(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2024-543481
(P2024-543481A)
(43)公表日　令和6年11月21日(2024.11.21)

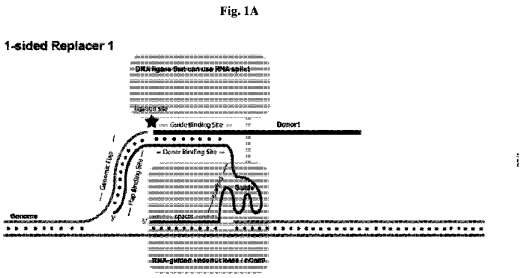
(51)国際特許分類　　FI
C12N 15/09 (2006.01)　　C12N 15/09 Z
C12N 9/22 (2006.01)　　C12N 15/09 110
C12N 9/00 (2006.01)　　C12N 9/22 ZNA
C12N 15/55 (2006.01)　　C12N 9/00
C12N 15/52 (2006.01)　　C12N 15/55
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全192頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-528467(P2024-528467)
(86)(22)出願日　令和4年11月9日(2022.11.9)
(85)翻訳文提出日　令和6年7月11日(2024.7.11)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/079567
(87)国際公開番号　WO2023/086834
(87)国際公開日　令和5年5月19日(2023.5.19)
(31)優先権主張番号　63/278,886
(32)優先日　令和3年11月12日(2021.11.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/341,200
(32)優先日　令和4年5月12日(2022.5.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　524179318
リプレイス セラピューティクス リミテッド ライアビリティ カンパニー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４６０８ エメリーヴィル パウエル ストリート １２５０ アパートメント ４
(74)代理人　100103610
弁理士　▲吉▼田 和彦
(74)代理人　100109070
弁理士　須田 洋之
(74)代理人　100119013
弁理士　山崎 一夫
(74)代理人　100123777
弁理士　市川 さつき
(74)代理人　100111796
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　直接置き換えゲノム編集

(57)【要約】
本明細書に記載されるのは、核酸編集のための組成物、システム、及び方法である。編集は、エンドヌクレアーゼにカップリングされたリガーゼを使用して達成され得る。核酸編集は、標的核酸への組み込み核酸のライゲーションを含み得る。核酸編集は、標的核酸の一部を組み込み核酸と置き換えることを含み得る。
【選択図】図１Ａ



【特許請求の範囲】
【請求項１】
システムであって、
ＤＮＡリガーゼにカップリングされたエンドヌクレアーゼと、
標的核酸内の前記エンドヌクレアーゼによって生成された鎖切断に前記ＤＮＡリガーゼによってライゲーションされるように構成された組み込み核酸と、を含む、前記システム。
【請求項２】
前記カップリングが、共有結合である、請求項１に記載のシステム。
【請求項３】
前記エンドヌクレアーゼ及び前記ＤＮＡリガーゼを含む融合タンパク質を含む、請求項２に記載のシステム。
【請求項４】
前記エンドヌクレアーゼが、前記融合タンパク質内の前記ＤＮＡリガーゼに対してアミノ（Ｎ）末端である、請求項３に記載のシステム。
【請求項５】
前記エンドヌクレアーゼが、前記融合タンパク質内の前記ＤＮＡリガーゼに対してカルボキシ（Ｃ）末端である、請求項３に記載のシステム。
【請求項６】
前記融合タンパク質が、前記エンドヌクレアーゼと前記ＤＮＡリガーゼとを接続する１～１００個のアミノ酸を含むリンカーを含む、請求項３に記載のシステム。
【請求項７】
前記カップリングが、非共有結合である、請求項１に記載のシステム。
【請求項８】
前記ＤＮＡリガーゼにカップリングされた前記エンドヌクレアーゼが、前記エンドヌクレアーゼの少なくとも一部を含む第１のポリペプチドと、前記ＤＮＡリガーゼの少なくとも一部を含む第２のポリペプチドと、を含み、前記第１及び前記第２のポリペプチドが、非共有結合的にカップリングされている、請求項７に記載のシステム。
【請求項９】
前記第１のポリペプチドが、第２のヘテロ二量体化ドメインに結合する第１のヘテロ二量体化ドメインを含み、前記第２のポリペプチドが、前記第２のヘテロ二量体化ドメインを含む、請求項８に記載のシステム。
【請求項１０】
ヘテロ二量体ドメインが、ロイシンジッパー、ＰＤＺドメイン、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン結合タンパク質、フォールドンドメイン、疎水性部分、またはその機能的結合断片を含む、請求項９に記載のシステム。
【請求項１１】
前記第１のポリペプチドが、第２のインテインに結合する第１のインテインを含み、前記第２のポリペプチドが、前記第２のインテインを含む、請求項８に記載のシステム。
【請求項１２】
前記リガーゼが、ヘアピン結合モチーフを含み、前記エンドヌクレアーゼ及び前記ＤＮＡリガーゼが、前記エンドヌクレアーゼに結合する足場及び前記ヘアピン結合モチーフに結合するヘアピンを含む核酸とカップリングされている、請求項１に記載のシステム。
【請求項１３】
前記ヘアピン結合モチーフが、ＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）ペプチドを含み、前記ヘアピンが、ＭＳ２ヘアピンを含む、請求項１２に記載のシステム。
【請求項１４】
前記エンドヌクレアーゼ及び前記ＤＮＡリガーゼが、エンドヌクレアーゼ結合ドメイン及びＤＮＡリガーゼ結合ドメインを含むヘテロ二官能性分子とカップリングされている、請求項１に記載のシステム。
【請求項１５】

前記ヘテロ二官能性分子が、小分子を含む、請求項１４に記載のシステム。
【請求項１６】
ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ及びＤＮＡリガーゼを含有する細胞であって、これらの両方が前記細胞とは異種である、前記細胞と、標的核酸内の前記エンドヌクレアーゼによって生成された鎖切断に前記ＤＮＡリガーゼによってライゲーションされるように構成された組み込み核酸と、を含む、システム。
【請求項１７】
異種ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと、内因性ＤＮＡリガーゼと、標的核酸内の前記エンドヌクレアーゼによって生成された鎖切断に前記ＤＮＡリガーゼによってライゲーションされるように構成された組み込み核酸とを含有する細胞を含む、システム。
【請求項１８】
前記エンドヌクレアーゼが、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含む、請求項１～１７のいずれか１項に記載のシステム。
【請求項１９】
前記エンドヌクレアーゼが、クラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼを含む、請求項１８に記載のシステム。
【請求項２０】
前記エンドヌクレアーゼが、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを含む、請求項１９に記載のシステム。
【請求項２１】
前記エンドヌクレアーゼが、ニッカーゼを含む、請求項１８に記載のシステム。
【請求項２２】
前記エンドヌクレアーゼが、Ｃａｓ９ニッカーゼを含む、請求項２１に記載のシステム。
【請求項２３】
前記ＤＮＡリガーゼが、ＤＮＡスプリントに対合したＤＮＡ鎖塩基をライゲーションする、請求項１～１７のいずれか１項に記載のシステム。
【請求項２４】
前記ＤＮＡリガーゼが、ＲＮＡスプリントに対合したＤＮＡ鎖塩基をライゲーションする、請求項１～１７のいずれか１項に記載のシステム。
【請求項２５】
前記エンドヌクレアーゼまたは前記ＤＮＡリガーゼが、核局在化シグナル、クロマチン修飾ドメイン、細胞透過性ペプチド、またはタグポリペプチドを含む、請求項１～１７のいずれか１項に記載のシステム。
【請求項２６】
ガイドＲＮＡを更に含む、請求項１８に記載のシステム。
【請求項２７】
請求項１～１６のいずれか１項に記載のエンドヌクレアーゼまたはＤＮＡリガーゼをコードする、１つ以上の核酸。
【請求項２８】
請求項１～１５のいずれか１項に記載のシステムを含む、細胞。
【請求項２９】
核酸のシステムであって、
ａ．ガイド核酸であって、
ｉ．ゲノム鎖のゲノム遺伝子座の領域に相補的なスペーサー、
ｉｉ．エンドヌクレアーゼと複合体化するための足場、
ｉｉｉ．組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択のドナー結合部位、及び
ｉｖ．前記ゲノム遺伝子座における、または前記ゲノム遺伝子座に隣接するゲノムフラップと少なくとも部分的に同一または相補的であるフラップ結合部位を含む、前記ガイ

ド核酸と、
ｂ．前記エンドヌクレアーゼによって生成された前記ゲノム鎖の３’末端にライゲーションされる５’末端を含む、組み込み核酸と、を含む、前記核酸のシステム。
【請求項３０】
核酸のシステムであって、
ａ．ガイド核酸であって、
ｉ．ゲノム鎖のゲノム遺伝子座の領域に相補的なスペーサー、
ｉｉ．エンドヌクレアーゼと複合体化するための足場、及び
ｉｉｉ．スプリント核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択のドナー結合部位を含む、前記ガイド核酸と、
ｂ．前記エンドヌクレアーゼによって生成された前記ゲノム鎖の３’末端にライゲーションされる５’末端を含む、組み込み核酸と、
ｃ．前記ゲノム遺伝子座における、または前記ゲノム遺伝子座に隣接するゲノムフラップと少なくとも部分的に同一または相補的であるフラップ結合部位を含み、かつガイド核酸と少なくとも部分的に相補的である任意選択のガイド結合部位を含むスプリント核酸と、を含む、前記核酸のシステム。
【請求項３１】
前記ゲノム鎖が、細胞内にある、請求項２９または３０に記載のシステム。
【請求項３２】
前記スプリント核酸が、前記組み込み核酸の一部と少なくとも部分的に同一であるか、または相補的であるドナー結合部位を更に含む、請求項２９または３０に記載のシステム。
【請求項３３】
前記ガイド核酸が、前記足場と前記ドナー結合部位との間の連結核酸の配列を含む、請求項２９または３０に記載のシステム。
【請求項３４】
前記ガイド核酸、前記組み込み核酸、または前記スプリント核酸が、修飾ヌクレオシド間結合を含む、請求項２９または３０に記載のシステム。
【請求項３５】
前記修飾ヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエート結合を含む、請求項３４に記載のシステム。
【請求項３６】
前記ガイド核酸、前記組み込み核酸、または前記スプリント核酸が、修飾ヌクレオシドを含む、請求項２９または３０に記載のシステム。
【請求項３７】
前記修飾ヌクレオシドが、ロックド核酸（ＬＮＡ）、２’フルオロ、２’Ｏ－アルキル、メチル化シトシン、逆チミジン、またはそれらの組み合わせを含む、請求項３６に記載のシステム。
【請求項３８】
前記エンドヌクレアーゼが、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含む、請求項２９または３０に記載のシステム。
【請求項３９】
前記エンドヌクレアーゼが、クラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼを含む、請求項３８に記載のシステム。
【請求項４０】
前記エンドヌクレアーゼが、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを含む、請求項３９に記載のシステム。
【請求項４１】
前記エンドヌクレアーゼが、ニッカーゼを含む、請求項３８に記載のシステム。
【請求項４２】

前記エンドヌクレアーゼが、Ｃａｓ９ニッカーゼを含む、請求項４１に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

相互参照

本出願は、２０２１年１１月１２日に出願された米国仮特許出願第６３／２７８，８８６号、及び２０２２年５月１２日に出願された米国仮特許出願第６３／３４１，２００号の利益を主張するものであり、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

配列表

本出願は、ＸＭＬファイルフォーマットで電子的に提出され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。２０２２年１１月９日に作成された当該ＸＭＬコピーは、Ｒｅｐｌａｃｅ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　６２９４２－７０１６０１（ＰＣＴ）．ｘｍｌと名付けられ、７０３，８９１バイトのサイズである。

【背景技術】

【０００３】

核酸を修飾するために、改善された遺伝子編集方法が必要である。

【発明の概要】

【０００４】

本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、ＤＮＡリガーゼにカップリングされたＤＮＡ結合タンパク質を含むシステムまたは組成物である。ＤＮＡ結合タンパク質は、エンドヌクレアーゼを含み得る。エンドヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含み得る。いくつかの態様では、カップリングは、共有結合である。いくつかの態様は、ＤＮＡ結合タンパク質（例えば、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼ）及びＤＮＡリガーゼを含む融合タンパク質を含む。いくつかの態様は、ＤＮＡ結合タンパク質（例えば、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼ）及びＤＮＡリガーゼを含有する細胞を含む組成物を含み、これらの両方は、細胞とは異種である。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質は、融合タンパク質内のＤＮＡリガーゼに対してアミノ（Ｎ）末端である。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質は、融合タンパク質内のＤＮＡリガーゼに対してカルボキシ（Ｃ）末端である。いくつかの態様では、接続は、１～１００個のアミノ酸を含むリンカーを含む。いくつかの態様では、カップリングは、非共有結合である。いくつかの態様では、組成物は、ＤＮＡ結合タンパク質の少なくとも一部を含む第１のポリペプチドと、ＤＮＡリガーゼの少なくとも一部を含む第２のポリペプチドと、を含み、第１及び第２のポリペプチドが、非共有結合的にカップリングされている。いくつかの態様では、第１のポリペプチドは、第２のヘテロ二量体化ドメインに結合する第１のヘテロ二量体化ドメインを含み、第２のポリペプチドは、第２のヘテロ二量体化ドメインを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体ドメインは、ロイシンジッパー、ＰＤＺドメイン、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン結合タンパク質、フォールドンドメイン、疎水性部分、またはその機能的結合断片を含む。いくつかの態様では、第１のポリペプチドは、第２のインテインに結合する第１のインテインを含み、第２のポリペプチドは、第２のインテインを含む。いくつかの態様では、リガーゼは、ヘアピン結合モチーフを含み、ＤＮＡ結合タンパク質及びＤＮＡリガーゼは、ＤＮＡ結合タンパク質に結合する足場及びヘアピン結合モチーフに結合するヘアピンを含む核酸とカップリングされている。いくつかの態様では、ヘアピン結合モチーフは、ＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）ペプチドを含み、ヘアピンは、ＭＳ２ヘアピンを含む。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質及びＤＮＡリガーゼは、エンドヌクレアーゼ結合ドメイン及びＤＮＡリガーゼ結合ドメインを含むヘテロ二官能性分子とカップリングされている。いくつかの態様では、ヘテロ二官能性分子は、小分子を含む。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質は、クラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼを含む

。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質は、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質は、ニッカーゼを含む。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質は、配列番号１～１３のうちのいずれか１つのアミノ酸配列と少なくとも８０％同一のアミノ酸配列、またはその機能的断片を含む。いくつかの態様では、ＤＮＡリガーゼは、ＤＮＡスプリントに対合したＤＮＡ鎖塩基をライゲーションする。いくつかの態様では、ＤＮＡリガーゼは、ＲＮＡスプリントに対合したＤＮＡ鎖塩基をライゲーションする。いくつかの態様では、ＤＮＡリガーゼは、配列番号５５～９６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列と少なくとも８０％同一のアミノ酸配列、またはその機能的断片を含む。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質またはＤＮＡリガーゼは、核局在化シグナル、クロマチン修飾ドメイン、細胞透過性ペプチド、またはタグポリペプチドを含む。いくつかの態様は、ガイドＲＮＡ及び組み込み核酸を含む。いくつかの態様は、組成物をコードする１つ以上の核酸を含む。いくつかの態様は、組成物を含むか、または１つ以上の核酸を含む細胞を含む。

【０００５】

本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、細胞内の標的核酸を、標的核酸の所定の遺伝子座でエンドヌクレアーゼと接触させ、それによって標的核酸の所定の遺伝子座にニックを導入することと、予備合成された組み込み核酸を細胞に導入することと、予備合成された組み込み核酸の５’末端を、標的核酸の所定の遺伝子座でニックの３’末端にライゲーションすることと、を含む、編集方法である。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、クラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、Ｃａｓ９ニッカーゼを含む。いくつかの態様は、エンドヌクレアーゼ及び標的核酸の所定の遺伝子座をガイド核酸と接触させることを含む。いくつかの態様では、前述のライゲーションは、エンドヌクレアーゼにカップリングされたリガーゼによって行われる。いくつかの態様では、予備合成された組み込み核酸は、標的核酸に関して変異を含む。いくつかの態様では、ニックは、そうでなければ二本鎖標的核酸における単一のホスホジエステル鎖切断を含む。いくつかの態様では、ニックは、標的核酸の鎖の非粘着性の非鈍末端を含む。いくつかの態様では、標的核酸は、細胞の染色体を含む。いくつかの態様では、細胞は、真核性である。

【０００６】

本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、リガーゼと、標的核酸の所定の遺伝子座にニックを導入するエンドヌクレアーゼと、リガーゼによって標的核酸の所定の遺伝子座のニックの３’末端にライゲーションされる５’末端を含む、予備合成された組み込み核酸と、を含む、編集システムである。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、クラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、Ｃａｓ９ニッカーゼを含む。いくつかの態様は、エンドヌクレアーゼを標的核酸の所定の遺伝子座に近接させるガイド核酸を含む。いくつかの態様では、リガーゼは、エンドヌクレアーゼにカップリングされる。いくつかの態様では、予備合成された組み込み核酸は、標的核酸に関して変異を含む。いくつかの態様では、ニックは、そうでなければ二本鎖標的核酸における単一のホスホジエステル鎖切断を含む。いくつかの態様では、ニックは、標的核酸の鎖の非粘着性の非鈍末端を含む。いくつかの態様では、標的核酸は、細胞の染色体を含む。いくつかの態様では、細胞は、真核性である。

【０００７】

本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、（ａ）ゲノム鎖のゲノム遺伝子座の領域に相補的なスペーサー、（ｂ）ＤＮＡ結合タンパク質と複合体化するための足場、（ｃ）組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択のドナー結合部位、及び（ｄ）ゲノム遺伝子座における、またはそれに隣接するゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的であるフラップ結合部位を含む、ガイド核酸と、ＤＮＡ結合タンパク質によって生成されたゲノム鎖の３’末端にライゲーションされる５’末端を含む組み込み核酸と、を含む、核酸のシステムである。ＤＮＡ結合タンパク質は、エンドヌクレアーゼを含み得る。エンドヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含み得る。本明

細書に開示されるのは、いくつかの態様では、（ａ）ゲノム鎖のゲノム遺伝子座の領域に相補的なスペーサー、（ｂ）ＤＮＡ結合タンパク質と複合体化するための足場、及び（ｃ）スプリント核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択のドナー結合部位を含む、ガイド核酸と、ＤＮＡ結合タンパク質によって生成されたゲノム鎖の３’末端にライゲーションされる５’末端を含む組み込み核酸と、ゲノム遺伝子座における、またはそれに隣接するゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的であるフラップ結合部位を含み、かつガイド核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択のガイド結合部位を含むスプリント核酸と、を含む、核酸のシステムである。いくつかの態様では、ゲノム鎖は、細胞内にある。いくつかの態様では、スプリント核酸は、組み込み核酸の一部と少なくとも部分的に同一または相補的なドナー結合部位を更に含む。いくつかの態様では、ガイド核酸は、足場とドナー結合部位との間の結合核酸の配列を含む。いくつかの態様では、ガイド核酸または組み込み核酸は、修飾ヌクレオシド間結合を含む。いくつかの態様では、修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合を含む。いくつかの態様では、修飾ヌクレオシド間結合は、ガイド核酸または組み込み核酸の５’末端または３’末端における４つの末端ヌクレオシドのうちのいずれかの間である。いくつかの態様では、ガイド核酸または組み込み核酸は、修飾ヌクレオシドを含む。いくつかの態様では、修飾ヌクレオシドは、ロックド核酸（ＬＮＡ）、２’フルオロ、２’Ｏ－アルキル、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの態様では、修飾ヌクレオシドは、ガイド核酸または組み込み核酸の５’末端または３’末端における３末端ヌクレオシドのうちのいずれかである。修飾ヌクレオシドは、ＬＮＡ、２’フルオロ、２’Ｏ－アルキル、メチル化シトシン、反転チミジン、またはそれらの組み合わせを含み得る。

【０００８】

本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、ＤＮＡリガーゼに接続されたＤＮＡ結合タンパク質を含む組成物である。ＤＮＡ結合タンパク質は、エンドヌクレアーゼを含み得る。エンドヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含み得る。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質とＤＮＡリガーゼとの間の接続は、共有結合である。いくつかの態様は、ＤＮＡリガーゼの上流にＤＮＡ結合タンパク質を含む融合タンパク質を含む。いくつかの態様は、ＤＮＡリガーゼの下流にＤＮＡ結合タンパク質を含む融合タンパク質を含む。いくつかの態様では、接続は、１～１００アミノ酸を含むリンカーを含む。いくつかの態様では、組成物は、ＤＮＡ結合タンパク質の少なくとも一部を含む第１のポリペプチドと、ＤＮＡリガーゼの少なくとも一部を含む第２のポリペプチドと、を含み、第１及び第２のポリペプチドが、共有結合的または非共有結合的に結合される。いくつかの態様では、第１のポリペプチドは、第２のヘテロ二量体化ドメインに結合する第１のヘテロ二量体化ドメインを含み、第２のポリペプチドは、第２のヘテロ二量体化ドメインを含む。いくつかの態様では、ヘテロ二量体ドメインは、ロイシンジッパー、ＰＤＺドメイン、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン結合タンパク質、フォールドンドメイン、疎水性部分、またはその機能的結合断片を含む。いくつかの態様では、第１のポリペプチドは、第２のインテインに結合する第１のインテインを含み、第２のポリペプチドは、第２のインテインを含む。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質及びＤＮＡリガーゼは、小分子によって一緒に結合される。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質は、クラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質は、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質は、ニッカーゼを含む。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質は、配列番号１～１３のうちのいずれか１つのアミノ酸配列と少なくとも８０％同一のアミノ酸配列、またはその機能的断片を含む。いくつかの態様では、ＤＮＡリガーゼは、ＤＮＡスプリントに対合したＤＮＡ鎖塩基をライゲーションする。いくつかの態様では、ＤＮＡリガーゼは、ＲＮＡスプリントに対合したＤＮＡ鎖塩基をライゲーションする。いくつかの態様では、ＤＮＡリガーゼは、配列番号５５～９６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列と少なくとも８０％同一のアミノ酸配列、またはその機能的断片を含む。いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質またはＤＮＡリガーゼは、核局在化シグナル、クロ

