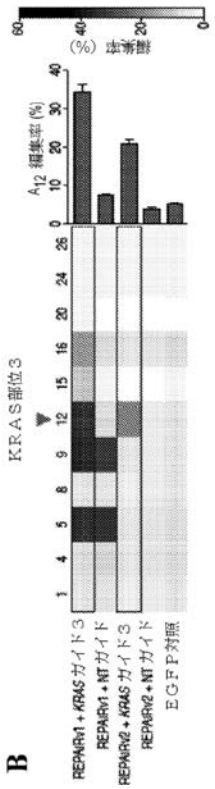


図６５Ｂ

【図６５Ｃ】

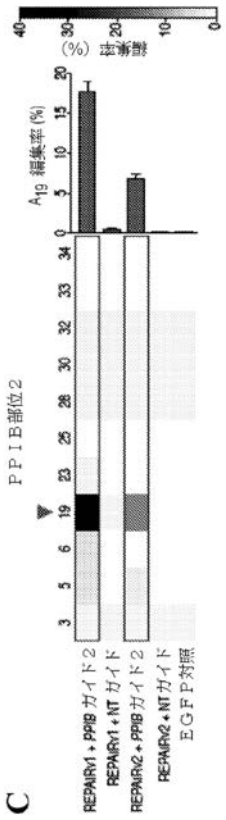


図６５Ｃ

【図６６Ａ】



図６６Ａ

【図６６Ｂ】

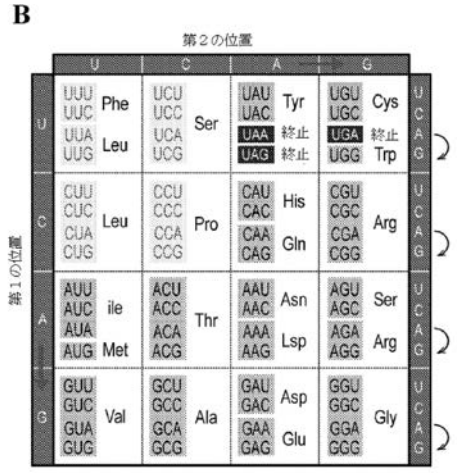


図６６Ｂ

【図６６Ｃ】

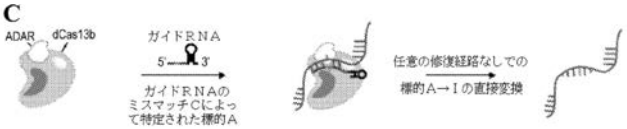


図６６Ｃ

【図６６Ｄ】



図６６Ｄ

【図６６Ｅ】

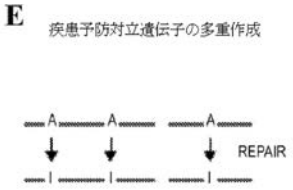


図６６Ｅ

【図６６Ｆ】



図６６Ｆ

【図６６Ｇ】

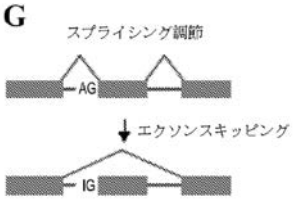


図６６Ｇ

【図６７】

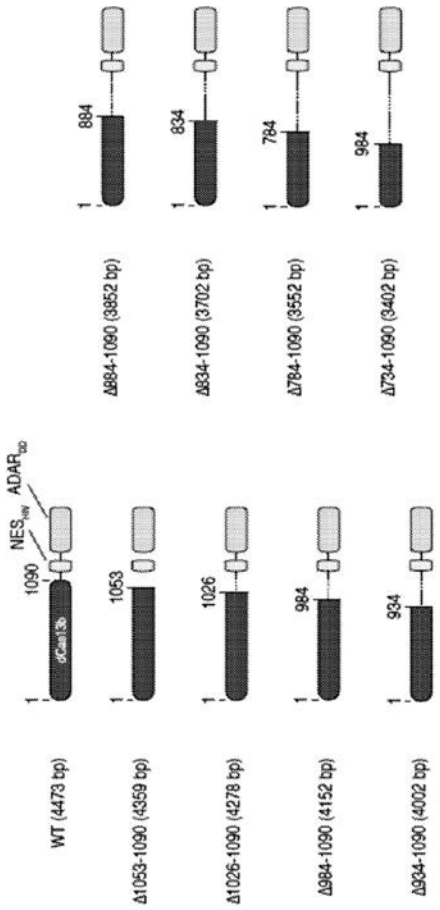


図６７

【図６８】

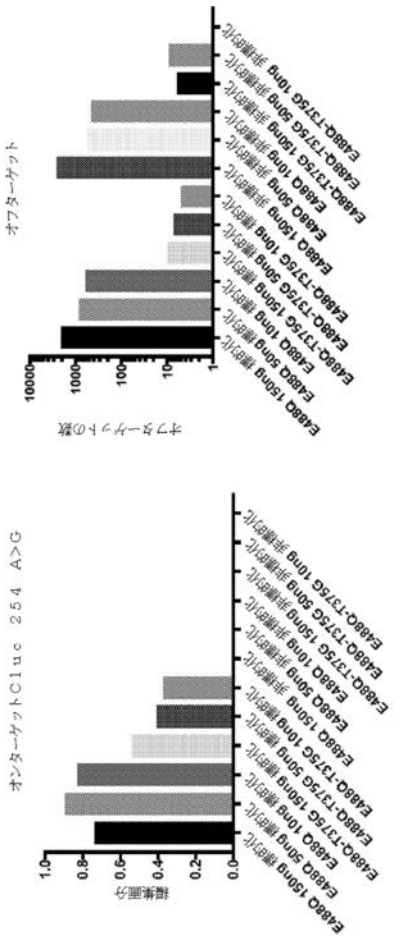


図６８

【図６９】

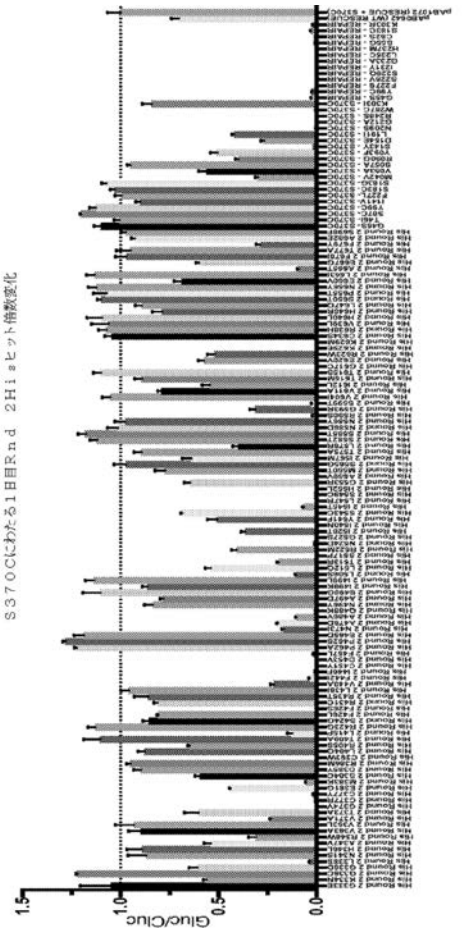


図６９

【図７０】

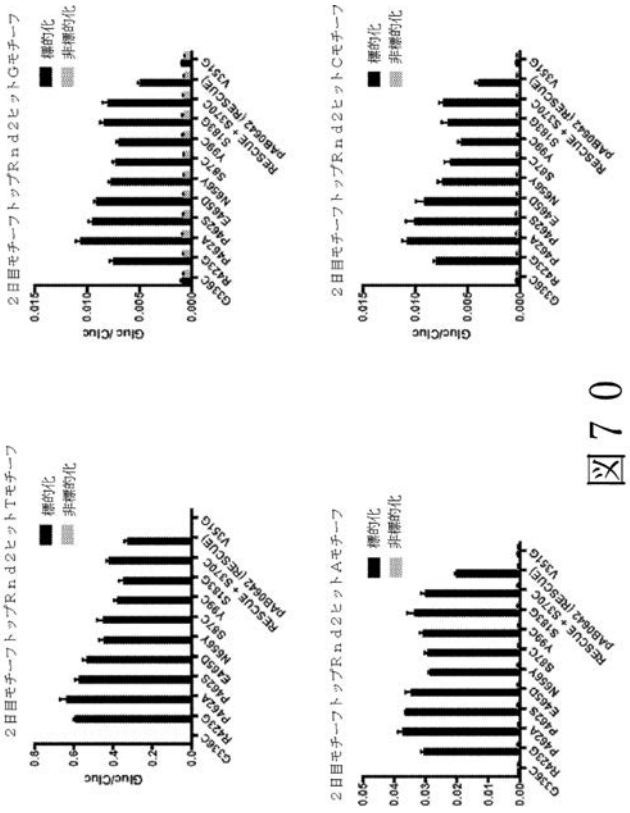


図７０

【図７１】

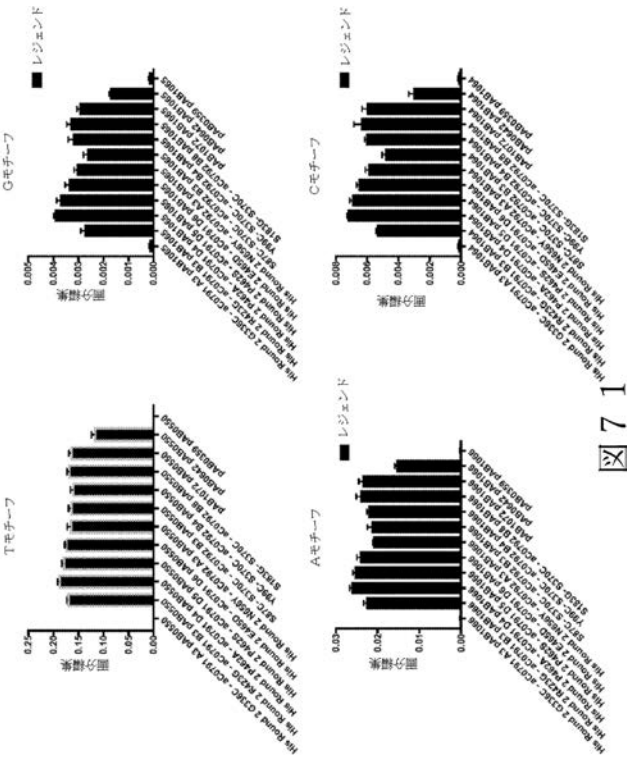


図７１

【図７２】

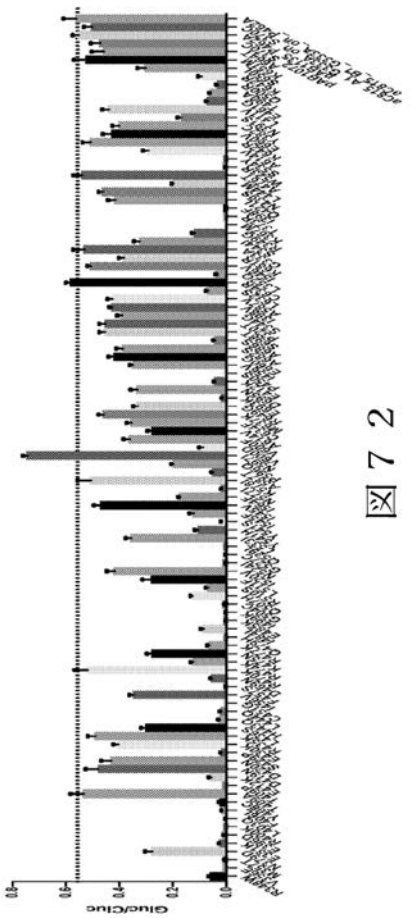


図７２

【図７３】

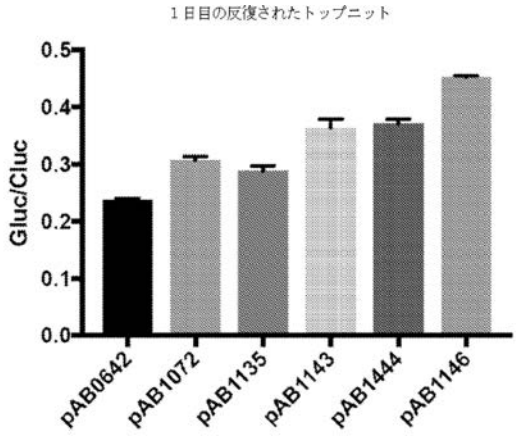


図７３

【図７４】

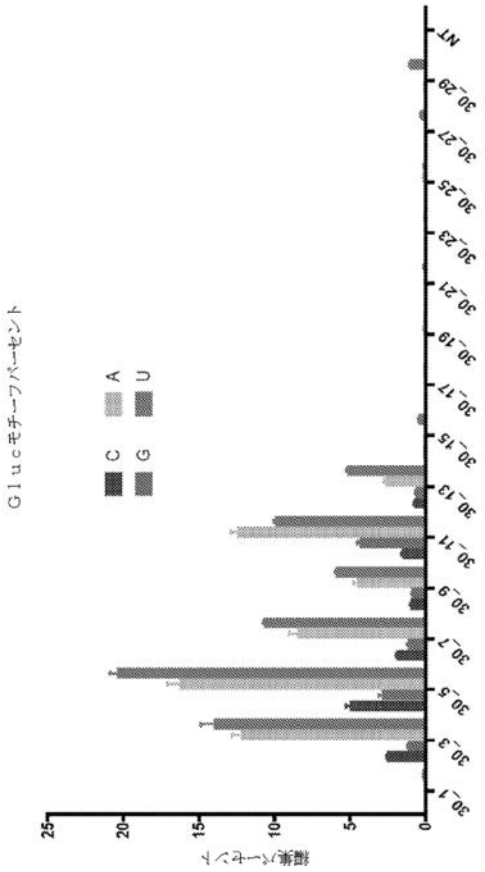


図７４

【図７５】

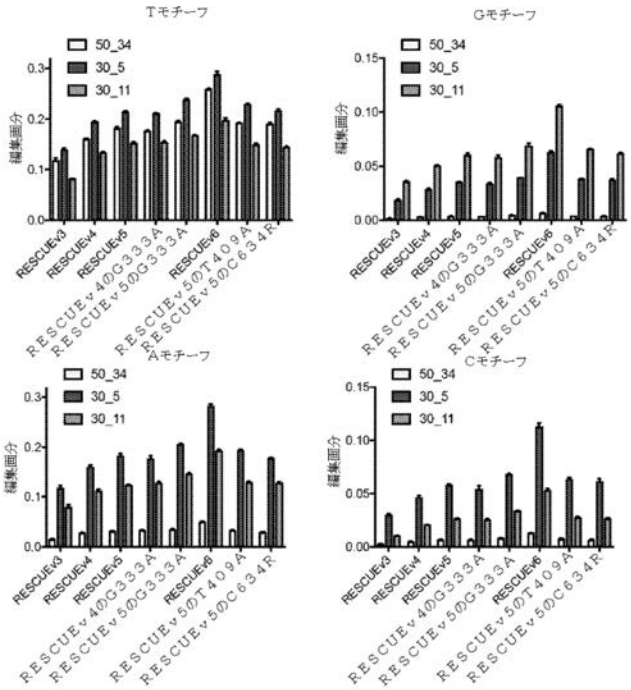