マチン修飾ドメイン、細胞膜透過性ペプチド、またはタグポリペプチドを含む。いくつかの態様は、ガイドＲＮＡ及び組み込み核酸を含む。いくつかの態様は、組成物を含む細胞に関する。いくつかの態様は、組成物をコードする核酸を含む。いくつかの態様は、第１または第２のポリペプチドをコードする１つ以上の核酸を含む。いくつかの態様は、組成物を使用する編集方法（例えば、核酸）を含む。いくつかの態様は、組成物を使用した治療方法を含む。いくつかの態様は、組成物を対象に投与することを含む。

【０００９】

本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、ＤＮＡリガーゼに融合されたＤＮＡ結合タンパク質を含む融合タンパク質である。ＤＮＡ結合タンパク質は、エンドヌクレアーゼを含み得る。エンドヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含み得る。本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、ＤＮＡリガーゼに結合したＤＮＡ結合タンパク質を含むタンパク質複合体である。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼ及びＤＮＡリガーゼは、ヘテロ二量体化ドメインを介して一緒に結合される。いくつかの態様では、ヘテロ二量体化ドメインは、ロイシンジッパー、ＰＤＺドメイン、ストレプトアビジン及びストレプトアビジン結合タンパク質、フォールドンドメイン、疎水性ポリペプチド、Ｃａｓニッカーゼに結合する抗体、またはＤＮＡリガーゼに結合する抗体、またはそれらの１つ以上の結合断片を含む。本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、融合タンパク質またはタンパク質複合体を含む細胞である。本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、異種ＤＮＡ結合タンパク質及び細胞に導入されたＤＮＡリガーゼを含む細胞である。いくつかの態様は、ＤＮＡ結合タンパク質とは異なるヌクレアーゼを含む。本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、標的核酸の第１の領域に少なくとも部分的に相補的なスペーサーと、エンドヌクレアーゼに結合するように構成された足場と、核酸フラップに少なくとも部分的に逆相補的なフラップ結合部位と、組み込み核酸結合部位と、を含むガイド核酸である。本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、標的核酸に挿入される一本鎖または二本鎖ＤＮＡ領域を含む組み込み核酸であり、一本鎖または二本鎖ＤＮＡ領域は、ガイド結合部位を含む少なくとも１つの追加の一本鎖領域に隣接している。本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質、ガイド核酸、及び組み込み核酸を含む編集システムである。本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、標的核酸を編集システム及びＤＮＡリガーゼと接触させることを含む、編集方法である。

【００１０】

本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質と、細胞内のゲノム遺伝子座に少なくとも部分的に相補的なスペーサー、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質と複合体化するための足場、及び組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的な任意選択のドナー結合部位を含む、少なくとも１つのガイド核酸と、少なくとも１つのＤＮＡリガーゼと、核酸フラップに少なくとも部分的に逆相補的なフラップ結合部位を含み、任意選択的に、少なくとも１つのガイド核酸に少なくとも部分的に相補的なガイド結合部位を含む、組み込み核酸と、を含む、システムであって、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質は、ゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断またはニックし、少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、組み込み核酸の末端をゲノムフラップ部位にライゲーションし、それによって、遺伝子座の領域を細胞内の組み込み核酸と置き換える、システムである。ＤＮＡ結合タンパク質は、エンドヌクレアーゼを含み得る。エンドヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含み得る。いくつかの態様では、組み込み核酸は、一本鎖ＤＮＡを含む。いくつかの態様では、組み込み核酸は、二本鎖ＤＮＡを含む。

【００１１】

本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、第１のＤＮＡ結合タンパク質及び任意選択の第２のＤＮＡ結合タンパク質を含む少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質と、第１のガイド核酸及び第２のガイド核酸を含む少なくとも１つのガイド核酸と、を含むシステムであり、第１のガイド核酸は、細胞内のゲノム遺伝子座の第１の領域に相補的な第

１のスペーサーと、第１のＤＮＡ結合タンパク質と複合体化するための第１の足場と、組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的な任意選択の第１のドナー結合部位と、ゲノム遺伝子座における、またはそれに隣接する第１のゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的である第１のフラップ結合部位と、を含み、第２のガイド核酸は、細胞内のゲノム遺伝子座の第２の領域に相補的な第２のスペーサーと、第１または第２のＤＮＡ結合タンパク質と複合体化するための第２の足場と、組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的な任意選択の第２のドナー結合部位と、ゲノム遺伝子座における、またはそれに隣接する第２のゲノムフラップと少なくとも部分的に同一または相補的である第２のフラップ結合部位と、第１のＤＮＡリガーゼ及び任意選択の第２のＤＮＡリガーゼを含む少なくとも１つのＤＮＡリガーゼと、第１の鎖及び第２の鎖を含む少なくとも１つの組み込み核酸と、を含み、第１の鎖は、第１のガイド核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択の第１のガイド結合部位を含み、第２の鎖は、第２のガイド核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択の第２のガイド結合部位を含み、第１のＤＮＡ結合タンパク質及び／または第２のＤＮＡ結合タンパク質は各々、細胞内のゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断またはニックし、第１のＤＮＡリガーゼは、組み込み核酸の第１の鎖の末端を第１のゲノムフラップにライゲーションし、第１または第２のＤＮＡリガーゼは、組み込み核酸の第２の鎖の末端を第２のゲノムにライゲーションし、それによって、ゲノム遺伝子座の領域を細胞中の組み込み核酸と置き換える。いくつかの態様では、組み込み核酸は、二本鎖ＤＮＡ二重鎖領域を含む。ＤＮＡ結合タンパク質は、エンドヌクレアーゼを含み得る。エンドヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含み得る。いくつかの態様では、組み込み核酸は、任意選択で、第１のガイド結合部位を含む５’オーバーハングを含む。いくつかの態様では、組み込み核酸は、任意選択で、第２のガイド結合部位を含む５’オーバーハングを含む。

【００１２】

本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質と、細胞内のゲノム遺伝子座に相補的なスペーサー、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質と複合体化するための足場、及び組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的な任意選択のドナー結合部位を含む少なくとも１つのガイド核酸と、少なくとも１つのＤＮＡリガーゼと、少なくとも１つのガイド核酸に少なくとも部分的に相補的な任意選択のガイド結合部位を含み、ゲノム遺伝子座における、またはそれに隣接するゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的なフラップ結合部位を含む組み込み核酸と、を含むシステムであり、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質は、ゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断またはニックし、少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、組み込み核酸の末端をゲノムフラップにライゲーションし、それによって、ゲノム遺伝子座の領域を細胞内の組み込み核酸と置き換える。ＤＮＡ結合タンパク質は、エンドヌクレアーゼを含み得る。エンドヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含み得る。いくつかの態様では、組み込み核酸は、３’オーバーハングを含むＤＮＡを含む。いくつかの態様では、３’オーバーハングは、ガイド結合部位を含む。いくつかの態様では、３’オーバーハングは、フラップ結合部位を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、組み込み核酸の鎖をゲノム核酸配列にライゲーションする。

【００１３】

本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、第１のＤＮＡ結合タンパク質及び任意選択の第２のＤＮＡ結合タンパク質を含む少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質と、第１のガイド核酸及び第２のガイド核酸を含む少なくとも１つのガイド核酸であって、第１のガイド核酸が、細胞内のゲノム遺伝子座の第１の領域に相補的な第１のスペーサー、第１のＤＮＡ結合タンパク質と複合体化するための第１の足場、及び組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的な任意選択の第１のドナー結合部位を含み、第２のガイド核酸が、細胞内のゲノム遺伝子座の第２の領域に相補的な第２のスペーサー、第１または第２のＤＮＡ結合タンパク質と複合体化するための第２の足場、及び組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的な任意の第２のドナー結合部位を含む、少なくとも１つのガイド核酸と、第

１のＤＮＡリガーゼ及び任意選択の第２のＤＮＡリガーゼを含む少なくとも１つのＤＮＡリガーゼと、第１の鎖及び第２の鎖を含む組み込み核酸と、を含むシステムであり、第１の鎖は、第１のガイド核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択の第１のガイド結合部位を含み、第２の鎖は、第２のガイド核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択の第２のガイド結合部位を含み、第１の鎖は、ゲノム遺伝子座における、またはゲノム遺伝子座に隣接している第１のゲノムフラップと少なくとも部分的に同一または相補的である第１のフラップ結合部位を含み、第２の鎖は、ゲノム遺伝子座における、またはゲノム遺伝子座に隣接する第２のゲノムフラップと少なくとも部分的に同一または相補的である第２のフラップ結合部位を含み、第１のＤＮＡ結合タンパク質及び／または第２のＤＮＡ結合タンパク質は、細胞内のゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を各々切断またはニックし、第１のＤＮＡリガーゼは、組み込み核酸の第１の鎖の末端を第１のゲノムフラップにライゲーションし、第１または第２のＤＮＡリガーゼは、組み込み核酸の第２の鎖の末端を第２のゲノムフラップにライゲーションし、それによってゲノム遺伝子座の領域を細胞内の組み込み核酸と置き換える。ＤＮＡ結合タンパク質は、エンドヌクレアーゼを含み得る。エンドヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含み得る。いくつかの態様では、組み込み核酸は、二本鎖ＤＮＡ二重鎖領域を含む。いくつかの態様では、二本鎖ＤＮＡは、任意選択で第１のガイド結合部位を含み、第１のフラップ結合部位を含む、３’オーバーハングを含む。いくつかの態様では、二本鎖ＤＮＡは、任意選択で第２のガイド結合部位を含み、第２のフラップ結合部位を含む、３’オーバーハングを含む。

【００１４】

ＤＮＡ結合タンパク質は、エンドヌクレアーゼを含み得る。エンドヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含み得る。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質は、Ｃａｓタンパク質またはその機能的断片を含む。いくつかの態様では、Ｃａｓタンパク質またはその機能的断片は、ニッカーゼ活性を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質は、Ｃａｓ９ニッカーゼまたはその機能的断片を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、ＤＮＡに結合した核酸をライゲーションする。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、ＲＮＡに結合した核酸をライゲーションする。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、ＰＢＣＶ－１　ＤＮＡリガーゼを含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質に作動可能にカップリングされる。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、融合ポリペプチドとして少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質に融合される。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質及び少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、各々がヘテロ二量体ドメインを含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質及び少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、ヘテロ二量体ドメインを介してヘテロ二量体を形成する。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質は、リンカーを含む。いくつかの態様では、リンカーは、Ｃａｓタンパク質またはその機能的断片をヘテロ二量体ドメインに接続する。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質は、局在化シグナル配列を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、局在化シグナル配列を含む。いくつかの態様では、局在化シグナル配列は、核局在化配列（ＮＬＳ）を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質または少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、ＮＬＳによって細胞の核に向けられる。いくつかの態様では、少なくとも１つの組み込み核酸は、少なくとも１つの遺伝子座における少なくとも１つの遺伝子変異を修正する。いくつかの態様では、少なくとも１つの組み込み核酸は、コード配列を挿入する。いくつかの態様では、コード配列は、全長タンパク質をコードする。いくつかの態様では、少なくとも１つの組み込み核酸は、非コード配列を挿入する。いくつかの態様では、非コード配列は、内因性遺伝子をノックアウトする。いくつかの態様では、非コード配列は、制御要素を含む。いくつかの態様は、ヌクレアーゼを更に含む。いくつかの態様では、ヌクレアーゼは、ゲノムフラップを消化するためのエキソヌクレアーゼを含む。いくつかの態様では、ヌクレアーゼは、ヒトフラップ

エンドヌクレアーゼ１（ｈＦＥＮ１）、ヒトエキソヌクレアーゼ５（ｈＥＸＯ５）、Ｔ５エキソヌクレアーゼ、Ｔ７エキソヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼＶＩＩＩ、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＰｏｌＩのフラップエンドヌクレアーゼドメイン、ＲｅｃＪＦ、ラムダエキソヌクレアーゼ、Ｘｎｉ（ＥｘｏＩＸＩ）、ＳａＦＥＮ（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　ＦＥＮ）、ヌクレアーゼＢＡＬ－３１、またはそれらの断片を含む。いくつかの態様では、異種ヌクレアーゼは、ゲノムフラップを消化するためのエンドヌクレアーゼを含み、エンドヌクレアーゼは、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質とは異なる。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質は、少なくとも１つの追加の機能ドメインを含む。いくつかの態様では、少なくとも１つの追加の機能ドメインは、クロマチン修飾ドメインを含む。いくつかの態様では、少なくとも１つの追加の機能ドメインは、細胞透過性ペプチドを含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのガイド核酸は、少なくとも１つの核酸修飾を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つの核酸修飾は、骨格、糖、塩基、またはそれらの組み合わせに対する修飾を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質は、少なくとも１つのガイド核酸と複合体化している。いくつかの態様では、少なくとも１つのガイド核酸は、組み込み核酸と複合体化している。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質、少なくとも１つのガイド核酸、少なくとも１つの少なくとも１つのＤＮＡリガーゼ、組み込み核酸、またはそれらの組み合わせは、ポリヌクレオチドによってコードされる。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、ｍＲＮＡを含む。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、ベクターを含む。いくつかの態様では、ベクターは、ウイルスベクターを含む。いくつかの態様では、少なくとも１つのＤＮＡ結合タンパク質、少なくとも１つのガイド核酸、少なくとも１つの少なくとも１つのＤＮＡリガーゼ、組み込み核酸、またはそれらの組み合わせは、少なくとも１つの脂質ナノ粒子によって封入される。いくつかの態様では、細胞は、細菌細胞、真核生物細胞、または植物細胞を含む。いくつかの態様では、真核生物細胞は、哺乳動物細胞を含む。いくつかの態様は、システムを含む組成物を含む。いくつかの態様は、システムを含む細胞を含む。いくつかの態様は、細胞を含む細胞株を含む。いくつかの態様は、システムを含む薬学的組成物を含む。いくつかの態様は、組成物を含む薬学的組成物を含む。いくつかの態様は、細胞を含む薬学的組成物を含む。いくつかの態様は、薬学的に許容される賦形剤、担体、または希釈剤を含む。いくつかの態様では、薬学的組成物は、髄腔内、眼内、硝子体内、網膜、静脈内、筋肉内、脳室内、大脳内、小脳内、側脳室内、脳実質内、皮下、腫瘍内、肺内、気管内、腹腔内、膀胱内、膣内、直腸内、経口、舌下、経皮、吸入による、吸入された噴霧形態による、管腔内ＧＩ経路による、またはそれらの組み合わせによって、それを必要とする対象に投与するために製剤化される。いくつかの態様は、システム、組成物、または薬学的組成物と、容器と、を含むキットを含む。いくつかの態様では、細胞をシステムと接触させることを含む、細胞を修飾するための方法を含む。いくつかの態様では、細胞を組成物と接触させることを含む、細胞を修飾するための方法を含む。いくつかの態様では、細胞を薬学的組成物と接触させることを含む、細胞を修飾するための方法を含む。いくつかの態様では、細胞は、分裂細胞ではない。いくつかの態様では、組み込み核酸は、内因性非相同末端結合（ＮＨＥＪ）とは無関係であり、内因性相同指向性修復（ＨＤＲ）とは無関係である細胞のゲノム遺伝子座に挿入される。いくつかの態様は、疾患または状態の治療を必要とする対象においてそれを行うための方法を含み、細胞または対象をシステム、組成物、または薬学的組成物と接触させることと、細胞内のゲノム遺伝子座を組み込み核酸で置き換え、それによって対象における疾患または状態を治療することと、を含む。いくつかの態様では、細胞は、分裂細胞ではない。いくつかの態様では、組み込み核酸は、内因性非相同末端結合（ＮＨＥＪ）とは無関係であり、内因性相同指向性修復（ＨＤＲ）とは無関係である細胞のゲノム遺伝子座に挿入される。

【００１５】

本明細書に開示されるのは、いくつかの態様では、細胞中のゲノム遺伝子座に少なくとも部分的に相補的であるスペーサー、ＤＮＡ結合タンパク質と複合体化するための足場、

及び組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的であるドナー結合部位を含むガイド核酸である。ＤＮＡ結合タンパク質は、エンドヌクレアーゼを含み得る。エンドヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含み得る。いくつかの態様では、ガイド核酸は、ゲノム遺伝子座のゲノム配列に少なくとも部分的に相補的なフラップ結合部位を含む。いくつかの態様では、ガイド核酸は、少なくとも１つの核酸修飾を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つの核酸修飾は、骨格、糖、塩基、またはそれらの組み合わせに対する修飾を含む。いくつかの態様では、ガイド核酸は、ＲＮＡ配列を含む。

【図面の簡単な説明】

【００１６】

【図１Ａ】ゲノム遺伝子座におけるガイド核酸、エンドヌクレアーゼ、リガーゼ、及びドナー鎖を示す。

【図１Ｂ】図１Ａから順に続き、ゲノム遺伝子座の片側に組み込まれたドナー鎖を示し、ドナー鎖は、ゲノムフラップを移動させている。

【図１Ｃ】図１Ｂから順に続き、ゲノム遺伝子座の片側に組み込まれたドナー鎖、及びゲノムフラップが除去されたところに現れるニックを示す。

【図２Ａ】ゲノム遺伝子座における２つのガイド核酸、２つのエンドヌクレアーゼ、２つのリガーゼ、及びドナー鎖を示す。

【図２Ｂ】図２Ａから順に続き、ゲノム遺伝子座に組み込まれたドナー鎖を示し、ドナー鎖は、２つのゲノムフラップを移動させている。

【図２Ｃ】図２Ｂから順に続き、ゲノム遺伝子座に組み込まれたドナー鎖、及びゲノムフラップが除去されたところに現れる２つのニックを示す。

【図３Ａ】ゲノム遺伝子座におけるガイド核酸、エンドヌクレアーゼ、リガーゼ、及びドナー鎖を示す。

【図３Ｂ】図３Ａから順に続き、ゲノム遺伝子座の片側に組み込まれたドナー鎖を示し、ドナー鎖は、ゲノムフラップを移動させている。

【図３Ｃ】図３Ｂから順に続き、ゲノム遺伝子座の片側に組み込まれたドナー鎖、及びゲノムフラップが除去されたところに現れるニックを示す。

【図４Ａ】ゲノム遺伝子座における２つのガイド核酸、２つのエンドヌクレアーゼ、２つのリガーゼ、及びドナー鎖を示す。

【図４Ｂ】図４Ａから順に続き、ゲノム遺伝子座に組み込まれたドナー鎖を示し、ドナー鎖は、２つのゲノムフラップを移動させている。

【図４Ｃ】図４Ｂから順に続き、ゲノム遺伝子座に組み込まれたドナー鎖、及びゲノムフラップが除去されたところに現れる２つのニックを示す。

【図５Ａ】ゲノム遺伝子座におけるガイド核酸、エンドヌクレアーゼ、リガーゼ、及びドナー鎖を示す。

【図５Ｂ】図５Ａから順に続き、ゲノム遺伝子座に組み込まれたドナー鎖を示し、ドナー鎖は、ゲノムフラップを移動させている。

【図５Ｃ】図５Ｂから順に続き、ゲノム遺伝子座の片側に組み込まれたドナー鎖、及びゲノムフラップが除去されたところに現れるニックを示す。

【図６Ａ】ゲノム遺伝子座における２つのガイド核酸、２つのエンドヌクレアーゼ、２つのリガーゼ、及びドナー鎖を示す。

【図６Ｂ】図６Ａから順に続き、ゲノム遺伝子座に組み込まれたドナー鎖を示し、ドナー鎖は、２つのゲノムフラップを移動させている。

【図６Ｃ】図６Ｂから順に続き、ゲノム遺伝子座に組み込まれたドナー鎖、及びゲノムフラップが除去されたところに現れる２つのニックを示す。

【図７】融合タンパク質配列の一部の例を示す。

【図８Ａ】組み込み核酸の例示的なニッキング及びライゲーションパターンを示す。

【図８Ｂ】３０ｎｔのＧＢＳ／ＤＢＳ及び熱安定性Ｔ４リガーゼを使用してインビトロで行われた、片側リプレーサー２に関連付けられたパターンを示すＤＮＡゲルを示す。３０ｎｔ　ＧＢＳ／ＤＢＳの組み合わせ、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）変異を含

有するドナー、及び熱安定性Ｔ４リガーゼ（Ｈｉ－Ｔ４、ＮＥＢ）を使用して、我々の対照生成物（レーン１）のサイズに対応する最終リプレーサー生成物（レーン３）を生成することができた。ニッキングＣａｓ９（Ｃａｓ９ｎ）（レーン２）の不在下、またはスプリントとして機能する底部ドナーの不在下（レーン４及び５）では、リプレーサー生成物は検出されなかった。

【図８Ｃ】可変長ＧＢＳ／ＤＢＳの組み合わせ及びＴ４リガーゼを使用したインビトロ片側リプレーサー２に関連付けられたパターンを示す例示的な核酸ゲルを示す。通常のＴ４リガーゼ（ＮＥＢ）を使用して、ＧＢＳ／ＤＢＳなし、２０ｎｔ　ＧＢＳ／ＤＢＳ、及び３０ｎｔ　ＧＢＳ／ＤＢＳを含む複数のＧＢＳ／ＤＢＳの組み合わせを使用した場合、対照のサイズに対応する最終リプレーサー生成物を生成することとした。更に、この実験では、ＰＡＭ変異を含有する再コードされたｄｓＤＮＡドナーは、再コードされなかったＰＡＭ変異体ｄｓＤＮＡドナーと比較して、最終リプレーサー生成物の生成においてより効率的であった。