図７５

【図７６】

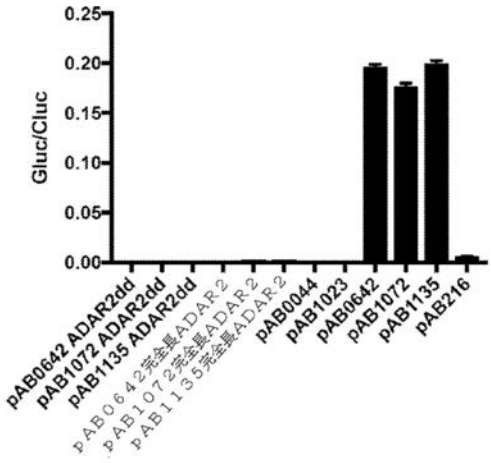


図７６

【配列表】
2020537516000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/054469

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12N 9/22; C12N 9/78 (2018.01)
CPC - C12N 9/22; C12N 9/78; C12N 2310/20; C12N 2310/533; C12Y 305/04001; C12Y 305/04004 (2018.08)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 435/199; 435/227 (keyword delimited)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X – Y	US 2015/0165054 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 18 June 2015 (18.06.2015) entire document	1, 5, 13 --- 2-4, 6-12, 14-30, 32-34, 77-92
Y	KUTTAN et al. "Mechanistic insights into editing-site specificity of ADARs," Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 05 November 2012 (05.11.2012), Vol. 109, No. 48, Pgs. E3295-E3304. entire document	2-4, 6-8, 15, 16, 32-34, 89, 91, 92