【図９】緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現する細胞のパーセンテージの測定を示し、ニッキングＣａｓ９及びＤＮＡリガーゼを有する片側リプレーサー２によるＢＦＰからＧＦＰへの遺伝子編集を示す。

【図１０】ニッキングＣａｓ９及びＴ４　ＤＮＡリガーゼを有する片側リプレーサー２を介して、目的の増幅子にマージ及びアラインメントされた配列決定リード、ならびに意図された編集に一致した総リードのパーセンテージを示す。

【図１１】ニッキングＣａｓ９及びＴ４　ＤＮＡリガーゼを有する両側リプレーサー２を介して、目的の増幅子にマージ及びアラインメントされた配列決定リード、ならびに意図された編集に一致した総リードのパーセンテージを示す。

【図１２】緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現する細胞のパーセンテージの測定を示し、ニッキングＣａｓ９及びＴ４　ＤＮＡリガーゼを有する片側リプレーサー２を介したＢＦＰからＧＦＰへの遺伝子編集を示す。

【発明を実施するための形態】

【００１７】

序文

遺伝子編集ツールの最近の進歩は、治療目的、農業目的、工業目的、及び研究目的のためのゲノムの精密編集を可能にした。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９などのいくつかのヌクレアーゼベースのツールは、ガイドＲＮＡを使用して、Ｃａｓ９タンパク質を、ガイドＲＮＡ内のスペーサー配列によって特定される特異的ＤＮＡ配列に標的化する。次いで、Ｃａｓ９ヌクレアーゼ活性がＤＮＡを切断し、二本鎖切断（ＤＳＢ）をもたらす。ＤＳＢは、典型的には、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同性指向性修復（ＨＤＲ）を含む内因性ＤＮＡ修復機構を介して修復される。しかしながら、ＮＨＥＪは、ヌクレオチド挿入及び欠失（インデル）のスペクトルをもたらし、それは、精密編集に対するその有用性を妨げる。ＨＤＲ効率は、非分裂細胞において非常に低く、ＤＮＡ複製を必要とする場合がある。ＨＤＲ編集が検出可能であっても、ＤＳＢ誘導型インデルが普及することが多く、これは、精密編集が望まれるときにＨＤＲが実現可能ではない場合があることを意味する。

【００１８】

相同性非依存性標的挿入（ＨＩＴＩ）は、一次ニューロン、網膜色素上皮細胞、及びＨＳＰＣなどの非分裂細胞におけるＣＲＩＳＰＲ誘導型導入遺伝子組み込みのために、非分裂細胞において活性なＮＨＥＪ　ＤＮＡ修復機構を利用する。しかしながら、Ｃａｓ９からのＤＳＢの生成に起因して、ＨＩＴＩは、高周波数のインデルを生成し、ＤＳＢに関連する毒性に加えて意図しない変異をもたらす。

【００１９】

遺伝子編集のための他の方法は、更なる制限を有する。ヌクレオチドデアミナーゼとのニッキングＣａｓヌクレアーゼの融合（例えば、塩基エディター）を用いるツールは、ある特定のヌクレオチド変異を行うことができ、例えば、シトシン塩基エディターは、ＣをＴに変換することができる。いくつかの塩基エディターは、高効率で精密編集を行うこと

ができるが、それらは、本質的に、デアミナーゼバリアントによって決定される特定の編集に限定されるため、それらは、特定の置換変異にのみ適用され、更に、正確な挿入または欠失編集を行うことができない。更に、ベースエディターは、概して、プロトスペーサー領域のサブセット内の小さな編集ウィンドウに限定され、したがって、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の可用性によって著しく制限される。最後に、塩基エディターは、編集領域内にバイスタンダー変異を示すことができ（例えば、２つのＣが存在する場合）、ＤＮＡ及びＲＮＡオフターゲットデアミナーゼ活性を実証している。

【００２０】

既存の精密編集技術には、様々な方法で実用性を妨げる限界がある。特に、それらは、編集のために内因性細胞機構、例えば、ヌクレアーゼベースの編集のためのＨＤＲ機構、及び塩基編集のためのミスマッチ修復に依存し得る。全ての内因性因子から独立したシステムは報告されていない。異なる細胞型がこれらの内因性因子の異なる活性レベルを有し、多くの場合、活性が有用なレベルの編集を提供するのに十分でないため、内因性因子への依存は問題がある。この依存が特に問題となる例は、成人における細胞の大部分を構成する非分裂細胞であり、したがって、多くの既存の精密編集ツールには対応できない。

【００２１】

したがって、効果的な遺伝子編集のための、または遺伝子編集によって遺伝子発現を修飾するためのシステムまたは方法の必要性が依然として存在する。特に、遺伝子編集または遺伝子発現の修飾のためのシステムまたは方法の必要性が残っており、システムまたは方法は、細胞の内因性構成要素または機構に依存していない。細胞内の遺伝子変異を修正するためのシステムまたは方法の必要性も依然として存在する。場合によっては、遺伝子変異の修正は、疾患または状態の治療を必要とする対象においてそれを行うことができる。以下に見られるように、本明細書に開示されるシステム、方法、及び組成物は、これらのニーズまたは制限に対処するために有用であり得る。

【００２２】

概要

本明細書に記載されるのは、自己完結型遺伝子編集システムである。いくつかのそのような自己完結型システムでは、遺伝子編集のあらゆる態様を制御してもよい。いくつかのそのようなシステムは、編集機能を行う、またはゲノム遺伝子座などの標的核酸の任意の態様を置き換えるまたは修復するために宿主細胞機構に依存しない。そのようなシステムの中には、ポリメラーゼを使用せずに編集を行ってもよいため、細胞のヌクレオチド三リン酸（ｄＮＴＰ）濃度の影響を受けないものもある。例えば、組み込み核酸は、テンプレートを転写することなく送達され、遺伝子座に挿入されてもよい。編集は、ＨＤＲまたはＮＨＥＪなどの細胞修復システムに依存する必要性を排除し得る。編集は、細胞サイクリングなしで行われてもよい。遺伝子編集は、細胞内で行われ得るか、またはインビトロで行われ得る。例えば、遺伝子編集は、試験管内または細胞の外側で行われてもよい。

【００２３】

本明細書に記載されるのは、ＣＲＩＳＰＲ誘導型ＤＮＡリガーゼ及び目的のゲノム領域を標的とするガイド核酸を使用して、ゲノムに二本鎖切断を生成することなく、ドナー鎖でＤＮＡを編集するためのシステム及び方法である。ＤＮＡリガーゼは、ホスホジエステル結合を介して２つのＤＮＡ分子を化学的に接合する酵素である。ＤＮＡリガーゼは、ライゲーションされるＤＮＡ配列に逆相補的であるＤＮＡもしくはＲＮＡ骨格または「スプリント」へのＤＮＡ分子のハイブリダイゼーションを必要とし得るか、または必要としなくてもよい。ＣＲＩＳＰＲヌクレアーゼによって生成されたゲノムニックに対するリガーゼの標的化は、任意選択で、ガイド核酸によって標的遺伝子座に動員されるドナー鎖によるゲノムＤＮＡの正確な置き換えを可能にする。ＣＲＩＳＰＲ誘導型ＤＮＡリガーゼは、それぞれ、ペプチドリンカー、ヘテロ二量体化ドメイン、または２つの別個のペプチドを利用することによって、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼに融合、動員されているか、または融合されていないＤＮＡリガーゼから構成され得る。

【００２４】

いくつかの態様は、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ及びＤＮＡリガーゼを含有するか、またはそれらを含む細胞を含み、これらの両方は、細胞に導入される。エンドヌクレアーゼまたはリガーゼは、細胞とは異種であり得る。エンドヌクレアーゼ及びリガーゼは、細胞とは異種であり得る。リガーゼは、細胞に内在性であり得る。いくつかの態様では、細胞は、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ及びＤＮＡリガーゼを含み、これらの両方は、細胞とは異種である。細胞は、本明細書に記載の組成物またはシステムを含み得る。細胞は、本明細書に記載のシステム、組成物、または方法で使用され得るか、または含まれ得る。

【００２５】

本明細書に記載のシステムは、ニッキングＣａｓ９などのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ、及びＲＮＡスプリントを利用することができる異種リガーゼ（例えば、ＤＮＡリガーゼ）を含む異種エンドヌクレアーゼを含んでもよい。ガイド核酸は、任意選択で、ドナー鎖をエンドヌクレアーゼによって標的化された部位（例えば、標的化されたゲノム遺伝子座）に動員し、またニッキングＣａｓ９によって生成されたドナー鎖（ドナー鎖）及びゲノムフラップからわたってスプリントを生成し、ＤＮＡリガーゼによるドナー鎖及びゲノムフラップのライゲーションをもたらす。いくつかの実施形態では、リガーゼは、内因性リガーゼであるか、またはそれを含む。システムは、任意選択で以下の順序で、以下の構成要素を一緒に含むことができる１つ以上のガイド核酸を利用することができる：５’スペーサー－足場－ドナー結合部位（任意選択）－フラップ結合部位３’。ドナー鎖（ドナー鎖）は、以下の配列構成要素を含み得る：５’ガイド結合部位－ドナー鎖３’。ドナー鎖のガイド結合部位は、ドナーがガイドにハイブリダイズし、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼの標的部位に局在するように、ガイド核酸のドナー結合部位に少なくとも部分的に逆相補的である。ドナー配列の５’末端及びヌクレアーゼニッキング活性によって生成されたゲノムフラップの３’末端は、ＤＮＡリガーゼによってライゲーションされ、ドナー結合部位及びガイド核酸（複数可）のフラップ結合部位によってスプリントされる。

【００２６】

図１Ａ～１Ｃは、システム（片側リプレーサー１）の非限定的な例を示す。実施例は、ゲノム遺伝子座を標的とするためのスペーサーと、本明細書に記載のエンドヌクレアーゼを複合体化し、動員するための足場と、ドナー鎖と複合体化するためのドナー結合部位と、ゲノム遺伝子座のゲノムフラップと複合体化するためのフラップ結合部位と、を含むガイド核酸を含む。ガイド核酸は、リガーゼに作動可能にカップリングされたエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９ニッカーゼ、ｎＣａｓ９）と複合体化されていることが示されている。ガイド核酸は、エンドヌクレアーゼを、ガイド核酸のスペーサーによって結合されるゲノム遺伝子座に指向することができる。ガイド核酸はまた、ドナー鎖に部分的に相補的であることが示されている（ガイド核酸のドナー結合部位とドナー鎖のガイド結合部位との間で複合体化する）。エンドヌクレアーゼは、ガイド核酸によって指向されると、ゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断またはニックすることができ、リガーゼは、ドナー鎖の一端をゲノム遺伝子座の切断またはニック末端とライゲーションすることができ、したがって、ドナー鎖をゲノム遺伝子座に組み込む。ゲノム遺伝子座へのドナー鎖の組み込みは、ヌクレアーゼによって消化及び除去され得るゲノムフラップを生成し得る。

【００２７】

図２Ａ～２Ｃは、システム（両側リプレーサー１）の非限定的な例を示す。図１Ａのガイド核酸と同様に、実施例のガイド核酸は、ゲノム遺伝子座を標的とするためのスペーサーと、本明細書に記載のエンドヌクレアーゼを複合体化し、動員するための足場と、ドナー鎖と複合体化するためのドナー結合部位と、ゲノム遺伝子座のゲノムフラップと複合体化するためのフラップ結合部位とを含む。図２Ａにおいて、第１のガイド核酸は、第１のリガーゼと作動可能にカップリングされた第１のエンドヌクレアーゼと複合体化され、第２のガイド核酸は、第２のリガーゼと作動可能にカップリングされた第２のエンドヌクレアーゼと複合体化されることが示される。第１のエンドヌクレアーゼ及び第２のヌクレアーゼは各々、ゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断し得る。ゲノム遺伝子座の２つ

の切断された末端をドナー鎖の２つの末端にライゲーションし、それによってドナー鎖をゲノム遺伝子座に組み込むことができる。ゲノム遺伝子座でのドナー鎖の挿入は、ヌクレアーゼによって消化及び除去することができる２つのゲノムフラップを生成し得る。

【００２８】

図３Ａ～３Ｃは、システムの非限定的な例（片側リプレーサー２）を示す。実施例では、ガイド核酸は、ゲノム遺伝子座を標的とするためのスペーサーと、本明細書に記載のエンドヌクレアーゼを複合体化し、動員するための足場と、ドナー鎖と複合体化するためのドナー結合部位とを含む。また図３Ａには、少なくとも１つのオーバーハングを含むドナー鎖が示され、オーバーハングは、ゲノム遺伝子座のゲノムフラップと複合体化するためのフラップ結合部位と、（ガイド核酸のドナー結合部位を介して）ガイド核酸と複合体化するためのガイド結合部位と、を含む。ガイド核酸は、リガーゼに作動可能にカップリングされたエンドヌクレアーゼ（例えば、ｎＣａｓ９）と複合体化され得る。実施例におけるガイド核酸は、エンドヌクレアーゼ及びリガーゼを、ガイド核酸のスペーサーによって結合されるゲノム遺伝子座に指向する。実施例のガイド核酸はまた、ドナー鎖に部分的に相補的である（ガイド核酸のドナー結合部位とドナー鎖のガイド結合部位との間で複合体化する）。エンドヌクレアーゼは、ガイド核酸によって指向されると、ゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断することができ、リガーゼは、ドナー鎖の一端をゲノム遺伝子座の切断末端とライゲーションすることができ、したがって、ドナー鎖をゲノム遺伝子座に組み込む。ゲノム遺伝子座へのドナー鎖の組み込みは、ヌクレアーゼによって消化及び除去され得るゲノムフラップを生成し得る。

【００２９】

図４Ａ～４Ｃは、システム（両側リプレーサー２）の非限定的な例を示す。実施例では、図３Ａのガイド核酸と同様に、ガイド核酸は、ゲノム遺伝子座を標的とするためのスペーサーと、本明細書に記載のエンドヌクレアーゼを複合体化及び動員するための足場と、ドナー鎖と複合体化するためのドナー結合部位とを含む。また図４Ａに示されるのは、２つのオーバーハングを含むドナー鎖が示され、オーバーハングは各々、ゲノム遺伝子座のゲノムフラップと複合体化するためのフラップ結合部位と、（ガイド核酸のドナー結合部位を介して）ガイド核酸と複合体化するためのガイド結合部位と、を含む。ドナー鎖のフラップ結合部位は、エンドヌクレアーゼがゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断した後にゲノムフラップが生成された後、ドナー鎖をゲノム遺伝子座に近接させることができる。図４Ａにおいて、第１のガイド核酸は、第１のリガーゼと作動可能にカップリングされた第１のエンドヌクレアーゼと複合体化され、第２のガイド核酸は、第２のリガーゼと作動可能にカップリングされた第２のエンドヌクレアーゼと複合体化されることが示される。この例では、第１のエンドヌクレアーゼ及び第２のヌクレアーゼは各々、ゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断し得る。ゲノム遺伝子座の２つの切断された末端をドナー鎖の２つの末端にライゲーションし、それによってドナー鎖をゲノム遺伝子座に組み込むことができる。この例では、ゲノム遺伝子座でのドナー鎖の挿入は、ヌクレアーゼによって消化及び除去することができる２つのゲノムフラップを生成し得る。

【００３０】

本明細書に記載のシステム（リプレーサー３）は、ニッキングＣａｓ９などのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ、及びＤＮＡスプリントを利用することができるリガーゼ（例えば、ＤＮＡリガーゼ）を含む異種エンドヌクレアーゼを含んでもよい。ガイド核酸は、任意選択で、ドナー鎖をエンドヌクレアーゼによって標的化された部位（例えば、標的化されたゲノム遺伝子座）に動員し、またニッキングＣａｓ９によって生成されたドナー鎖（ドナー鎖）及びゲノムフラップからわたってスプリントを生成し、ＤＮＡリガーゼによるドナー鎖及びゲノムフラップのライゲーションをもたらす。ガイド核酸上のフラップ結合部位及びドナー結合部位の少なくとも一部は、ＤＮＡスプリントを利用するリガーゼが、意図される反応を触媒することができるようなＤＮＡである。システムは、任意選択で以下の順序で、以下の構成要素を一緒に含むことができる１つ以上のガイド核酸を利用することができる：５’スペーサー－足場－ドナー結合部位（任意選択）－フラップ結合部位

３’。ドナー鎖（ドナー鎖）は、以下の配列構成要素を含み得る：５’ガイド結合部位－ドナー鎖３’。ドナー鎖のガイド結合部位は、ドナーがガイドにハイブリダイズし、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼの標的部位に局在するように、ガイド核酸のドナー結合部位に少なくとも部分的に逆相補的である。ドナー配列の５’末端及びヌクレアーゼニッキング活性によって生成されたゲノムフラップの３’末端は、ＤＮＡリガーゼによってライゲーションされ、ドナー結合部位及びガイド核酸（複数可）のフラップ結合部位によってスプリントされる。

【００３１】

図５Ａ～５Ｃは、システムの非限定的な例（片側リプレーサー３）を示す。実施例は、ゲノム遺伝子座を標的とするためのスペーサーと、本明細書に記載のエンドヌクレアーゼを複合体化し、動員するための足場と、ドナー鎖と複合体化するためのドナー結合部位と、ゲノム遺伝子座のゲノムフラップと複合体化するためのフラップ結合部位と、を含むガイド核酸を含み、フラップ結合部位及びドナー結合部位の少なくとも一部は、ＤＮＡで構成される。ガイド核酸は、リガーゼ（例えば、内因性リガーゼまたは外因性リガーゼ）に作動可能にカップリングされたエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９ニッカーゼ、ｎＣａｓ９）と複合体化されていることが示されている。ガイド核酸は、エンドヌクレアーゼを、ガイド核酸のスペーサーによって結合されるゲノム遺伝子座に指向することができる。ガイド核酸はまた、ドナー鎖に部分的に相補的であることが示されている（ガイド核酸のドナー結合部位とドナー鎖のガイド結合部位との間で複合体化する）。エンドヌクレアーゼは、ガイド核酸によって指向されると、ゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断することができ、リガーゼは、ドナー鎖の一端をゲノム遺伝子座の切断末端とライゲーションすることができ、したがって、ドナー鎖をゲノム遺伝子座に組み込む。ゲノム遺伝子座へのドナー鎖の組み込みは、ヌクレアーゼによって消化及び除去され得るゲノムフラップを生成し得る。

【００３２】

図６Ａ～６Ｃは、システム（両側リプレーサー３）の非限定的な例を示す。この例におけるガイド核酸は、図５Ａのガイド核酸と同様に、ゲノム遺伝子座を標的とするためのスペーサーと、本明細書に記載のエンドヌクレアーゼを複合体化し、動員するための足場と、ドナー鎖と複合体化するためのドナー結合部位と、ゲノム遺伝子座のゲノムフラップと複合体化するためのフラップ結合部位と、を含むガイド核酸を含み、フラップ結合部位及びドナー結合部位の少なくとも一部は、ＤＮＡで構成される。図６Ａにおいて、第１のガイド核酸は、第１のリガーゼと作動可能にカップリングされた第１のエンドヌクレアーゼと複合体化され、第２のガイド核酸は、第２のリガーゼと作動可能にカップリングされた第２のエンドヌクレアーゼと複合体化されることが示される。第１のエンドヌクレアーゼ及び第２のヌクレアーゼは各々、ゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断し得る。ゲノム遺伝子座の２つの切断された末端をドナー鎖の２つの末端にライゲーションし、それによってドナー鎖をゲノム遺伝子座に組み込むことができる。ゲノム遺伝子座でのドナー鎖の挿入は、ヌクレアーゼによって消化及び除去することができる２つのゲノムフラップを生成し得る。

【００３３】

ライゲーションは、クロレラウイルス由来のＰＢＣＶ－１　ＤＮＡリガーゼとしても知られるＳｐｌｉｎｔＲリガーゼなどのＲＮＡスプリントを利用することができるＤＮＡリガーゼを使用して行ってもよい。いくつかの態様では、システムは、ＣＲＩＳＰＲ誘導型リガーゼを、目的のゲノム領域に隣接する反対側の鎖上の標的部位に標的化する２つのガイド核酸を利用する。いくつかの態様では、各ガイド核酸は、上記の態様で対応するドナー鎖と相互作用し、ドナー鎖領域内で互いに逆相補的である両方のドナー鎖のライゲーションをもたらす。

【００３４】

エンドヌクレアーゼに融合もしくは動員されるか、またはトランスで供給されるリガーゼは、ＤＮＡをスプリントとして利用することができ、ドナー鎖は、エンドヌクレアーゼ

及び別のドナー鎖によって生成されるゲノムフラップのスプリントとして機能する。いくつかの態様では、ドナー鎖は、５’ドナー鎖－フラップ結合部位－ガイド結合部位（任意選択）３’を含む。１つのドナー鎖（ドナー２）上のフラップ結合部位は、ゲノムフラップに逆相補的であり得るが、ドナー２上の任意選択のガイド結合部位は、ガイド核酸（ガイド１）の任意選択のドナー結合部位に逆相補的であり、ドナー鎖は、異なるドナー鎖（ドナー１）に少なくとも部分的に逆相補的であり得る。このドナー１の５’末端及びゲノムフラップの３’末端は、スプリントとしてドナー２のフラップ結合部位及びドナー鎖を使用してライゲーションすることができる。異なるスペーサー配列を有する二重ガイド核酸を利用するそのような両側アプローチは、ドナー２で採用することができ、これは第１のゲノム部位でスプリントを提供し、第２の部位を標的とするスペーサー配列を有する第２のリプレーサー２ガイド核酸（ガイド２）を使用して作製されたニックで、その５’末端上で異なるゲノムフラップの３’末端にライゲーションすることができる。第２のガイド核酸システム上のドナー結合部位は、任意選択で、その任意選択のガイド結合部位とのハイブリダイゼーションを介してドナー１を動員することができ、ドナー１は、ドナー２を第２のガイド核酸の標的部位におけるゲノムフラップの３’末端にライゲーションするためのＤＮＡスプリントとして機能する。

【００３５】

ライゲーション後、天然ゲノムＤＮＡの残りのフラップは、外因性送達または内因性フラップエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼを介して切除することができる。細胞に導入することができる外因性ヌクレアーゼの例としては、ヒトフラップエンドヌクレアーゼ１（ｈＦＥＮ１）、ヒトエキソヌクレアーゼ５（ｈＥＸＯ５）、Ｔ５エキソヌクレアーゼ、Ｔ７エキソヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼＶＩＩＩ、Ｅ．ｃｏｌｉ ＰｏｌＩのフラップエンドヌクレアーゼドメイン、ＲｅｃＪＦ、ラムダエキソヌクレアーゼ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ由来のＸｎｉ（ＥｘｏＩＸＩ）、ＳａＦＥＮ（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ ＦＥＮ）、ヌクレアーゼＢＡＬ－３１、またはそれらの断片が挙げられる。エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼは、それぞれ、ペプチドリンカー、ヘテロ二量体化ドメイン、または２つの別個のペプチドを利用することによって、任意選択的に、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼまたはＤＮＡリガーゼに融合、動員され得るか、または融合されない場合がある。

【００３６】

いくつかの態様では、本明細書に記載のシステム、組成物、または方法は、切断部位またはニック部位に結合する追加のタンパク質を利用する。例えば、本明細書に記載のシステム、組成物、または方法は、バクテリオファージＭｕ由来のＫｕタンパク質またはＧａｍタンパク質を含むことができ、ＫｕタンパクまたはＧａｍタンパク質の結合は、切断部位またはニック部位における組み込み核酸のライゲーション効率を増加させることができる。

【００３７】

本明細書に記載のシステムまたは方法は、ニッキングエンドヌクレアーゼを使用してもよく、したがって、二本鎖切断を生成しない。更に、本明細書に記載のシステムは、ｍＲＮＡ、ウイルスベクター、ガイド核酸、ＤＮＡ、もしくはペプチド、または任意の他のモダリティを使用して細胞に送達される外因性構成要素にのみ依存する作用機序を通じて、非分裂細胞における編集効率の低下の問題に対処する。したがって、システムは、ＨＤＲまたはｄＮＴＰＳなどの細胞周期依存性内因性細胞プロセスまたは構成要素の存在を必要としない。したがって、本明細書に記載のシステムは、非分裂細胞において妨げられない効率を可能にする。更に、このシステムは、ゲノムの標的領域の両方の鎖の置き換えを可能にし、編集効率を高めることができる。

【００３８】

ドナー鎖は、置き換えられたゲノムＤＮＡとの高度の相同性を含み得る。これらのドナーは、病原性変異修正、ＣＲＩＳＰＲプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）部位の無効化、ガイドのスペーサー配列の破壊、他の置換変異、またはそれらの組み合わせなどの

ゲノムＤＮＡへの変異を含み得る。追加の置換変異が、ドナー鎖のハイブリダイゼーション及びゲノムへの組み込みを促進するために、ドナー－ドナー相同性対ドナー－ゲノム相同性を増加させるために含まれ得る。ドナー鎖はまた、ヌクレオチドの欠失または挿入をコードしてもよく、または標的ゲノムＤＮＡを置き換える上記の複合体の組み合わせをコードしてもよい。任意選択で、ガイド鎖及びドナー鎖は、ホスホロチオエート結合または２’－Ｏ－メチル化などの核酸化学を使用して化学的に修飾され得る。任意選択で、ガイド核酸は、ヘアピン配列を含み得る。任意選択で、ガイド核酸、ドナー鎖、及びタンパク質の任意の組み合わせは、例えば、編集構成要素を細胞に送達する前に、アニーリング反応（漸進的な温度低下）を使用して複合体化され得る。

【００３９】

タンパク質成分（例えば、ニッキングＣａｓ９、リガーゼ）は、ゲノム標的への送達効率を改善するために、核局在化シグナル、細胞透過性ペプチド、またはクロマチン破壊性ペプチドを使用して修飾され得る。

【００４０】

ゲノムＤＮＡ鎖間の小さな（１３ｎｔ未満）ミスマッチを解決するための優勢な細胞ＤＮＡ修復経路は、ミスマッチ修復（ＭＭＲ）である。一本鎖ドナーライゲーションの場合、ライゲーションされたドナー鎖は、逆相補的ゲノムＤＮＡ鎖とＤＮＡヘテロ二本鎖を形成する。これはまた、ライゲーションされたドナー鎖とゲノムＤＮＡ鎖との間の競合ハイブリダイゼーションで生じ得る。これらの場合において、ＭＭＲ活性は、ゲノム鎖をテンプレートとして使用して、ドナー鎖内のミスマッチを切除及び復元することができ、結果的に編集が低減する。ＭＭＲタンパク質の優性陰性バージョンの発現は、同様のＤＮＡヘテロ二重鎖が生成される場合に、ＭＭＲ経路を阻害し、編集結果を改善することが示されている。いくつかの態様では、ＭＳＨ２（Ｇ６７４Ａ）及びＭＬＨ１（ｄｅｌ７５４－７５６）などの優性陰性ＭＭＲペプチドは、特にＭＭＲ経路を過剰発現する細胞において、ゲノム編集能力を改善するために本明細書に記載のシステムの一部として送達されてもよい。いくつかの態様では、これらの優性陰性ＭＭＲペプチドは、融合物として（例えば、本明細書に記載されるシステムの任意の構成要素と融合されて）送達され得るか、動員され得るか、または別個のペプチドとして送達され得る。

【００４１】

エンドヌクレアーゼ

本明細書に開示されるのは、エンドヌクレアーゼである。エンドヌクレアーゼは、本明細書に開示される組成物、システムまたは方法に含まれ得る。エンドヌクレアーゼは、組換えであり得る。エンドヌクレアーゼは、リガーゼに連結され得る。エンドヌクレアーゼは、リガーゼに直接的または間接的にカップリングされ得る。カップリングは、共有結合であり得るか、または非共有結合であり得る。エンドヌクレアーゼは、リガーゼに結合または接続され得る。エンドヌクレアーゼは、リガーゼに動員されてもよく、融合タンパク質の一部であり得るか、またはリガーゼと併せて使用されてもよい。エンドヌクレアーゼは、異種であり得る。異種は、細胞なしからの供給源を示し得る。異種エンドヌクレアーゼが記載されている場合、非異種（例えば、内因性）エンドヌクレアーゼがいくつかの例で使用され得る。エンドヌクレアーゼは、細胞内でコードされ得る。エンドヌクレアーゼは、トランスで細胞に送達され得る。エンドヌクレアーゼは、組み込み核酸内のリン酸結合の切断を触媒し得る。エンドヌクレアーゼは、切断部位またはニック部位での組み込み核酸のライゲーションのために標的核酸を切断またはニックするためにガイド核酸によって誘導され得る。エンドヌクレアーゼは、図１Ａ～６Ｃに含まれる任意の態様を含み得る。

【００４２】

エンドヌクレアーゼは、非天然に存在し得る。エンドヌクレアーゼは、操作され得る。エンドヌクレアーゼは、合成であり得る。エンドヌクレアーゼは、予備合成され得る。エンドヌクレアーゼは、対象または細胞に付加され得る。エンドヌクレアーゼは、核酸によってコードされ得る。コード核酸は、操作され得るか、合成され得るか、または対象もし

くは細胞に付加され得る。

【００４３】

エンドヌクレアーゼの少なくとも一部は、第１のポリペプチドに含まれ得る。エンドヌクレアーゼの少なくとも一部は、第２のポリペプチドに含まれ得る。エンドヌクレアーゼは、一緒に結合された２つ以上のポリペプチドに分割され得る。第１のポリペプチドは、エンドヌクレアーゼのＮ末端部分を含み得る。第１のポリペプチドは、エンドヌクレアーゼのＣ末端部分を含み得る。第２のポリペプチドは、エンドヌクレアーゼのＮ末端部分を含み得る。第２のポリペプチドは、エンドヌクレアーゼのＣ末端部分を含み得る。エンドヌクレアーゼの一部を含む第１または第２のポリペプチドは、リガーゼの少なくとも一部または全体と融合させることができる。

【００４４】

本明細書に記載されるのは、いくつかの態様では、少なくとも１つのエンドヌクレアーゼを含むシステムである。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、プログラム可能なエンドヌクレアーゼであり、ここでエンドヌクレアーゼは、本明細書に記載のガイド核酸と複合体化され、それによってゲノム遺伝子座に誘導され得る。エンドヌクレアーゼは、ＤＮＡに結合し得る。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼである。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、一本鎖切断を導入することができる。ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼの例としては、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼ（例えば、クラス２　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼ、例えば、ＩＩ型、Ｖ型、またはＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼ）を挙げることができる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼはまた、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクターポリペプチドとも呼ばれる。好適なエンドヌクレアーゼは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼ（例えば、クラス２　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼ、例えば、ＩＩ型、Ｖ型、またはＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼ）である。場合によっては、好適なＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは、クラス２　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。場合によっては、好適なＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは、クラス２　ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９タンパク質）である。場合によっては、エンドヌクレアーゼは、クラス２型ＶＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃｐｆ１タンパク質、Ｃ２ｃ１タンパク質、またはＣ２ｃ３タンパク質）を含む。場合によっては、好適なＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは、クラス２　ＶＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃ２ｃ２タンパク質、「Ｃａｓ１３ａ」タンパク質とも称される）である。また、使用に適しているのは、ＣａｓＸタンパク質である。また、使用に適しているのは、ＣａｓＹタンパク質である。場合によっては、エンドヌクレアーゼは、ガイド核酸（例えば、ｇＲＮＡ）と複合体化した本明細書に記載のＣａｓのうちのいずれか１つをＲＮＰ複合体として含むことができる。

【００４５】

場合によっては、エンドヌクレアーゼは、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼである。場合によっては、エンドヌクレアーゼは、Ｃａｓ９である。Ｃａｓ９は、一緒に二本鎖ＤＮＡ切断（ＤＳＢ）を生成するか、または個々に一本鎖ＤＮＡ切断（ＳＳＢ）を生成することができるＣａｓ９内の２つのヌクレアーゼ活性部位を含む機構による標的認識及び切断のために、ｃｒＲＮＡ及びトランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を有する二重ガイドＲＮＡを使用するＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼとして機能する。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲエンドヌクレアーゼＣａｓ９及び操作された二重（ｄｇＲＮＡ）または単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）は、所望のＤＮＡ配列を標的とすることができるリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を形成する。二重ＲＮＡ複合体またはキメラ単一ガイドＲＮＡによってガイドされて、Ｃａｓ９は、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）標的核酸内に部位特異的ＤＳＢまたはＳＳＢを生成し、これらは、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同性指向性組換え（ＨＤＲ）のいずれかによって修飾される。Ｃａｓ９は、ＲＮＡをガイドするためにＣａｓ９のＲＮＡ結合セグメントとの会合によって標的核酸配列内の標的部

位にガイドされ得る（例えば、標的部位で安定化される）。Ｃａｓ９タンパク質は、（例えば、Ｃａｓ９タンパク質が活性を有する融合パートナーを含む場合）標的核酸及び／または標的核酸と会合したポリペプチド（例えば、ヒストンテイルのメチル化またはアセチル化）に結合する及び／またはそれを修飾すること（例えば、切断、ニック、メチル化、脱メチル化等）ができる。場合によっては、Ｃａｓ９タンパク質は、天然に存在するタンパク質である（例えば、細菌及び／または古細菌細胞に天然に存在する）。他の場合では、Ｃａｓ９タンパク質は、天然に存在するポリペプチドではない（例えば、Ｃａｓ９タンパク質は、バリアントＣａｓ９タンパク質、キメラタンパク質などである）。

【００４６】

天然に存在するＣａｓ９タンパク質は、Ｃａｓ９ガイドＲＮＡに結合し、それによって標的核酸（標的部位）内の特定の配列に向けられ、標的核酸を切断し得る（例えば、ｄｓＤＮＡを切断して二本鎖切断を生成し、ｓｓＤＮＡを切断し、ｓｓＲＮＡを切断する等）。キメラＣａｓ９タンパク質は、異種タンパク質（融合パートナーと称される）に融合したＣａｓ９ポリペプチドを含む融合タンパク質を含み得、異種タンパク質は、活性（例えば、Ｃａｓ９タンパク質によって提供されないもの）を提供する。融合パートナーは、活性、例えば、酵素活性（例えば、ヌクレアーゼ活性、ＤＮＡ及び／またはＲＮＡメチル化の活性、ＤＮＡ及び／またはＲＮＡ切断の活性、ヒストンアセチル化の活性、ヒストンメチル化の活性、ＲＮＡ修飾の活性、ＲＮＡ結合の活性、ＲＮＡスプライシングの活性等）を提供することができる。場合によっては、Ｃａｓ９タンパク質の一部（例えば、ＲｕｖＣドメイン及び／またはＨＮＨドメイン）は、野生型Ｃａｓ９タンパク質の対応する部分と比較してヌクレアーゼ活性の低下を示す（例えば、場合によっては、Ｃａｓ９タンパク質はニッカーゼである）。場合によっては、Ｃａｓ９タンパク質は、酵素的に不活性であるか、または野生型Ｃａｓ９タンパク質と比較して（例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９と比較して）酵素活性が低下している。場合によっては、Ｃａｓ９は、Ｃａｓ９ニッカーゼである。Ｃａｓ９ニッカーゼは、Ｃａｓ９ヌクレアーゼドメインを変異させることによって生成することができる。Ｃａｓ９ニッカーゼの非限定的な例としては、ＳｐＣａｓ９、ＳａＣａｓ９、ＣｊＣａｓ９、ＧｅｏＣａｓ９、ＨｐａＣａｓ９、及びＮｍｅＣａｓ９を挙げることができる。いくつかの態様では、本明細書に記載のエンドヌクレアーゼは、表１のＣａｓ９のうちのいずれか１つを含む。いくつかの態様では、本明細書に記載のエンドヌクレアーゼは、表１のＣａｓ９のうちのいずれか１つのポリペプチド配列と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、またはそれ以上同一であるポリペプチド配列を含む。

【表１－１】

表１．Ｃａｓ９ポリペプチド配列の非限定的な例

名称	Cas9ポリペプチド配列	配列番号
SpyCas9	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDS FFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDS TDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYN QLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADL FLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGT EELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKD NREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVD KGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYV TEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFE DREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQ SGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTT QKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRG KSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK SKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLES EFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLAN GEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQT GGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKV EKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKL PKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKL KGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAY NKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	1

【表１－２】

名称	Cas9ポリペプチド配列	配列番号
ニッキング SpyCas9 (H840A)	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDS FFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDS TDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYN QLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADL FLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGT EELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKD NREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVD KGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYV TEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFE DREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQ SGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTT QKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRG KSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK SKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLES EFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLAN GEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQT GGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKV EKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKL PKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKL KGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAY NKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	2

【表１－３】

名称	Cas9ポリペプチド配列	配列番号
ニッキング SpyCas9 (H840A) R221K N394K	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDS FFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDS TDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYN QLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADL FLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGT EELLVKLKREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKD NREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVD KGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYV TEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFE DREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQ SGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTT QKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRG KSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK SKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLES EFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLAN GEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQT GGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKV EKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKL PKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKL KGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAY NKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	3

【表１－４】

名称	Cas9ポリペプチド配列	配列番号
ニッキング SpyCas9 (D10A)	MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLI GALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDS FFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDS TDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYN QLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADL FLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKAL VRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGT EELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKD NREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVD KGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYV TEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFE DREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQ SGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTT QKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQN GRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRG KSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK SKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLES EFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLAN GEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQT GGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKV EKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKL PKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKL KGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAY NKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	4

【表１－５】

名称	Cas9ポリペプチド配列	配列番号
SauCas9	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRS KRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLS QKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKAL EEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYH QLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCT YFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIEN VFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDI TARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLK GYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKE IPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDA QKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCL YSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKG NRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDIN RFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGF TSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKV MENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRV DKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINK SPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKY SKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFD VYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEF IASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDK RPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG*	5

【表１－６】

名称	Cas9ポリペプチド配列	配列番号
ニッキング SauCas9 (N580A)	MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRS KRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLS QKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKAL EEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYH QLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCT YFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIEN VFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDI TARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLK GYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKE IPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDA QKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCL YSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEEASKKG NRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDIN RFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGF TSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKV MENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRV DKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINK SPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKY SKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFD VYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEF IASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDK RPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG*	6

【表１－７】

名称	Cas9ポリペプチド配列	配列番号
KKH-SaCas9	MGKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGR RSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKG LSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSK ALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAY HQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHC TYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIE NVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIK DITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISN LKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQ KEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGK CLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSK KGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERD INRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSING GFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAK KVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSH RVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLI NKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLT KYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYR FDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQ AEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENM NDKRPPHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKK	7

【表１－８】

名称	Cas9ポリペプチド配列	配列番号
ニッキング KKH-SaCas9(N580A)	MGKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGR RSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKG LSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSK ALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAY HQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHC TYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIE NVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIK DITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISN LKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQ KEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSK DAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGK CLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEEASK KGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERD INRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSING GFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAK KVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSH RVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLI NKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLT KYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYR FDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQ AEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENM NDKRPPHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKK	8

【表１－９】

名称	Cas9ポリペプチド配列	配列番号
CjCas9	MARILAFDIGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGESLALPRR LARSARKRLARRKARLNHLKHLIANEFKLNYEDYQSFDESLAKAYKG SLISPYELRFRALNELLSKQDFARVILHIAKRRGYDDIKNSDDKEKGAI LKAIKQNEEKLANYQSVGEYLYKEYFQKFKENSKEFTNVRNKKESYE RCIAQSFLKDELKLIFKKQREFGFSFSKKFEEEVLSVAFYKRALKDFSH LVGNCSFFTDEKRAPKNSPLAFMFVALTRIINLLNNLKNTEGILYTKDD LNALLNEVLKNGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFKGEKGTYFIEFKKYKE FIKALGEHNLSQDDLNEIAKDITLIKDEIKLKKALAKYDLNQNQIDSLS KLEFKDHLNISFKALKLVTPLMLEGKKYDEACNELNLKVAINEDKKD FLPAFNETYYKDEVTNPVVLRAIKEYRKVLNALLKKYGKVHKINIELA REVGKNHSQRAKIEKEQNENYKAKKDAELECEKLGLKINSKNILKLR LFKEQKEFCAYSGEKIKISDLQDEKMLEIDHIYPYSRSFDDSYMNKVL VFTKQNQEKLNQTPFEAFGNDSAKWQKIEVLAKNLPTKKQKRILDKN YKDKEQKNFKDRNLNDTRYIARLVLNYTKDYLDFLPLSDDENTKLND TQKGSKVHVEAKSGMLTSALRHTWGFSAKDRNNHLHHAIDAVIIAYA NNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISELDYKNKRKFFEPFSGFRQK VLDKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEEFYQSYGGKEGVLKALE LGKIRKVNGKIVKNGDMFRVDIFKHKKTNKFYAVPIYTMDFALKVLP NKAVARSKKGEIKDWILMDENYEFCFSLYKDSLILIQTKDMQEPEFVY YNAFTSSTVSLIVSKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGIQNL KVFEKYIVSALGEVTKAEFRQREDFKK	9

【表１－１０】

名称	Cas9ポリペプチド配列	配列番号
GeoCas9	MRYKIGLDIGITSVGWAVMNLDIPRIEDLGVRIFDRAENPQTGESLALP RRLARSARRRLRRRKHRLERIRRLVIREGILTKEELDKLFEEKHEIDVW QLRVEALDRKLNNDELARVLLHLAKRRGFKSNRKSERSNKENSTMLK HIEENRAILSSYRTVGEMIVKDPKFALHKRNKGENYTNTIARDDLEREI RLIFSKQREFGNMSCTEEFENEYITIWASQRPVASKDDIEKKVGFCTFE PKEKRAPKATYTFQSFIAWEHINKLRLISPSGARGLTDEERRLLYEQAF QKNKITYHDIRTLLHLPDDTYFKGIVYDRGESRKQNENIRFLELDAYH QIRKAVDKVYGKGKSSSFLPIDFDTFGYALTLFKDDADIHSYLRNEYE QNGKRMPNLANKVYDNELIEELLNLSFTKFGHLSLKALRSILPYMEQG EVYSSACERAGYTFTGPKKKQKTMLLPNIPPIANPVVMRALTQARKV VNAIIKKYGSPVSIHIELARDLSQTFDERRKTKKEQDENRKKNETAIRQ LMEYGLTLNPTGHDIVKFKLWSEQNGRCAYSLQPIEIERLLEPGYVEV DHVIPYSRSLDDSYTNKVLVLTRENREKGNRIPAEYLGVGTERWQQF ETFVLTNKQFSKKKRDRLLRLHYDENEETEFKNRNLNDTRYISRFFAN FIREHLKFAESDDKQKVYTVNGRVTAHLRSRWEFNKNREESDLHHAV DAVIVACTTPSDIAKVTAFYQRREQNKELAKKTEPHFPQPWPHFADEL RARLSKHPKESIKALNLGNYDDQKLESLQPVFVSRMPKRSVTGAAHQ ETLRRYVGIDERSGKIQTVVKTKLSEIKLDASGHFPMYGKESDPRTYE AIRQRLLEHNNDPKKAFQEPLYKPKKNGEPGPVIRTVKIIDTKNQVIPL NDGKTVAYNSNIVRVDVFEKDGKYYCVPVYTMDIMKGILPNKAIEPN KPYSEWKEMTEDYTFRFSLYPNDLIRIELPREKTVKTAAGEEINVKDV FVYYKTIDSANGGLELISHDHRFSLRGVGSRTLKRFEKYQVDVLGNIY KVRGEKRVGLASSAHSKPGKTIRPLQSTRD	10