Y	WO 2017/070605 A1 (THE BROAD INSTITUTE INC. et al) 27 April 2017 (27.04.2017) entire document	9-12, 14-30, 32-34, 77-92
Y	GOOTENBERG et al. "Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2," Science, 13 April 2017 (13.04.2017), Vol. 356, No. 6336, Pgs. 438-442. entire document	11
Y	WO 2016/097212 A1 (PROQR THERAPEUTICS II B.V.) 23 June 2016 (23.06.2016) entire document	14-30, 32-34, 77-92
Y	WO 2016/205759 A1 (THE BROAD INSTITUTE INC. et al) 22 December 2016 (22.12.2016) entire document	24-27
A	WO 2017/031360 A1 (ARC BIO, LLC) 23 February 2017 (23.02.2017) entire document	1-30, 32-34, 77-92

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 November 2018	10 JAN 2019
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/054469

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 31, 35-76
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*3/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/00		
Ｃ１２Ｎ	*15/55*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ｃ１２Ｎ	*9/22*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/55		
Ｃ０７Ｋ	*19/00*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/22		
Ｃ１２Ｎ	*15/115*	*(2010.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		
Ｃ１２Ｎ	*5/071*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/115	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/071		
Ｃ１２Ｎ	*15/861*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ１２Ｎ	*15/867*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/861	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/113*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/867	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*5/0781*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*5/0783*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0781		