【表１－１１】

名称	Cas9ポリペプチド配列	配列番号
HpaCas9	MENKNLNYILGLDLGIASVGWAVVEIDEKENPLRLIDVGVRTFERAEV PKTGESLALSRRLARSARRLTQRRVARLKKAKRLLKSENILLSTDERL PHQVWQLRVEGLDHKLERQEWAAVLLHLIKHRGYLSQRKNESKSEN KELGALLSGVDNNHKLLQQATYRSPAELAVKKFEVEEGHIRNQQGAY THTFSRLDLLAEMELLFSRQQHFGNPFASEKLLENLTALLMWQKPALS GEAILKMLGKCTFEDEYKAAKNTYSAERFVWITKLNNLRIQENGLER ALNDNERLALMEQPYDKNRLFYSQVRSILKLSDEAIFKGLRYSGEDKK AIETKAVLMEMKAYHQIRKVLEGNNLKAEWAELKANPTLLDEIGTAF SLYKTDEDISAYLAGKLSQPVLNALLENLSFDKFIQLSLKALYKLLPL MQQGLRYDEACREIYGDHYGKKTEENHHFLPQIPADEIRNPVVLRTLT QARKVINGVVRLYGSPARIHIETGREVGKSYKDRRELEKRQEENRKQ RENAIKEFKEYFPHFAGEPKAKDILKMRLYKQQNAKCLYSGKPIELHR LLEKGYVEVDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLANENQNKGNLTPFEWL DGKHNSERWRAFKALVETSAFPYAKKQRILSQKLDEKGFIERNLNDT RYVARFLCNFIADNMHLTGEGKRKVFASNGQITALLRSRWGLAKSRE DNDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRFEAGDVFTGERIDRETGE IIPLHFPTPWQFFKQEVEIRIFSDNPKLELENRLPDRPQANHEFVQPLFV SRMPTRKMTGQGHMETVKSAKRLNEGISVIKMPLTKLKLKDLELMV NREREKDLYDTLKARLEAFNDDPAKAFAEPFIKKGGAIVKSVRVEQIQ KSGVLVREGNGVADNASMVRVDVFTKGGKYFLVPIYTWQVAKGILP NKAATQYKDEEDWEVMDNSATFKFSLHPNDLVKLVTKKKTILGYFN GLNRATGNIDIKEHDLDKSKGKQGIFEGVGIKLALSFEKYQVDELGKN IRLCKPSKRQPVR	11

【表１－１２】

名称	Cas9ポリペプチド配列	配列番号
SmuCas9	MMMEKFHYVLGLDLGIASVGWAAIEIDKETETSIGLLDCGVRTFERAEVPKTGDSLAKARREARSTRRLIRRRSHRLLRLKRLLKREIFRQPETFKDLPINAWQLRVKGLDSRLNEYEWAAVLLHLVKHRGYLSQRKSEMSETDSKSEMGRLLAGVAENHQLLQQEQYRTPAELALKKFVKHFRNKGGDYAHTFNRLDLQAELHLLFQKQRELGNPFTSPELERQVDDLLMTQRSALQGDAILKMLGHCGFEPEQFKAAKNTFSAERFIWLTKLNNLRIQDQGKERALTADERTKLLDEPYKKSKLTYAQVRKLLSLPQTAIFKGLRYDLEHDKKAENSTLMEMKSYHNIRQTLEKSGLKTEWQSIATQPEILDAIGTAFSIYKTDEDISHELKTCRLPENVLNELLKNINFDGFIQLSLTALRKILPLMEQGYRYDEACTQIYGNHHSGSLQQESKQFLPHIPIDDVRNPVVFRTLTQARKVVNAIIRRYGSPARVHIEMARELGKSKSDRDRIEKQQQKNKKERENAVAKFKEDFPDFVGEPRGKDILKMRLYEQQHGKCLYSGHDIDINRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSQNNKVLVLGSENQNKRNQTPDEYLDGANNSQRWLEFQARVQTCHFSYGKKQRIQLAKLDDETEKGFLERNLNDTRYIARFMCQFVQENLYLTGKGKRLVFASNGGMTATLRNLWGLRKVREDNDRHHALDAIVVACSTASMQQKITKAFQRHESIEYVDTETGEVKFRIPQPWDFFRQEVMIRVFSDQPCEDLVEKLSARPEALHDNVTPLFVSRAPNRKMSGQGHLETIKSAKRLSEENSMVKKPLTTLKLKDIPEIVGYPSREPQLYAALKTRLETHDDDPIKAFAKPFYKPNKNGELGALVRSVRVKGVQNTGVMVHDGKGIADNATMVRVDVYTKAGKNYLVPVYVWQVAQGILPNRAVTSGKSEADWDLIDESFEFKFSLSRGDLVEMISNKGRIFGYYNGLDRANGSIGIREHDLEKSKGKDGVHRVGVKTATAFNKYHVDPLGKEIHRCSSEPRPTLKIKSKK	12

【表１－１３】

名称	Cas9ポリペプチド配列	配列番号
NmeCas9	MAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRTRRLLKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVAGNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRSDYSHTFSRKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEILEALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLGRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKGKKRVFASNGQITNLLRGFWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSAKRLDEGVSVLRVPLTQLKLKDLEKMVNREREPKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAEPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQKTGVWVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYYLVPIYSWQVAKGILPDRAVVQGKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMFGYFASCHRGTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFQKYQIDELGKEIRPCRLKKRPPVR	13

【００４７】

いくつかの態様は、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼを含む。ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは、クラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼを含み得る。ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを含み得る。ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは、ニッカーゼを含み得る。ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは、配列番号１～１３のうちのいずれか１つのアミノ酸配列と少なくとも８０％同一のアミノ酸配列、またはその機能的断片を含み得る。

【００４８】

エンドヌクレアーゼは、標的核酸に一本鎖切断を導入し得る。エンドヌクレアーゼは、一本鎖切断の反対側の鎖を切断することなく、標的核酸に一本鎖切断を導入し得る。エンドヌクレアーゼは、ニッカーゼを含み得る。いくつかの事例では、エンドヌクレアーゼは、二本鎖切断を導入するエンドヌクレアーゼを除外し得る。エンドヌクレアーゼは、制限酵素を除外し得る。

【００４９】

エンドヌクレアーゼは、融合タンパク質の一部として含まれ得る。場合によっては、エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載の異種リガーゼなどの異種ポリペプチドに融合された融合タンパク質である。異種ポリペプチドは、融合パートナーを含み得る。融合タンパク質は、ＤＮＡリガーゼ、核局在化シグナル、クロマチン修飾ドメイン、細胞透過性ペプチド、またはタグポリペプチドなどの融合パートナーを含み得る。融合タンパク質は、１つ以上の融合パートナーを含み得る。融合タンパク質は、リガーゼを含み得る。融合タンパク質は、核局在化シグナル、クロマチン修飾ドメイン、細胞透過性ペプチド、またはタ

グポリペプチドを含み得る。

【００５０】

融合パートナーは、エンドヌクレアーゼのＮ末端に接続され得る。融合パートナーは、エンドヌクレアーゼのＣ末端に接続され得る。エンドヌクレアーゼは、Ｎ末端またはＣ末端でリンカーに接続され得る。融合パートナーは、融合パートナーのＮ末端またはＣ末端によって接続され得る。融合パートナーは、融合パートナーのＮ末端によってエンドヌクレアーゼに接続され得る。融合パートナーは、融合パートナーのＣ末端によってエンドヌクレアーゼに接続され得る。融合パートナーは、Ｎ末端またはＣ末端でリンカーに接続され得る。

【００５１】

場合によっては、エンドヌクレアーゼは、リンカーを含み、リンカーは、エンドヌクレアーゼを異種ポリペプチドに共有結合的に接続する。リンカーは、エンドヌクレアーゼを任意の融合パートナーに接続し得る。リンカーはまた、任意の融合パートナーを別の融合パートナーに接続し得る。リンカーポリペプチドは、様々なアミノ酸配列のうちのいずれかを有し得る。タンパク質は、概ね可撓性のスペーサーペプチドによって接合され得るが、他の化学結合は除外されない。好適なリンカーには、４アミノ酸～４０アミノ酸長、または４アミノ酸～２５アミノ酸長のポリペプチドが含まれる。これらのリンカーは、リンカーをコードする合成オリゴヌクレオチドを使用してタンパク質とカップリングすることによって生成することができるか、または融合タンパク質をコードする核酸配列によってコードすることができる。ある程度の可撓性を有するペプチドリンカーを使用することができる。好ましいリンカーが概ね可撓性のペプチドをもたらす配列を有することを踏まえて、連結ペプチドは、実質的にいずれのアミノ酸配列も有し得る。グリシン及びアラニンなどの小さいアミノ酸の使用は、可撓性ペプチドの作製に有用である。そのような配列の作製は、当業者にとって慣例である。様々な異なるリンカーが市販されており、使用に好適であるとみなされている。リンカーポリペプチドの例としては、グリシンポリマー（Ｇ）ｎ、グリシン－セリンポリマー（例えば、（ＧＳ）ｎ、（ＧＳＧＧＳ）ｎ、（ＧＧＳＧＧＳ）ｎ、及び（ＧＧＧＳ）ｎ（ｎは、少なくとも１の整数である）、グリシン－アラニンポリマー、ならびにアラニン－セリンポリマーが挙げられる。例示的なリンカーは、ＧＧＳＧ、ＧＧＳＧＧ、ＧＳＧＳＧ、ＧＳＧＧＧ、ＧＧＧＳＧ、ＧＳＳＳＧなどを含むが、これらに限定されないアミノ酸配列を含み得る。また、配列（ＧＧＧＧＳ）ｎを有するリンカーも好適であり、式中、ｎは、１～１０（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０）の整数である。当業者であれば、任意の所望の要素にコンジュゲートされたペプチドの設計が全てまたは部分的に可撓性のリンカーを含むことができ、これにより、リンカーが、可撓性リンカーのみならず、可撓性の低い構造を与える１つ以上の部分も含むことができるようになることを認識するであろう。

【００５２】

１つ以上のリンカーは、融合タンパク質に含まれ得る。１、２、３、４、５、６、７、８、９、もしくは１０個のリンカー、または前述の整数のうちの任意の２つによって定義されるリンカーの範囲が、融合タンパク質に含まれ得る。リンカーは、エンドヌクレアーゼの少なくとも一部のＮ末端に接続し得る。リンカーは、融合パートナーの少なくとも一部のＮ末端に接続し得る。リンカーは、融合リガーゼの少なくとも一部のＮ末端に接続し得る。リンカーは、核局在化シグナルのＮ末端に接続し得る。リンカーは、クロマチン修飾ドメインのＮ末端に接続し得る。リンカーは、細胞透過性ペプチドのＮ末端に接続し得る。リンカーは、タグポリペプチドのＮ末端に接続し得る。リンカーは、エンドヌクレアーゼの少なくとも一部のＣ末端に接続し得る。リンカーは、融合パートナーの少なくとも一部のＣ末端に接続し得る。リンカーは、融合リガーゼの少なくとも一部のＣ末端に接続し得る。リンカーは、核局在化シグナルのＣ末端に接続し得る。リンカーは、クロマチン修飾ドメインのＣ末端に接続し得る。リンカーは、細胞透過性ペプチドのＣ末端に接続し得る。リンカーは、タグポリペプチドのＣ末端に接続し得る。

【００５３】

リンカーは、いくつかのまたは範囲のアミノ酸または残基を含み得る。リンカーは、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、少なくとも５５、少なくとも６０、少なくとも６５、少なくとも７０、少なくとも７５、少なくとも８０、少なくとも８５、少なくとも９０、少なくとも９５、または少なくとも１００のアミノ酸残基を含み得る。リンカーは、いくつかの態様では、１以下、２以下、３以下、４以下、５以下、６以下、７以下、８以下、９以下、１０以下、１２以下、１３以下、１４以下、１５以下、２０以下、２５以下、３０以下、３５以下、４０以下、４５以下、５０以下、５５以下、６０以下、６５以下、７０以下、７５以下、８０以下、８５以下、９０以下、９５以下、または１００以下のアミノ酸残基を含み得る。リンカーは、１～１０個のアミノ酸、１～２５個のアミノ酸、または１～１００個のアミノ酸を含み得る。

【００５４】

リンカーは、本明細書に記載のポリペプチド鎖またはタンパク質内の任意の場所に含まれ得る。例えば、リンカーは、エンドヌクレアーゼをリガーゼから分離し得る。リンカーは、エンドヌクレアーゼを核局在化シグナル、クロマチン修飾ドメイン、細胞透過性ペプチド、またはタグポリペプチドから分離し得る。

【００５５】

場合によっては、エンドヌクレアーゼは、核局在化配列（例えば、核を標的とするための１つ以上の核局在化シグナルまたはＮＬＳ）を含む。いくつかの態様では、本明細書に記載のＮＬＳは、表２のＮＬＳのうちのいずれか１つを含む。いくつかの態様では、本明細書に記載のＮＬＳは、表２のＮＬＳのうちのいずれか１つのポリペプチド配列と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、またはそれ以上同一であるポリペプチド配列を含む。

【表２】

表２．ＮＬＳポリペプチド配列の非限定的な例

名称	NLSポリペプチド配列	配列番号
NLS1	KRTADGSEFESPKKKRKV	14
NLS2	SGGSKRTADSQHSTPPKTKRKVEFEPKKKRKV	15
NLS3	KRPAATKKAGQAKKKK	16
NLS4	KKTELQTTNAENKTKKL	17
NLS5	KRGINDRNFWRGENGRKTR	18
NLS6	RKSGKIAAIVVKRPRK	19
NLS7	PKKKRKV	20
NLS8	MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLC	21
SGGSx2-bpNLS-SGGSx2	SGGSSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVSGGSSGGS	22
SGGSx2-XTEN16-SGGSx2	SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS	23
SGGSx10	SGGSSGGSSGGSSGGSSGGSSGGSSGGSSGGSSGGSSGGS	24

【００５６】
ＮＬＳポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが使用され得る。そのようなポリヌクレオチドの例は、ＳＧＧＳ×２－ｂｐＮＬＳ－ＳＧＧＳ×２：ＴＣＣＧＧＣＧＧＡＡＧＣＴＣＴＧＧＴＧＧＣＡＧＣＡＡＧＣＧＧＡＣＣＧＣＣＧＡＣＧＧＣＴＣＴＧＡＡＴＴＣＧＡＧＡＧＣＣＣＴＡＡＧＡＡＧＡＡＡＡＧＡＡＡＧＧＴＧＡＧＣＧＧＡＧＧＣＴＣＴＡＧＣＧＧＣＧＧＡＡＧＣ（配列番号２５）であり得る。
【００５７】
いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、二量体化ドメインを含む。二量体化ドメインは、エンドヌクレアーゼのＮ末端またはＣ末端に位置し得る。いくつかの態様では、二量体化ドメインは、エンドヌクレアーゼが別のポリペプチド（例えば、異種リガーゼ）とヘテロ二量体を形成することを可能にする。いくつかの態様では、二量体化ドメインは、エンドヌクレアーゼを別のポリペプチドと機能的にカップリングされるのを可能にする。二量体化ドメインの非限定的な例としては、ロイシンジッパー、ＦＫＢＰ、ＦＲＢ、カルシニューリンＡ、ＣｙＰ－Ｆａｓ、ＧｙｒＢ、ＧＡＩ、ＧＩＤ１、ＳＮＡＰタグ、Ｈａｌｏタグ、Ｂｃｌ－ｘＬ、Ｆａｂ、ＬＯＶドメイン、またはＳｐｙＴａｇ／ＳｐｙＣａｔｃｈｅｒを挙げることができる。二量体化ドメインの他の例としては、ＩｇＭ（ＭＨＤ２）またはＩｇＥ（ＥＨＤ２）の重鎖ドメイン２（ＣＨ２）、免疫グロブリンＦｃ領域、ＩｇＧもしくはＩｇＡの重鎖ドメイン３（ＣＨ３）、ＩｇＭまたはＩｇＥの重鎖ドメイン４（ＣＨ４）、Ｆａｂ、Ｆａｂ２、ロイシンジッパーモチーフ、バーナーゼ－バースター二量体、ミニアンチボディ、またはＺＩＰミニアンチボディのいずれかなどの抗体を挙げることができる。いくつかの態様では、本明細書に記載の二量体化ドメインは、表３の二量体化ドメインのいずれか１つを含む。いくつかの態様では、本明細書に記載の二量体化ドメインは、表３の二量体化ドメインのうちのいずれか１つのポリペプチド配列と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、またはそれ以上同一であるポリペプチド配列を含む。
【表３】

表３．二量体化ドメイン配列の非限定的な例

名称	二量体化ドメイン配列	配列番号
ロイシンジッパーEE12RR345L	LEIEAAFLERENTALETRVAELRQRVQRLRNRVSQYRTRYGPLGGGK	26
ロイシンジッパーRR12EE345L	LEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVQRLENEVSQYETRYGPLGGGK	27

【００５８】
いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、少なくとも１つの追加のドメインを含む。いくつかの態様では、少なくとも１つの追加のドメインは、機能ドメインである。例えば、機能ドメインは、クロマチン修飾ドメインまたは細胞透過性ペプチドを含むことができる。いくつかの態様では、本明細書に記載のクロマチン修飾ドメインは、表４のクロマチン修飾ドメインのいずれか１つを含む。いくつかの態様では、本明細書に記載のクロマチン修飾ドメインは、表４のクロマチン修飾ドメインのうちのいずれか１つのポリペプチド配列と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、またはそれ以上同一であるポリペプチド配列を含む。

【表４】

表４．クロマチン修飾ドメインポリペプチド配列の非限定的な例

名称	クロマチン修飾ドメインポリペプチド配列	配列番号
H1G(ヒストンH1中央球状ドメイン)	STDHPKYSDMIVAAIQAEKNRAGSSRQSIQKYIKSHYKVGENADSQIKLSIKRLVTTGVLKQTKGVGASGSFRLAKSDEP	28
HMGB1	MGKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSAFFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPYEKKAAKLKEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVVKAEKSKKKKEEEEDEEDEEDEEEEEDEEDEDEEEDDDDE	29
HMGB2	MGKGDPNKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDSSVNFAEFSKKCSERWKTMSAKEKSKFEDMAKSDKARYDREMKNYVPPKGDKKGKKKDPNAPKRPPSAFFLFCSEHRPKIKSEHPGLSIGDTAKKLGEMWSEQSAKDKQPYEQKAAKLKEKYEKDIAAYRAKGKSEAGKKGPGRPTGSKKKNEPEDEEEEEEEEDEDEEEEDEDEE	30
HMGB3	MAKGDPKKPKGKMSAYAFFVQTCREEHKKKNPEVPVNFAEFSKKCSERWKTMSGKEKSKFDEMAKADKVRYDREMKDYGPAKGGKKKKDPNAPKRPPSGFFLFCSEFRPKIKSTNPGISIGDVAKKLGEMWNNLNDSEKQPYITKAAKLKEKYEKDVADYKSKGKFDGAKGPAKVARKKVEEEDEEEEEEEEEEEEEDE	31
HMGN1(HN1)	MPKRKVSSAEGAAKEEPKRRSARLSAKPPAKVEAKPKKAAAKDKSSDKKVQTKGKRGAKGKQAEVANQETKEDLPAENGETKTEESPASDEAGEKEAKSD	32
HMGN2	MPKRKAEGDAKGDKAKVKDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKKGEKVPKGKKGKADAGKEGNNPAENGDAKTDQAQKAEGAGDAK	33

【００５９】

いくつかの態様では、本明細書に記載の細胞透過性ペプチドは、表５の細胞透過性ペプチドのうちのいずれか１つを含む。いくつかの態様では、本明細書に記載の細胞透過性ペプチドは、表５の細胞透過性ペプチドのうちのいずれか１つのポリペプチド配列と少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、またはそれ以上同一であるポリペプチド配列を含む。

【表５】

表５．細胞透過性ペプチドポリペプチド配列の非限定的な例

名称	細胞透過性ペプチド配列	配列番号
ペネトラチン	RQIKIYFQNRRMKWKK	34
TAT	RKKRRQRRR	35
R8	RRRRRRRR	36
DPV3	RKKRRRESRKKRRRES	37
DPV6	GRPRESGKKRKRKRLKP	38
R9-TAT	GRRRRRRRRRPPQ	39
pVEC	LLIILRRRIRKQAHAHSK	40
ARF(19-31)	RVRVFVVWHIPRLT	41
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	42
トランスポータン	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	43
Bip4	VSALK	44
C105Y	CSIPPEVKFNPFVYLI	45
メリチン	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	46
gH625	HGLASTLTRWAHYNALIRAF	47

【００６０】

いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、タグを含み、タグは、エンドヌクレアーゼの発現の増加、同定、または精製に使用され得る。いくつかの態様では、本明細書に記載のタグは、表６のタグ配列のいずれか１つを含む。いくつかの態様では、本明細書に記載のタグは、表６のタグ配列のうちのいずれか１つのポリペプチド配列と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、またはそれ以上同一であるポリペプチド配列を含む。

【表６】

表６．タグポリペプチド配列の非限定的な例

名称	タグポリペプチド配列	配列番号
フラグ	DYKDDDDK	48
Hisタグ	HHHHHH	49
CBP	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL	50
MBP	MKIKTGARILALSALTTMMFSASALAKIEEGKLVIWINGDKGYNG LAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAH DRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIA VEALSLIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEP YFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDVGVDNAGAKAGLTFLVD LIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVN YGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLT DEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIM PNIPQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTRITK	51
Myc	EQKLISEEDL	52
GST	MKLFYKPGACSLASHITLRESGKDFTLVSVDLMKKRLENGDNYF AVNPKGQVPALLLDDGTLLTEGVAIMQYLADSVPDRQLLAPVNS ISRYKTIEWLNYIATELHKGFTPLFRPDTPEEYKSTVRAQLEKKLQ YVNEALKDEHWICGQRFTIADAYLFTVLRWAYAVKLNLEGLEHI AAFMQRMAERPEVQDALSAEGLK	53
HA	YPYDVPDYA	54
HA	YAYDVPDYA	210
HA	YDVPDYASL	211

【００６１】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、１つ以上のインテインに融合した１つ以上のエクステインとしてスプリット構築物として発現され得る。インテイン技術を使用して、タンパク質を２つ以上のより短いペプチドセグメント（エクステイン）として発現させることによって、大きなタンパク質を細胞内に送達することができる。各エクステインは、インテインペプチド（例えば、Ｎｐｕ　Ｃインテインまたは Ｎｐｕ　Ｎインテイン）との融合として発現され得る。インテインは、２つ以上のエクステインの融合を自動触媒することができ、対応するエクステインからのインテインの切除を自動触媒することができる。結果は、第２のエクステインに融合し、インテインを欠く第１のエクステインを含むタンパク質複合体であり得る。インテインは、エクステインのＮ末端に位置付けられ得るか、またはインテインは、エクステインのＣ末端に位置付けられ得る。エクステインは、インテインに隣接して（例えば、エクステインのＣ末端に融合されたインテインを有するエクステインのＣ末端に）位置付けられたシステイン残基を含み得る。Ｃａｓニッカーゼは、２つ以上のセグメントとして発現され得る。Ｃａｓニッカーゼセグメントの第１のセグメントは、ＣａｓニッカーゼのＮ末端部分を含み得る。Ｃａｓニッカーゼの第１のセグメントは、第１のインテインを含み得る。Ｃａｓニッカーゼの第２のセグメントは、ＣａｓニッカーゼのＣ末端部分を含み得る。Ｃａｓニッカーゼの第２のセグメントは、第２のインテインを含み得る。インテインは、ＣａｓニッカーゼのＮ末端部分のＣ末端に融合され得る。インテインは、ＣａｓニッカーゼのＣ末端部分のＮ末端に融合され得る。エクステイン－インテイン融合物をコードする核酸配列は、送達ベクター（例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター）に適合し得る。

【００６２】
ＤＮＡリガーゼ
本明細書に開示されるのは、リガーゼである。リガーゼは、ＤＮＡリガーゼであり得るか、またはそれを含み得る。リガーゼは、本明細書に開示される組成物、システムまたは方法に含まれ得る。リガーゼは、組換え体であり得る。リガーゼは、エンドヌクレアーゼにカップリングされ得る。リガーゼは、エンドヌクレアーゼに直接的または間接的にカップリングされ得る。カップリングは、共有結合であり得るか、または非共有結合であり得る。リガーゼは、エンドヌクレアーゼに結合または接続されてもよい。リガーゼは、エンドヌクレアーゼに動員されてもよく、エンドヌクレアーゼとの融合タンパク質の一部であってもよく、またはエンドヌクレアーゼと併せて使用されてもよい。リガーゼは、異種であり得る。リガーゼは、内因性であり得る。異種リガーゼが記載されている場合、非異種（例えば、内因性）リガーゼが、場合によっては使用され得る。リガーゼは、細胞内でコードされ得る。リガーゼは、トランスで細胞に送達され得る。リガーゼは、２つの核酸末端を一緒に接合することによってホスホジエステル結合を形成し得る。リガーゼは、標的核酸の末端（例えば、５’または３’末端）を組み込み核酸（例えば、組み込み核酸の３’または５’末端）に接合することができる。リガーゼは、組み込み核酸を標的核酸の開裂またはニック末端にライゲーションし、ここで、開裂またはニック末端は、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼによって生成されている。リガーゼは、図１Ａ～６Ｃに含まれる任意の態様を含み得る。
【００６３】
リガーゼは、非天然に存在し得る。リガーゼは、操作され得る。リガーゼは、合成であり得る。リガーゼは、予備合成され得る。リガーゼは、対象または細胞に付加され得る。リガーゼは、核酸によってコードされ得る。コード核酸は、操作され得るか、合成され得るか、または対象もしくは細胞に付加され得る。
【００６４】
リガーゼの少なくとも一部は、第１のポリペプチドに含まれ得る。リガーゼの少なくとも一部は、第２のポリペプチドに含まれ得る。リガーゼは、一緒に結合された２つのポリペプチドに分割され得る。第１のポリペプチドは、リガーゼのＮ末端部分を含み得る。第１のポリペプチドは、リガーゼのＣ末端部分を含み得る。第２のポリペプチドは、リガーゼのＮ末端部分を含み得る。第２のポリペプチドは、リガーゼのＣ末端部分を含み得る。リガーゼの一部を含む第１または第２のポリペプチドは、エンドヌクレアーゼの少なくとも一部または全体と融合され得る。
【００６５】
ＤＮＡリガーゼの例は、ｈＬＩＧ１、Ｔ４リガーゼ、Ｔ７リガーゼ、ならびにＡｑｕｉｆｅｘ　ａｅｏｌｉｃｕｓ　ＶＦ５、髄膜炎菌血清群Ａ株Ｚ２４９１、髄膜炎菌血清群Ｂ株ＭＣ５８、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ　ＰＡ０１、Ｖｉｂｒｉｏ　ｃｈｏｌｅｒａｅ　Ｅｌ　Ｔｏｒ　Ｎ１６９６、ワクシニアウイルス、及びＥｍｉｌｉａｎｉａ　ｈｕｘｌｅｙｉウイルス由来のリガーゼである。
【００６６】
リガーゼは、ＤＮＡを含む基質をライゲーションすることができるリガーゼを含み得る。いくつかの態様では、リガーゼは、ＤＮＡスプリントを含む基質をライゲーションすることができるリガーゼを含む。例えば、ＤＮＡリガーゼは、５’リン酸塩を、別のＤＮＡ鎖にハイブリダイゼーションされる２本のＤＮＡ鎖の３’ヒドロキシルにライゲーションしてもよい。スプリントＤＮＡ鎖は、ＲＮＡ部分を含み得る。例えば、ＤＮＡリガーゼは、５’リン酸塩を、ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッド鎖のＤＮＡ部分と交差してハイブリダイゼーションされる２つのＤＮＡ鎖の３’ヒドロキシルにライゲーションしてもよい。いくつかの態様では、リガーゼは、ＤＮＡ／ＲＮＡを含む基質をライゲーションすることができるリガーゼを含む。いくつかの態様では、リガーゼは、ＲＮＡスプリントを含む基質をライゲーションすることができるリガーゼを含む。例えば、ＤＮＡリガーゼは、５’リン酸塩を、ＲＮＡ鎖にハイブリダイゼーションされる２本のＤＮＡ鎖の３’ヒドロキシルに

ライゲーションしてもよい。ＲＮＡ鎖は、ＤＮＡ部分を含み得る。例えば、ＤＮＡリガーゼは、５’リン酸塩を、ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッド鎖のＲＮＡ部分と交差してハイブリダイゼーションされる２つのＤＮＡ鎖の３’ヒドロキシルにライゲーションしてもよい。

【００６７】

いくつかの態様では、本明細書に記載のリガーゼは、表７のリガーゼのうちのいずれか１つを含む。いくつかの態様では、本明細書に記載のリガーゼは、表７のリガーゼのうちのいずれか１つのポリペプチド配列と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、またはそれ以上同一であるポリペプチド配列を含む。

【表７－１】

表７．リガーゼポリペプチド配列の非限定的な例

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
splintR(クロレラウイルスDNAリガーゼPBCV1)	MAITKPLLAATLENIEDVQFPCLATPKIDGIRSVKQTQMLSRT FKPIRNSVMNRLLTELLPEGSDGEISIEGATFQDTTSAVMTGH KMYNAKFSYYWFDYVTDDPLKKYIDRVEDMKNYITVHPHIL EHAQVKIIPLIPVEINNITELLQYERDVLSKGFEGVMIRKPDGK YKFGRSTLKEGILLKMKQFKDAEATIISMTALFKNTNTKTKD NFGYSKRSTHKSGKVEEDVMGSIEVDYDGVVFSIGTGFDAD QRRDFWQNKESYIGKMVKFKYFEMGSKDCPRFPVFIGIRHEE DR	55
hLIG1	MQRSIMSFFHPKKEGKAKKPEKEASNSSRETEPPPKAALKEW NGVVSESDSPVKRPGRKAARVLGSEGEEEDEALSPAKGQKP ALDCSQVSPPRPATSPENNASLSDTSPMDSSPSGIPKRRTARK QLPKRTIQEVLEEQSEDEDREAKRKKEEEEEETPKESLTEAEV ATEKEGEDGDQPTTPPKPLKTSKAETPTESVSEPEVATKQEL QEEEEQTKPPRRAPKTLSSFFTPRKPAVKKEVKEEEPGAPGKE GAAEGPLDPSGYNPAKNNYHPVEDACWKPGQKVPYLAVAR TFEKIEEVSARLRMVETLSNLLRSVVALSPPDLLPVLYLSLNH LGPPQQGLELGVGDGVLLKAVAQATGRQLESVRAEAAEKG DVGLVAENSRSTQRLMLPPPPLTASGVFSKFRDIARLTGSAST AKKIDIIKGLFVACRHSEARFIARSLSGRLRLGLAEQSVLAAL SQAVSLTPPGQEFPPAMVDAGKGKTAEARKTWLEEQGMILK QTFCEVPDLDRIIPVLLEHGLERLPEHCKLSPGIPLKPMLAHPT RGISEVLKRFEEAAFTCEYKYDGQRAQIHALEGGEVKIFSRN QEDNTGKYPDIISRIPKIKLPSVTSFILDTEAVAWDREKKQIQP FQVLTTRKRKEVDASEIQVQVCLYAFDLIYLNGESLVREPLS RRRQLLRENFVETEGEFVFATSLDTKDIEQIAEFLEQSVKDSC EGLMVKTLDVDATYEIAKRSHNWLKLKKDYLDGVGDTLDL VVIGAYLGRGKRAGRYGGFLLASYDEDSEELQAICKLGTGFS DEELEEHHQSLKALVLPSPRPYVRIDGAVIPDHWLDPSAVWE VKCADLSLSPIYPAARGLVDSDKGISLRFPRFIRVREDKQPEQ ATTSAQVACLYRKQSQIQNQQGEDSGSDPEDTY	56

【表７－２】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
hLIG1(233-919)	TPRKPAVKKEVKEEEPGAPGKEGAAEGPLDPSGYNPAKNNY HPVEDACWKPGQKVPYLAVARTFEKIEEVSARLRMVETLSN LLRSVVALSPPDLLPVLYLSLNHLGPPQQGLELGVGDGVLLK AVAQATGRQLESVRAEAAEKGDVGLVAENSRSTQRLMLPPP PLTASGVFSKFRDIARLTGSASTAKKIDIIKGLFVACRHSEARF IARSLSGRLRLGLAEQSVLAALSQAVSLTPPGQEFPPAMVDA GKGKTAEARKTWLEEQGMILKQTFCEVPDLDRIIPVLLEHGL ERLPEHCKLSPGIPLKPMLAHPTRGISEVLKRFEEAAFTCEYK YDGQRAQIHALEGGEVKIFSRNQEDNTGKYPDIISRIPKIKLPS VTSFILDTEAVAWDREKKQIQPFQVLTTRKRKEVDASEIQVQ VCLYAFDLIYLNGESLVREPLSRRRQLLRENFVETEGEFVFAT SLDTKDIEQIAEFLEQSVKDSCEGLMVKTLDVDATYEIAKRS HNWLKLKKDYLDGVGDTLDLVVIGAYLGRGKRAGRYGGFL LASYDEDSEELQAICKLGTGFSDEELEEHHQSLKALVLPSPRP YVRIDGAVIPDHWLDPSAVWEVKCADLSLSPIYPAARGLVDS DKGISLRFPRFIRVREDKQPEQATTSAQVACLYRKQSQIQNQ QGEDSGSDPEDTY	57
hLIG1(119-919)	PKRRTARKQLPKRTIQEVLEEQSEDEDREAKRKKEEEEEETP KESLTEAEVATEKEGEDGDQPTTPPKPLKTSKAETPTESVSEP EVATKQELQEEEEQTKPPRRAPKTLSSFFTPRKPAVKKEVKE EEPGAPGKEGAAEGPLDPSGYNPAKNNYHPVEDACWKPGQ KVPYLAVARTFEKIEEVSARLRMVETLSNLLRSVVALSPPDL LPVLYLSLNHLGPPQQGLELGVGDGVLLKAVAQATGRQLES VRAEAAEKGDVGLVAENSRSTQRLMLPPPPLTASGVFSKFRD IARLTGSASTAKKIDIIKGLFVACRHSEARFIARSLSGRLRLGL AEQSVLAALSQAVSLTPPGQEFPPAMVDAGKGKTAEARKTW LEEQGMILKQTFCEVPDLDRIIPVLLEHGLERLPEHCKLSPGIP LKPMLAHPTRGISEVLKRFEEAAFTCEYKYDGQRAQIHALEG GEVKIFSRNQEDNTGKYPDIISRIPKIKLPSVTSFILDTEAVAW DREKKQIQPFQVLTTRKRKEVDASEIQVQVCLYAFDLIYLNG ESLVREPLSRRRQLLRENFVETEGEFVFATSLDTKDIEQIAEFL EQSVKDSCEGLMVKTLDVDATYEIAKRSHNWLKLKKDYLD GVGDTLDLVVIGAYLGRGKRAGRYGGFLLASYDEDSEELQA ICKLGTGFSDEELEEHHQSLKALVLPSPRPYVRIDGAVIPDHW LDPSAVWEVKCADLSLSPIYPAARGLVDSDKGISLRFPRFIRV REDKQPEQATTSAQVACLYRKQSQIQNQQGEDSGSDPEDTY	58

【表７－３】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
hLIG3アイソフォーム1	MSLAFKIFFPQTLRALSRKELCLFRKHHWRDVRQFSQWSETD LLHGHPLFLRRKPVLSFQGSHLRSRATYLVFLPGLHVGLCSG PCEMAEQRFCVDYAKRGTAGCKKCKEKIVKGVCRIGKVVPN PFSESGGDMKEWYHIKCMFEKLERARATTKKIEDLTELEGW EELEDNEKEQITQHIADLSSKAAGTPKKKAVVQAKLTTTGQV TSPVKGASFVTSTNPRKFSGFSAKPNNSGEAPSSPTPKRSLSSS KCDPRHKDCLLREFRKLCAMVADNPSYNTKTQIIQDFLRKGS AGDGFHGDVYLTVKLLLPGVIKTVYNLNDKQIVKLFSRIFNC NPDDMARDLEQGDVSETIRVFFEQSKSFPPAAKSLLTIQEVDE FLLRLSKLTKEDEQQQALQDIASRCTANDLKCIIRLIKHDLKM NSGAKHVLDALDPNAYEAFKASRNLQDVVERVLHNAQEVE KEPGQRRALSVQASLMTPVQPMLAEACKSVEYAMKKCPNG MFSEIKYDGERVQVHKNGDHFSYFSRSLKPVLPHKVAHFKD YIPQAFPGGHSMILDSEVLLIDNKTGKPLPFGTLGVHKKAAF QDANVCLFVFDCIYFNDVSLMDRPLCERRKFLHDNMVEIPN RIMFSEMKRVTKALDLADMITRVIQEGLEGLVLKDVKGTYE PGKRHWLKVKKDYLNEGAMADTADLVVLGAFYGQGSKGG MMSIFLMGCYDPGSQKWCTVTKCAGGHDDATLARLQNELD MVKISKDPSKIPSWLKVNKIYYPDFIVPDPKKAAVWEITGAEF SKSEAHTADGISIRFPRCTRIRDDKDWKSATNLPQLKELYQLS KEKADFTVVAGDEGSSTTGGSSEENKGPSGSAVSRKAPSKPS ASTKKAEGKLSNSNSKDGNMQTAKPSAMKVGEKLATKSSP VKVGEKRKAADETLCQTKVLLDIFTGVRLYLPPSTPDFSRLR RYFVAFDGDLVQEFDMTSATHVLGSRDKNPAAQQVSPEWI WACIRKRRLVAPC	59

【表７－４】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
hLIG3アイソフォーム2	MSLAFKIFFPQTLRALSRKELCLFRKHHWRDVRQFSQWSETD LLHGHPLFLRRKPVLSFQGSHLRSRATYLVFLPGLHVGLCSG PCEMAEQRFCVDYAKRGTAGCKKCKEKIVKGVCRIGKVVPN PFSESGGDMKEWYHIKCMFEKLERARATTKKIEDLTELEGW EELEDNEKEQITQHIADLSSKAAGTPKKKAVVQAKLTTTGQV TSPVKGASFVTSTNPRKFSGFSAKPNNSGEAPSSPTPKRSLSSS KCDPRHKDCLLREFRKLCAMVADNPSYNTKTQIIQDFLRKGS AGDGFHGDVYLTVKLLLPGVIKTVYNLNDKQIVKLFSRIFNC NPDDMARDLEQGDVSETIRVFFEQSKSFPPAAKSLLTIQEVDE FLLRLSKLTKEDEQQQALQDIASRCTANDLKCIIRLIKHDLKM NSGAKHVLDALDPNAYEAFKASRNLQDVVERVLHNAQEVE KEPGQRRALSVQASLMTPVQPMLAEACKSVEYAMKKCPNG MFSEIKYDGERVQVHKNGDHFSYFSRSLKPVLPHKVAHFKD YIPQAFPGGHSMILDSEVLLIDNKTGKPLPFGTLGVHKKAAF QDANVCLFVFDCIYFNDVSLMDRPLCERRKFLHDNMVEIPN RIMFSEMKRVTKALDLADMITRVIQEGLEGLVLKDVKGTYE PGKRHWLKVKKDYLNEGAMADTADLVVLGAFYGQGSKGG MMSIFLMGCYDPGSQKWCTVTKCAGGHDDATLARLQNELD MVKISKDPSKIPSWLKVNKIYYPDFIVPDPKKAAVWEITGAEF SKSEAHTADGISIRFPRCTRIRDDKDWKSATNLPQLKELYQLS KEKADFTVVAGDEGSSTTGGSSEENKGPSGSAVSRKAPSKPS ASTKKAEGKLSNSNSKDGNMQTAKPSAMKVGEKLATKSSP VKVGEKRKAADETLCQTKRRPASEQRGRTVPAGRR	60

【表７－５】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
hLIG3アイソフォーム3	MAEQRFCVDYAKRGTAGCKKCKEKIVKGVCRIGKVVPNPFS ESGGDMKEWYHIKCMFEKLERARATTKKIEDLTELEGWEEL EDNEKEQITQHIADLSSKAAGTPKKKAVVQAKLTTTGQVTSP VKGASFVTSTNPRKFSGFSAKPNNSGEAPSSPTPKRSLSSSKC DPRHKDCLLREFRKLCAMVADNPSYNTKTQIIQDFLRKGSAG DGFHGDVYLTVKLLLPGVIKTVYNLNDKQIVKLFSRIFNCNP DDMARDLEQGDVSETIRVFFEQSKSFPPAAKSLLTIQEVDEFL LRLSKLTKEDEQQQALQDIASRCTANDLKCIIRLIKHDLKMN SGAKHVLDALDPNAYEAFKASRNLQDVVERVLHNAQEVEK EPGQRRALSVQASLMTPVQPMLAEACKSVEYAMKKCPNGM FSEIKYDGERVQVHKNGDHFSYFSRSLKPVLPHKVAHFKDYI PQAFPGGHSMILDSEVLLIDNKTGKPLPFGTLGVHKKAAFQD ANVCLFVFDCIYFNDVSLMDRPLCERRKFLHDNMVEIPNRIM FSEMKRVTKALDLADMITRVIQEGLEGLVLKDVKGTYEPGK RHWLKVKKDYLNEGAMADTADLVVLGAFYGQGSKGGMM SIFLMGCYDPGSQKWCTVTKCAGGHDDATLARLQNELDMV KISKDPSKIPSWLKVNKIYYPDFIVPDPKKAAVWEITGAEFSK SEAHTADGISIRFPRCTRIRDDKDWKSATNLPQLKELYQLSKE KADFTVVAGDEGSSTTGGSSEENKGPSGSAVSRKAPSKPSAS TKKAEGKLSNSNSKDGNMQTAKPSAMKVGEKLATKSSPVK VGEKRKAADETLCQTKVLLDIFTGVRLYLPPSTPDFSRLRRY FVAFDGDLVQEFDMTSATHVLGSRDKNPAAQQVSPEWIWA CIRKRRLVAPC	61