			Ｃ１２Ｎ	5/0783		

(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(71)出願人　505028576
プレジデント　アンド　フェロウズ　オヴ　ハーヴァード　カレッジ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１３８　ケンブリッジ　クインシー・ストリート　１７
(74)代理人　110000109
特許業務法人特許事務所サイクス
(72)発明者　チャン　フェン
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１４２　ケンブリッジ　メイン　ストリート　４１５
(72)発明者　グーテンバーグ　ジョナサン
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１３８　ケンブリッジ　クインシー　ストリート　１７
(72)発明者　アブデイェー　オマール
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１３９　ケンブリッジ　マサチューセッツ　アベニュー　７７

Ｆターム(参考)　4B050 CC04 CC05 CC08 DD02 DD11 KK13 KK18 LL01 LL10
4B065 AA01X AA01Y AA88X AA88Y AA90X AA90Y AA93X AA93Y AA94X AA94Y
AB01 AC14 BA02 BD35 BD39 CA23 CA24 CA31 CA44 CA60
4C084 AA13 NA14 ZB211 ZC211 ZC411
4C087 BB65 CA04 CA12 NA14 ZB21 ZC21 ZC41
4H045 AA10 AA30 BA10 CA11 CA30 CA40 CA51 DA89 EA20 EA60
FA74