【表７－６】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
hLIG3アイソフォーム4	MAEQRFCVDYAKRGTAGCKKCKEKIVKGVCRIGKVVPNPFS ESGGDMKEWYHIKCMFEKLERARATTKKIEDLTELEGWEEL EDNEKEQITQHIADLSSKAAGTPKKKAVVQAKLTTTGQVTSP VKGASFVTSTNPRKFSGFSAKPNNSGEAPSSPTPKRSLSSSKC DPRHKDCLLREFRKLCAMVADNPSYNTKTQIIQDFLRKGSAG DGFHGDVYLTVKLLLPGVIKTVYNLNDKQIVKLFSRIFNCNP DDMARDLEQGDVSETIRVFFEQSKSFPPAAKSLLTIQEVDEFL LRLSKLTKEDEQQQALQDIASRCTANDLKCIIRLIKHDLKMN SGAKHVLDALDPNAYEAFKASRNLQDVVERVLHNAQEVEK EPGQRRALSVQASLMTPVQPMLAEACKSVEYAMKKCPNGM FSEIKYDGERVQVHKNGDHFSYFSRSLKPVLPHKVAHFKDYI PQAFPGGHSMILDSEVLLIDNKTGKPLPFGTLGVHKKAAFQD ANVCLFVFDCIYFNDVSLMDRPLCERRKFLHDNMVEIPNRIM FSEMKRVTKALDLADMITRVIQEGLEGLVLKDVKGTYEPGK RHWLKVKKDYLNEGAMADTADLVVLGAFYGQGSKGGMM SIFLMGCYDPGSQKWCTVTKCAGGHDDATLARLQNELDMV KISKDPSKIPSWLKVNKIYYPDFIVPDPKKAAVWEITGAEFSK SEAHTADGISIRFPRCTRIRDDKDWKSATNLPQLKELYQLSKE KADFTVVAGDEGSSTTGGSSEENKGPSGSAVSRKAPSKPSAS TKKAEGKLSNSNSKDGNMQTAKPSAMKVGEKLATKSSPVK VGEKRKAADETLCQTKRRPASEQRGRTVPAGRR	62

【表７－７】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
hLIG4	MAASQTSQTVASHVPFADLCSTLERIQKSKGRAEKIRHFREF LDSWRKFHDALHKNHKDVTDSFYPAMRLILPQLERERMAY GIKETMLAKLYIELLNLPRDGKDALKLLNYRTPTGTHGDAG DFAMIAYFVLKPRCLQKGSLTIQQVNDLLDSIASNNSAKRKD LIKKSLLQLITQSSALEQKWLIRMIIKDLKLGVSQQTIFSVFHN DAAELHNVTTDLEKVCRQLHDPSVGLSDISITLFSAFKPMLA AIADIEHIEKDMKHQSFYIETKLDGERMQMHKDGDVYKYFS RNGYNYTDQFGASPTEGSLTPFIHNAFKADIQICILDGEMMA YNPNTQTFMQKGTKFDIKRMVEDSDLQTCYCVFDVLMVNN KKLGHETLRKRYEILSSIFTPIPGRIEIVQKTQAHTKNEVIDAL NEAIDKREEGIMVKQPLSIYKPDKRGEGWLKIKPEYVSGLMD ELDILIVGGYWGKGSRGGMMSHFLCAVAEKPPPGEKPSVFH TLSRVGSGCTMKELYDLGLKLAKYWKPFHRKAPPSSILCGTE KPEVYIEPCNSVIVQIKAAEIVPSDMYKTGCTLRFPRIEKIRDD KEWHECMTLDDLEQLRGKASGKLASKHLYIGGDDEPQEKK RKAAPKMKKVIGIIEHLKAPNLTNVNKISNIFEDVEFCVMSGT DSQPKPDLENRIAEFGGYIVQNPGPDTYCVIAGSENIRVKNIIL SNKHDVVKPAWLLECFKTKSFVPWQPRFMIHMCPSTKEHFA REYDCYGDSYFIDTDLNQLKEVFSGIKNSNEQTPEEMASLIA DLEYRYSWDCSPLSMFRRHTVYLDSYAVINDLSTKNEGTRL AIKALELRFHGAKVVSCLAEGVSHVIIGEDHSRVADFKAFRR TFKRKFKILKESWVTDSIDKCELQEENQYLI	63
T4リガーゼ	MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGL QYYIKKWPKPGIATQSFGMLTLTDMLDFIEFTLATRKLTGNA AIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVW PGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKFPAFAQLKADGARCFAE VRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPE GVLIDGELVYHEQVKKEPEGLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAE SRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLP AFRLKYDVRFSKLEQMTSGYDKVILIENQVVNNLDEAKVIY KKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIDVDLKIV GIYPHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHE LDRTRIMENQNYYIGKILECECNGWLKSDGRTDYVKLFLPIAI RLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL	64

【表７－８】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
T7リガーゼ	MMNIKTNPFKAVSFVESAIKKALDNAGYLIAEIKYDGVRGNI CVDNTANSYWLSRVSKTIPALEHLNGFDVRWKRLLNDDRCF YKDGFMLDGELMVKGVDFNTGSGLLRTKWTDTKNQEFHEE LFVEPIRKKDKVPFKLHTGHLHIKLYAILPLHIVESGEDCDVM TLLMQEHVKNMLPLLQEYFPEIEWQAAESYEVYDMVELQQL YEQKRAEGHEGLIVKDPMCIYKRGKKSGWWKMKPENEADG IIQGLVWGTKGLANEGKVIGFEVLLESGRLVNATNISRALMD EFTETVKEATLSQWGFFSPYGIGDNDACTINPYDGWACQISY MEETPDGSLRHPSFVMFRGTEDNPQEKM	65
Taqリガーゼ	MTLEAARRRVNELRDLIRYHNYLYYVLDAPEISDAEYDRLL RELKELEERFPELQSPDSPTEQVGARPLESTFRPVRHPTRMYS LDNAFSLDEVRAFEERIERALGRKGPFLYTVEHKVDGLSVNL YYEEGILVFGATRGDGETGEEVTQNLLTIRTIPRRLTGVPDRL EVRGEVYMPIEAFLRLNQELEEAGERIFKNPRNAAAGSLRQK DPRVTARRGLRATFYALGLGLEETGLKSQHDLLLWLRERGF PVEHGFTRALGAEGVEEVYQAWLKERRKLPFEADGVVVKL DDLALWRELGYTARAPRFALAYKFPAEEKETRLLSVAFQVG RTGRITPVGVLEPVFIEGSEVSRVTLHNESFIEELDVRIGDWVL VHKAGGVIPEVLRVLKERRTGEEKPILWPENCPECGHALIKE GKVHRCPNPLCPAKRFEAIRHYASRKAMDIQGLGEKLIEKLL EKGLVRDVADLYRLKKEDLVNLERMGEKSAENLLRQIEESK GRGLERLLYALGLPGVGEVLARNLALRFGHMDRLLEAGLED LLEVEGVGELTARAILNTLKDPEFRDLVRRLKEAGVEMEAK EREGEALKGLTFVITGELSRPREEVKALLRRLGAKVTDSVSR KTGFLVVGENPGSKLEKARALGVPTLSEEELYRLIEERTGKD PRALTA	66
T3リガーゼ	MNIFNTNPFKAVSFVESAVKKALETSGYLIADCKYDGVRGNI VVDNVAEAAWLSRVSKFIPALEHLNGFDKRWQQLLNDDRCI FPDGFMLDGELMVKGVDFNTGSGLLRTKWVKRDNMGFHLT NVPTKLTPKGREVIDGKFEFHLDPKRLSVRLYAVMPIHIAESG EDYDVQNLLMPYHVEAMRSLLVEYFPEIEWLIAETYEVYDM DSLTELYEEKRAEGHEGLIVKDPQGIYKRGKKSGWWKLKPE CEADGIIQGVNWGTEGLANEGKVIGFSVLLETGRLVDANNIS RALMDEFTSNVKAHGEDFYNGWACQVNYMEATPDGSLRHP SFEKFRGTEDNPQEKM	67

【表７－９】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
NAD依存性E coli DNAリガーゼLigA	MESIEQQLTELRTTLRHHEYLYHVMDAPEIPDAEYDRLMREL RELETKHPELITPDSPTQRVGAAPLAAFSQIRHEVPMLSLDNV FDEESFLAFNKRVQDRLKNNEKVTWCCELKLDGLAVSILYE NGVLVSAATRGDGTTGEDITSNVRTIRAIPLKLHGENIPARLE VRGEVFLPQAGFEKINEDARRTGGKVFANPRNAAAGSLRQL DPRITAKRPLTFFCYGVGVLEGGELPDTHLGRLLQFKKWGLP VSDRVTLCESAEEVLAFYHKVEEDRPTLGFDIDGVVIKVNSL AQQEQLGFVARAPRWAVAFKFPAQEQMTFVRDVEFQVGRT GAITPVARLEPVHVAGVLVSNATLHNADEIERLGLRIGDKVV IRRAGDVIPQVVNVVLSERPEDTREVVFPTHCPVCGSDVERV EGEAVARCTGGLICGAQRKESLKHFVSRRAMDVDGMGDKII DQLVEKEYVHTPADLFKLTAGKLTGLERMGPKSAQNVVNA LEKAKETTFARFLYALGIREVGEATAAGLAAYFGTLEALEAA SIEELQKVPDVGIVVASHVHNFFAEESNRNVISELLAEGVHW PAPIVINAEEIDSPFAGKTVVLTGSLSQMSRDDAKARLVELGA KVAGSVSKKTDLVIAGEAAGSKLAKAQELGIEVIDEAEMLRL LGS	68
Thermococcus kodakarensis DNAリガーゼ	MRYSELADLYRRLEKTTLKTLKTKFVADFLKKTPDELLEIVP YLILGKVFPDWDERELGVGEKLLIKAVSMATGVPEKEIEDSV RDTGDLGESVALAIKKKKQKSFFSQPLTIKRVYDTFVKIAEA QGEGSQDRKMKYLANLFMDAEPEEGKYLARTVLGTMRTGV AEGILRDAIAEAFRVKPELVERAYMLTSDFGYVAKIAKLEGN EGLSKVRIQIGKPIRPMLAQNAASVKDALIEMGGEAAFEIKY DGARVQVHKDGDKVIVYSRRLENVTRSIPEVIEAIKAALKPE KAIVEGELVAVGENGRPRPFQYVLRRFRRKYNIDEMIEKIPLE LNLFDVMFVDGESLIETKFIDRRNKLEEIVKESEKIKLAEQLIT KKVEEAEAFYRRALELGHEGLMAKRLDSIYEPGNRGKKWL KIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRAHLLGSFLVAAYDPHSGEF LPVGKVGSGFTDEDLVEFTKMLKPYIVRQEGKFVEIEPKFVIE VTYQEIQKSPKYKSGFALRFPRYVALREDKSPEEADTIERVAE LYELQERFKAKK	69

【表７－１０】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
アフリカ豚熱ウイルスDNAリガーゼ	MLNQFPGQYSNNIFCFPPIESETKSGKKASWIICVQVVQHNTII PITDEMFSTDVKDAVAEIFTKFFVEEGAVRISKMTRVTEGKN LGKKNATTVVHQAFKDALSKYNRHARQKRGAHTNRGMIPP MLVKYFNIIPKTFFEEETDPIVQRKRNGVRAVACQQGDGCIL LYSRTEKEFLGLDNIKKELKQLYLFIDVRVYLDGELYLHRKP LQWIAGQANAKTDSSELHFYVFDCFWSDQLQMPSNKRQQLL TNIFKQKEDLTFIHQVENFSVKNVDEALRLKAQFIKEGYEGAI VRNANGPYEPGYNNYHSAHLAKLKPLLDAEFILVDYTQGKK GKDLGAILWVCELPNKKRFVVTPKHLTYADRYALFQKLTPA LFKKHLYGKELTVEYAELSPKTGIPLQARAVGFREPINVLEII	70
ワクシニアウイルスDNAリガーゼ(ウエスタンリザーブ株)	MTSLREFRKLCCDIYHASGYKEKSKLIRDFITDRDDKYLIIKL LLPGLDDRIYNMNDKQIIKLYSIIFKQSQEDMLQDLGYGYIGD TIRTFFKENTEIRPRDKSILTLEDVDSFLTTLSSVTKESHQIKLL TDIASVCTCNDLKCVVMLIDKDLKIKAGPRYVLNAISPNAYD VFRKSNNLKEIIENASKQNLDSISISVMTPINPMLAESCDSVNK AFKKFPSGMFAEVKYDGERVQVHKNNNEFAFFSRNMKPVLS HKVDYLKEYIPKAFKKATSIVLDSEIVLVDEHNVPLPFGSLGI HKKKEYKNSNMCLFVFDCLYFDGFDMTDIPLYERRSFLKDV MVEIPNRIVFSELTNISNESQLTDVLDDALTRKLEGLVLKDIN GVYEPGKRRWLKIKRDYLNEGSMADSADLVVLGAYYGKGA KGGIMAVFLMGCYDDESGKWKTVTKCSGHDDNTLRVLQDQ LTMVKINKDPKKIPEWLVVNKIYIPDFVVEDPKQSQIWEISGA EFTSSKSHTANGISIRFPRFTRIREDKTWKESTHLNDLVNLTKS	71
ワクシニアウイルスDNAリガーゼ(アンカラ株)	MTSLREFRKLCCDIYHASGYKEKSKLIRDFITDRDDKYLIIKL LLPGLDDRIYNMNDKQIIKLYSIIFKQSQEDMLQDLGYGYIGD TIRTFFKENTEIRPRDKSILTLEEVDSFLTTLSSVTKESHQIKLL TDIASVCTCNDLKCVVMLIDKDLKIKAGPRYVLNAISPHAYD VFRKSNNLKEIIENASKQNLDSISISVMTPINPMLAESCDSVNK AFKKFPSGMFAEVKYDGERVQVHKNNNEFAFFSRNMKPVLS HKVDYLKEYIPKAFKKATSIVLDSEIVLVDEHNVPLPFGSLGI HKKKEYKNSNMCLFVFDCLYFDGFDMTDIPLYERRSFLKDV MVEIPNRIVFSELTNISNESQLTDVLDDALTRKLEGLVLKDIN GVYEPGKRRWLKIKRDYLNEGSMADSADLVVLGAYYGKGA KGGIMAVFLMGCYDDESGKWKTVTKCSGHDDNTLRELQDQ LKMIKINKDPKKIPEWLVVNKIYIPDFVVEDPKQSQIWEISGA EFTSSKSHTANGISIRFPRFTRIREDKTWKESTHLNDLVNLTKS	72

【表７－１１】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
Burkholderia pseudomallei DNAリガーゼ	MARSPVEPPASQPAKRAAWLRAELERANYAYYVLDQPDLP DAEYDRLFVELQRIEAEHPDLVTPDSPTQRVGGEAASGFTPV VHDKPMLSLNNGFADEDVIAFDKRVADGLDKATDLAGTVT EPVEYACELKFDGLAISLRYENGRFVQASTRGDGTTGEDVTE NIRTIRAIPLTLKGKRIPRMLDVRGEVLMFKRDFARLNERQR AAGQREFANPRNAAAGSLRQLDSKITASRPLSFFAYGIGVLD GADMPDTHSGLLDWYETLGLPVNRERAVVRGAAGLLAFFH SVGERRESLPYDIDGVVYKVNRRDEQDRLGFVSRAPRFALA HKFPAQEALTKLIAIDVQVGRTGAITPVARLEPVFVGGATVT NATLHNEDEVRRKDIRIGDTVIVRRAGDVIPEVVSAVLDRRP ADAQEFVMPTECPECGSRIERLPDEAIARCTGGLFCPAQRKQ ALWHFAQRRALDIDGLGEKIIDQLVEQNLVRTPADLFNLGFS TLVGLDRFAEKSARNLIDSLEKAKHTTLARFIYALGIRHVGES TAKDLAKHFGSLDPIMDAPIDALLEVNDVGPIVAESIHQFFAE EHNRTVIEQLRARGKVTWPEGPPAPRAPQGVLAGKTVVLTG TLPTLTREAAKEMLEAAGAKVAGSVSKKTDYVVAGADAGS KLAKAEELGIPVLDEAGMHTLLEGHAR	73
Alteromonas mediterranea DNAリガーゼ	MQFFLTVFCLLLITAVTHVNAEDKLDIVDGLQLAKQYSHSRQ DINIAEYWVSEKLDGIRARWDGTELRTRNNNKIAAPAWFTA NWPKATIDGELWIARGQFERTASIVLSKLTSVAPHSVAGSLP RTESTVGAMTATHSLPSKRWAKIRFMAFDMPVAGQSFDSRL NMLNNLKEATPNPTFAVVSQFTLSSVNALEEKLEQVTLSGGE GLMLHHKKAFYHSGRSDKLLKVKQFEDAEAKVLAHLPGKG KFKGMMGSLLVETPAGVQFKLGTGFSEKERQAPPAIGSWVT FKFYGVTKNGKPRFASFLRVRPPSDLPK	74

【表７－１２】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
酵母DNAリガーゼI(Cdc9p)	MRRLLTGCLLSSARPLKSRLPLLMSSSLPSSAGKKPKQATLA RFFTSMKNKPTEGTPSPKKSSKHMLEDRMDNVSGEEEYATK KLKQTAVTHTVAAPSSMGSNFSSIPSSAPSSGVADSPQQSQRL VGEVEDALSSNNNDHYSSNIPYSEVCEVFNKIEAISSRLEIIRIC SDFFIKIMKQSSKNLIPTTYLFINRLGPDYEAGLELGLGENLL MKTISETCGKSMSQIKLKYKDIGDLGEIAMGARNVQPTMFKP KPLTVGEVFKNLRAIAKTQGKDSQLKKMKLIKRMLTACKGI EAKFLIRSLESKLRIGLAEKTVLISLSKALLLHDENREDSPDKD VPMDVLESAQQKIRDAFCQVPNYEIVINSCLEHGIMNLDKYC TLRPGIPLKPMLAKPTKAINEVLDRFQGETFTSEYKYDGERA QVHLLNDGTMRIYSRNGENMTERYPEINITDFIQDLDTTKNLI LDCEAVAWDKDQGKILPFQVLSTRKRKDVELNDVKVKVCL FAFDILCYNDERLINKSLKERREYLTKVTKVVPGEFQYATQIT TNNLDELQKFLDESVNHSCEGLMVKMLEGPESHYEPSKRSR NWLKLKKDYLEGVGDSLDLCVLGAYYGRGKRTGTYGGFLL GCYNQDTGEFETCCKIGTGFSDEMLQLLHDRLTPTIIDGPKAT FVFDSSAEPDVWFEPTTLFEVLTADLSLSPIYKAGSATFDKGV SLRFPRFLRIREDKGVEDATSSDQIVELYENQSHMQN	75

【表７－１３】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
酵母DNAリガーゼIV	MISALDSIPEPQNFAPSPDFKWLCEELFVKIHEVQINGTAGTG KSRSFKYYEIISNFVEMWRKTVGNNIYPALVLALPYRDRRIY NIKDYVLIRTICSYLKLPKNSATEQRLKDWKQRVGKGGNLSS LLVEEIAKRRAEPSSKAITIDNVNHYLDSLSGDRFASGRGFKS LVKSKPFLHCVENMSFVELKYFFDIVLKNRVIGGQEHKLLNC WHPDAQDYLSVISDLKVVTSKLYDPKVRLKDDDLSIKVGFA FAPQLAKKVNLSYEKICRTLHDDFLVEEKMDGERIQVHYMN YGESIKFFSRRGIDYTYLYGASLSSGTISQHLRFTDSVKECVL DGEMVTFDAKRRVILPFGLVKGSAKEALSFNSINNVDFHPLY MVFDLLYLNGTSLTPLPLHQRKQYLNSILSPLKNIVEIVRSSR CYGVESIKKSLEVAISLGSEGVVLKYYNSSYNVASRNNNWIK VKPEYLEEFGENLDLIVIGRDSGKKDSFMLGLLVLDEEEYKK HQGDSSEIVDHSSQEKHIQNSRRRVKKILSFCSIANGISQEEFK EIDRKTRGHWKRTSEVAPPASILEFGSKIPAEWIDPSESIVLEI KSRSLDNTETNMQKYATNCTLYGGYCKRIRYDKEWTDCYT LNDLYESRTVKSNPSYQAERSQLGLIRKKRKRVLISDSFHQN RKQLPISNIFAGLLFYVLSDYVTEDTGIRITRAELEKTIVEHGG KLIYNVILKRHSIGDVRLISCKTTTECKALIDRGYDILHPNWV LDCIAYKRLILIEPNYCFNVSQKMRAVAEKRVDCLGDSFEND ISETKLSSLYKSQLSLPPMGELEIDSEVRRFPLFLFSNRIAYVPR RKISTEDDIIEMKIKLFGGKITDQQSLCNLIIIPYTDPILRKDCM NEVHEKIKEQIKASDTIPKIARVVAPEWVDHSINENCQVPEED FPVVNY	76
T6リガーゼ	MILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGL QYYIKKWPKPGIATQSFGMLTLTDMLDFIEFTLATRKLTGNA AIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVW PGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKFPAFAQLKADGARCFAE VRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPE GVLIDGELVYHEQVKKEPEGLDFLFDAHPENSKVKDFTEVAE SRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEVYGL PAFRLKYDVRFSKLEQMTSGYDKVILIENQVVNNLDEAKVIY KKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIDVDLKIV GIYPHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHE LDRTRIMENQNYYIGKILECECNGWLKSDGRTDYVKLFLPIAI RLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGL	77

【表７－１４】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
マウスDNAリガーゼI	MQRSIMSFFQPTKEGKAKKPEKETPSSIREKEPPPKVALKERN QVVPESDSPVKRTGRKVAQVLSCEGEDEDEAPGTPKVQKPV SDSEQSSPPSPDTCPENSPVFNCSSPMDISPSGFPKRRTARKQL PKRTIQDTLEEQNEDKTKTAKKRKKEEETPKESLAEAEDIKQ KEEKEGDQLIVPSEPTKSPESVTLTKTENIPVCKAGVKLKPQE EEQSKPPARGAKTLSSFFTPRKPAVKTEVKQEESGTLRKEET KGTLDPANYNPSKNNYHPIEDACWKHGQKVPFLAVARTFEK IEEVSARLKMVETLSNLLRSVVALSPPDLLPVLYLSLNRLGPP QQGLELGVGDGVLLKAVAQATGRQLESIRAEVAEKGDVGL VAENSRSTQRLMLPPPPLTISGVFTKFCDIARLTGSASMAKK MDIIKGLFVACRHSEARYIARSLSGRLRLGLAEQSVLAALAQ AVSLTPPGQEFPTVVVDAGKGKTAEARKMWLEEQGMILKQ TFCEVPDLDRIIPVLLEHGLERLPEHCKLSPGVPLKPMLAHPT RGVSEVLKRFEEVDFTCEYKYDGQRAQIHVLEGGEVKIFSRN QEDNTGKYPDIISRIPKIKHPSVTSFILDTEAVAWDREKKQIQP FQVLTTRKRKEVDASEIQVQVCLYAFDLIYLNGESLVRQPLS RRRQLLRENFVETEGEFVFTTSLDTKDTEQIAEFLEQSVKDSC EGLMVKTLDVDATYEIAKRSHNWLKLKKDYLDGVGDTLDL VVIGAYLGRGKRAGRYGGFLLAAYDEESEELQAICKLGTGFS DEELEEHHQSLQALVLPTPRPYVRIDGAVAPDHWLDPSIVWE VKCADLSLSPIYPAARGLVDKEKGISLRFPRFIRVRKDKQPEQ ATTSNQVASLYRKQSQIQNQQSSDLDSDVEDY	78

【表７－１５】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
マウスDNAリガーゼIV	MASSQTSQTVAAHVPFADLCSTLERIQKGKDRAEKIRHFKEF LDSWRKFHDALHKNRKDVTDSFYPAMRLILPQLERERMAYG IKETMLAKLYIELLNLPREGKDAQKLLNYRTPSGARTDAGDF AMIAYFVLKPRCLQKGSLTIQQVNELLDLVASNNSGKKKDL VKKSLLQLITQSSALEQKWLIRMIIKDLKLGISQQTIFSIFHND AVELHNVTTDLEKVCRQLHDPSVGLSDISITLFSAFKPMLAA VADVERVEKDMKQQSFYIETKLDGERMQMHKDGALYRYFS RNGYNYTDQFGESPQEGSLTPFIHNAFGTDVQACILDGEMM AYNPTTQTFMQKGVKFDIKRMVEDSGLQTCYSVFDVLMVN KKKLGRETLRKRYEILSSTFTPIQGRIEIVQKTQAHTKKEVVD ALNDAIDKREEGIMVKHPLSIYKPDKRGEGWLKIKPEYVSGL MDELDVLIVGGYWGKGSRGGMMSHFLCAVAETPPPGDRPS VFHTLCRVGSGYTMKELYDLGLKLAKYWKPFHKKSPPSSIL CGTEKPEVYIEPQNSVIVQIKAAEIVPSDMYKTGSTLRFPRIEK IRDDKEWHECMTLGDLEQLRGKASGKLATKHLHVGDDDEP REKRRKPISKTKKAIRIIEHLKAPNLSNVNKVSNVFEDVEFCV MSGLDGYPKADLENRIAEFGGYIVQNPGPDTYCVIAGSENVR VKNIISSDKNDVVKPEWLLECFKTKTCVPWQPRFMIHMCPST KQHFAREYDCYGDSYFVDTDLDQLKEVFLGIKPSEQQTPEE MAPVIADLECRYSWDHSPLSMFRHYTIYLDLYAVINDLSSRIE ATRLGITALELRFHGAKVVSCLSEGVSHVIIGEDQRRVTDFKI FRRMLKKKFKILQESWVSDSVDKGELQEENQYLL	79

【表７－１６】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
アラビドプシスDNAリガーゼI	MLAIRSSNYLRCIPSLCTKTQISQFSSVLISFSRQISHLRLSSCH RAMSSSRPSAFDALMSNARAAAKKKTPQTTNLSRSPNKRKIG ETQDANLGKTIVSEGTLPKTEDLLEPVSDSANPRSDTSSIAED SKTGAKKAKTLSKTDEMKSKIGLLKKKPNDFDPEKMSCWEK GERVPFLFVALAFDLISNESGRIVITDILCNMLRTVIATTPEDL VATVYLSANEIAPAHEGVELGIGESTIIKAISEAFGRTEDHVK KQNTELGDLGLVAKGSRSTQTMMFKPEPLTVVKVFDTFRQI AKESGKDSNEKKKNRMKALLVATTDCEPLYLTRLLQAKLRL GFSGQTVLAALGQAAVYNEEHSKPPPNTKSPLEEAAKIVKQV FTVLPVYDIIVPALLSGGVWNLPKTCNFTLGVPIGPMLAKPTK GVAEILNKFQDIVFTCEYKYDGERAQIHFMEDGTFEIYSRNA ERNTGKYPDVALALSRLKKPSVKSFILDCEVVAFDREKKKIL PFQILSTRARKNVNVNDIKVGVCIFAFDMLYLNGQQLIQENL KIRREKLYESFEEDPGYFQFATAVTSNDIDEIQKFLDASVDVG CEGLIIKTLDSDATYEPAKRSNNWLKLKKDYMDSIGDSVDLV PIAAFHGRGKRTGVYGAFLLACYDVDKEEFQSICKIGTGFSD AMLDERSSSLRSQVIATPKQYYRVGDSLNPDVWFEPTEVWE VKAADLTISPVHRAATGIVDPDKGISLRFPRLLRVREDKKPEE ATSSEQIADLYQAQKHNHPSNEVKGDDD	80

【表７－１７】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
アラビドプシスDNAリガーゼIV	MTEEIKFSVLVSLFNWIQKSKTSSQKRSKFRKFLDTYCKPSDY FVAVRLIIPSLDRERGSYGLKESVLATCLIDALGISRDAPDAV RLLNWRKGGTAKAGANAGNFSLIAAEVLQRRQGMASGGLTI KELNDLLDRLASSENRAEKTLVLSTLIQKTNAQEMKWVIRIIL KDLKLGMSEKSIFQEFHPDAEDLFNVTCDLKLVCEKLRDRH QRHKRQDIEVGKAVRPQLAMRIGDVNAAWKKLHGKDVVA ECKFDGDRIQIHKNGTDIHYFSRNFLDHSEYAHAMSDLIVQNI LVDKCILDGEMLVWDTSLNRFAEFGSNQEIAKAAREGLDSH KQLCYVAFDVLYVGDTSVIHQSLKERHELLKKVVKPLKGRL EVLVPEGGLNVHRPSGEPSWSIVVHAAADVERFFKETVENR DEGIVLKDLESKWEPGDRSGKWMKLKPEYIRAGADLDVLIIG GYYGSGRRGGEVAQFLVALADRAEANVYPRRFMSFCRVGT GLSDDELNTVVSKLKPYFRKNEHPKKAPPSFYQVTNHSKERP DVWIDSPEKSIILSITSDIRTIRSEVFVAPYSLRFPRIDKVRYDK PWHECLDVQAFVELVNSSNGTTQKQKESESTQDNPKVNKSS KRGEKKNVSLVPSQFIQTDVSDIKGKTSIFSNMIFYFVNVPRS HSLETFHKMVVENGGKFSMNLNNSVTHCIAAESSGIKYQAA KRQRDVIHFSWVLDCCSRNKMLPLLPKYFLHLTDASRTKLQ DDIDEFSDSYYWDLDLEGLKQVLSNAKQSEDSKSIDYYKKK LCPEKRWSCLLSCCVYFYPYSQTLSTEEEALLGIMAKRLMLE VLMAGGKVSNNLAHASHLVVLAMAEEPLDFTLVSKSFSEME KRLLLKKRLHVVSSHWLEESLQREEKLCEDVYTLRPKYMEE SDTEESDKSEHDTTEVASQGSAQTKEPASSKIAITSSRGRSNT RAVKRGRSSTNSLQRVQRRRGKQPSKISGDETEESDASEEKV STRLSDIAEETDSFGEAQRNSSRGKCAKRGKSRVGQTQRVQR SRRGKKAAKIGGDESDENDELDGNNNVSADAEEGNAAGRS VENEETREPDIAKYTESQQRDNTVAVEEALQDSRNAKTEMD MKEKLQIHEDPLQAMLMKMFPIPSQKTTETSNRTTGEYRKA NVSGECESSEKRKLDAETDNTSVNAGAESDVVPPLVKKKKV SYRDVAGELLKDW	81

【表７－１８】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
アラビドプシスDNAリガーゼ6	MASDSAGATISGNFSNSDNSETLNLNTTKLYSSAISSISPQFPS PKPTSSCPSIPNSKRIPNTNFIVDLFRLPHQSSSVAFFLSHFHSD HYSGLSSSWSKGIIYCSHKTARLVAEILQVPSQFVFALPMNQ MVKIDGSEVVLIEANHCPGAVQFLFKVKLESSGFEKYVHTGD FRFCDEMRFDPFLNGFVGCDGVFLDTTYCNPKFVFPSQEESV GYVVSVIDKISEEKVLFLVATYVVGKEKILVEIARRCKRKIVV DARKMSMLSVLGCGEEGMFTEDENESDVHVVGWNVLGET WPYFRPNFVKMNEIMVEKGYDKVVGFVPTGWTYEVKRNKF AVRFKDSMEIHLVPYSEHSNYDELREFIKFLKPKRVIPTVGVD IEKFDCKEVNKMQKHFSGLVDEMANKKDFLLGFYRQSYQK NEKSDVDVVSHSAEVYEEEEKNACEDGGENVPSSRGPILHDT TPSSDSRLLIKLRDSLPAWVTEEQMLDLIKKHAGNPVDIVSNF YEYEAELYKQASLPTPSLNNQAVLFDDDVTDLQPNPVKGICP DVQAIQKGFDLPRKMNLTKGTISPGKRGKSSGSKSNKKAKK DPKSKPVGPGQPTLFKFFNKVLDGGSNSVSVGSETEECNTDK KMVHIDASEAYKEVTDQFIDIVNGSESLRDYAASIIDEAKGDI SRALNIYYSKPREIPGDHAGERGLSSKTIQYPKCSEACSSQED KKASENSGHAVNICVQTSAEESVDKNYVSLPPEKYQPKEHA CWREGQPAPYIHLVRTFASVESEKGKIKAMSMLCNMFRSLF ALSPEDVLPAVYLCTNKIAADHENIELNIGGSLISSALEEACGI SRSTVRDMYNSLGDLGDVAQLCRQTQKLLVPPPPLLVRDVF STLRKISVQTGTGSTRLKKNLIVKLMRSCREKEIKFLVRTLAR NLRIGAMLRTVLPALGRAIVMNSFWNDHNKELSESCFREKLE GVSAAVVEAYNILPSLDVVVPSLMDKDIEFSTSTLSMVPGIPI KPMLAKIAKGVQEFFNLSQEKAFTCEYKYDGQRAQIHKLLD GTVCIFSRNGDETTSRFPDLVDVIKQFSCPAAETFMLDAEVV ATDRINGNKLMSFQELSTRERGSKDALITTESIKVEVCVFVFD IMFVNGEQLLALPLRERRRRLKEVFPETRPGYLEYAKEITVG AEEASLNNHDTLSRINAFLEEAFQSSCEGIMVKSLDVNAGYC PTKRSDSWLKVKRDYVDGLGDTLDLVPIGAWYGNGRKAG WYSPFLMACFNPETEEFQSVCRVMSGFSDAFYIEMKEFYSED KILAKKPPYYRTGETPDMWFSAEVVWEIRGADFTVSPVHSAS LGLVHPSRGISVRFPRFISKVTDRNPEECSTATDIAEMFHAQT RKMNITSQH	82

【表７－１９】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
Bacillus subtilis DNAリガーゼ	MDKETAKQRAEELRRTINKYSYEYYTLDEPSVPDAEYDRLM QELIAIEEEHPDLRTPDSPTQRVGGAVLEAFQKVTHGTPMLSL GNAFNADDLRDFDRRVRQSVGDDVAYNVELKIDGLAVSLR YEDGYFVRGATRGDGTTGEDITENLKTIRNIPLKMNRELSIEV RGEAYMPKRSFEALNEERIKNEEEPFANPRNAAAGSLRQLDP KIAAKRNLDIFVYSIAELDEMGVETQSQGLDFLDELGFKTNQ ERKKCGSIEEVITLIDELQAKRADLPYEIDGIVIKVDSLDQQEE LGFTAKSPRWAIAYKFPAEEVVTKLLDIELNVGRTGVITPTAI LEPVKVAGTTVSRASLHNEDLIKEKDIRILDKVVVKKAGDIIP EVVNVLVDQRTGEEKEFSMPTECPECGSELVRIEGEVALRCI NPECPAQIREGLIHFVSRNAMNIDGLGERVITQLFEENLVRNV ADLYKLTKERVIQLERMGEKSTENLISSIQKSKENSLERLLFG LGIRFIGSKAAKTLAMHFESLENLKKASKEELLAVDEIGEKM ADAVITYFHKEEMLELLNELQELGVNTLYKGPKKVKAEDSD SYFAGKTIVLTGKLEELSRNEAKAQIEALGGKLTGSVSKNTD LVIAGEAAGSKLTKAQELNIEVWNEEQLMGELKK	83
Bacillus stearothermophilus	MDRQQAERRAAELRELLNRYGYEYYVLDRPSVPDAEYDRL MQELIAIEEQYPELKTSDSPTQRIGGPPLEAFRKVAHRVPMMS LANAFGEGDLRDFDRRVRQEVGEAAYVCELKIDGLAVSVRY EDGYFVQGATRGDGTTGEDITENLKTIRSLPLRLKEPVSLEAR GEAFMPKASFLRLNEERKARGEELFANPRNAAAGSLRQLDP KVAASRQLDLFVYGLADAEALGIASHSEALDYLQALGFKVN PERRRCANIDEVIAFVSEWHDKRPQLPYEIDGIVIKVDSFAQQ RALGATAKSPRWAIAYKFPAEEVVTTLIGIEVNVGRTGVVTP TAILEPVRVAGTTVQRATLHNEDFIREKDIRIGDAVIIKKAGDI IPEVVGVVVDRRDGDETPFAMPTHCPECESELVRLEGEVALR CLNPNCPAQLRERLIHFASRAAMNIEGLGEKVVTQLFNAGLV RDVADLYCLTKEQLVGLERMGEKSAANLLAAIEASKQNSLE RLLFGLGIRYVGAKAAQLLAEHFETMERLERATKEELMAVP EIGEKMADAITAFFAQPEATELLQELRAYGVNMAYKGPKRS AEAPADSAFAGKTVVLTGKLASMSRNEAKEQIERLGGRVTG SVSRSTDLVIAGEDAGSKLEKAQQLGIEIWDESRFLQEINRGK R	84

【表７－２０】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
Haemophilus influenzae Rd	MKFYRTLLLFFASSFAFANSDLMLLHTYNNQPIEGWVMSEK LDGVRGYWNGKQLLTRQGQRLSPPAYFIKDFPPFAIDGELFS ERNHFEEISTITKSFKGDGWEKLKLYVFDVPDAEGNLFERLA KLKAHLLEHPTTYIEIIEQIPVKDKTHLYQFLAQVENLQGEGV VVRNPNAPYERKRSSQILKLKTARGEECTVIAHHKGKGQFEN VMGALTCKNHRGEFKIGSGFNLNERENPPPIGSVITYKYRGIT NSGKPRFATYWREKK	85
Pseudoalteromonas haloplanktis	MSSSISEQVNHLRIILEQHNYNYYVLDTPSIPDSEYDRLLRELS ALETEHPEFLTADSPTQKVGGAALSKFEQVAHQVPMLSLDN AFSEEEFTAFNRRIKERLMSTDELTFCCEPKLDGLAVSIIYRD GVLVQAATRGDGFTGENITQNVKTIRNVPLKLRGDYPKELE VRGEVFMDSAGFDKLNTEAEKRGEKVFVNPRNAAAGSLRQ LDSKITAKRPLMFYAYSTGLVADGNIPEDHYQQLEKLTDWG LPLCPETKLVEGPKAALAYYRDILTRRSELKYEIDGVVIKINQ KTLQERLGFVARAPRWAIAYKFPAQEEITQLLDVDFQVGRTG AITPVARLKPVFVGGVTVSNATLHNSDEVARLGVKVGDTVII RRAGDVIPQITQVVLERRPDDARDIEFPTTCPICDSHVEKVEG EAVARCTGGLVCPAQRKQAIKHFASRKALDIDGLGDKIVDQ LVDRELIKTPADLFILKQGHFESLERMGPKSAKNLVTALEEA KGTTLAKFLYSLGIREAGEATAQNLANHFLTLENVINASIDSL TQVSDVGEIVAAHVRGFFDEEHNLAVVNALIDQGVNWPALS APSEEEQPLAGLTYVLTGTLNTLNRNDAKARLQQLGAKVSG SVSAKTDALVAGEKAGSKLTKAQDLGIDILTEDELIELLIKHN G	86

【表７－２１】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
Rhodothermus marinus	METHTAPQTAEARLLEATHTLLQTVRQRDLEAIDRKEAEAL AARLREVLNQHAYRYYVLDNPLIPDADYDLLMQALRKLEA RFPELVTPDSPTQRVGGPPLGRFEKVRHPEPLLSLNNAFGEED VRVWYERCCRMLAERLGQPVQPAVTAELKIDGLAMALTYE NGVLSVGATRGDGIEGENVTQNVRTIPAIPLRIPVDPAVGPPP TRLEVRGEVYMRKRDFERLNEQLQARGERPFANPRNAAAGS VRQLNPQVTALRPLSFFAYGIGPVEGAEVPDSQYEVLQWLG RLGFPVNEHARRFEHLDDVLEYCRYWTEHRDELDYEIDGVV LKIDHRPWQALLGAISNAPRWAVAYKFPAREAITRLLDIMVS VGRTGVVKPVAVLEPVEVGGVTVSQATLHNEDYVRSRDIRI GDLVVVIRAGDVIPQVVRPVVEARTGNERPWRMPERCPSCG SQLVRLPGEADYYCVASDCPAQFVRLLEHFAGRDAMDIEGM GSQVARQLAESGLVRPLSDLYRLKLEDLLKLEGFAETRARNL LRAIEASKQRPLSRLLFGLGIRHVGKTTAELLVQRFASIDELA AATIDELAALEGVGPITAESIANWFRVEDNRRLIEELKELGVN TQRLPEEAPAAESPVRGKTFVLTGALPHLTRKEAEELIKRAG GRVASSVSRNTDYVVVGENPGSKYDRARQLGIPMLDEDGLL RLLGMK	87
Thermus filiformis	MTREEARRRINELRDLIRYHNYRYYVLADPEISDAEYDRLLR ELKELEERFPEFKSPDSPTEQVGARPLEPTFRPVRHPTRMYSL DNAFTYEEVLAFEERLERALGRKRPFLYTVEHKVDGLSVNL YYEEGVLVFGATRGDGEVGEEVTQNLLTIPTIPRRLKGVPDR LEVRGEVYMPIEAFLRLNEELEERGEKVFKNPRNAAAGSLRQ KDPRVTAKRGLRATFYALGLGLEESGLKSQYELLLWLKEKG FPVEHGYEKALGAEGVEEVYRRFLAQRHALPFEADGVVVKL DDLALWRELGYTARAPRFALAYKFPAEEKETRLLDVVFQVG RTGRVTPVGVLEPVFIEGSEVSRVTLHNESYIEELDIRIGDWV LVHKAGGVIPEVLRVLKERRTGEERPIRWPETCPECGHRLVK EGKVHRCPNPLCPAKRFEAIRHYASRKAMDIEGLGEKLIERL LEKGLVRDVADLYHLRKEDLLGLERMGEKSAQNLLRQIEES KHRGLERLLYALGLPGVGEVLARNLARRFGTMDRLLEASLE ELLEVEEVGELTARAILETLKDPAFRDLVRRLKEAGVSMESK EEVSDLLSGLTFVLTGELSRPREEVKALLQRLGAKVTDSVSR KTSYLVVGENPGSKLEKARALGVAVLTEEEFWRFLKEKGAP VPA	88

【表７－２２】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
Thermus scotoductus	MTLEEARKRVNELRDLIRYHNYRYYVLADPEISDAEYDRLL RELKELEERFPELKSPDSPTEQVGAKPLEATFRPIRHPTRMYS LDNAFNFDELKAFEERIGRALGREGPFAYTVEHKVDGLSVNL YYEDGVLVWGATRGDGEVGEEVTQNLLTIPTIPRRVKGVPE RLEVRGEVYMPIEAFLRLNEELEEKGEKIFKNPRNAAAGSLR QKDPRITARRGLRATFYALGLGLEESGLKTQLDLLHWLREK GFPVEHGFARAEGAEGVERIYQGWLKERRSLPFEADGVVVK LDELSLWRELGYTARAPRFAIAYKFPAEEKETRLLQVVFQVG RTGRVTPVGILEPVFIEGSVVSRVTLHNESYIEELDVRIGDWV LVHKAGGVIPEVLRVLKEKRTGEERPIRWPETCPECGHRLVK EGKVHRCPNPLCPAKRFEAIRHYASRKAMDIGGLGEKLIEKL LEKGLVKDVADLYRLKKEDLLGLERMGEKSAQNLLRQIEES KGRGLERLLYALGLPGVGEVLARNLAAHFGTMDRLLEASLE ELLQVEEVGELTARGIYETLQDPAFRDLVRRLKEAGVVMEA KERGEEALKGLTFVITGELSRPREEVKALLRRLGAKVTDSVS RKTSYLVVGENPGSKLEKARALGVPTLTEEELYRLIEERTGK PVETLAS	89
Thermus種 AK16D	MTLEEARRRVNELRDLIRYHNYLYYVLDAPEISDAEYDRLLR ELKELEERFPELKSPDSPTEQVGARPLEATFRPVRHPTRMYSL DNAFSLDEVRAFEERIERALGRKGPFLYTVERKVDGLSVNLY YEEGILVFGATRGDGETGEEVTQNLLTIPTIPRRLTGVPDRLE VRGEVYMPIEAFLRLNQELEEAGERIFKNPRNAAAGSLRQKD PRVTARRGLRATFYALGLGLEETGLKSQHDLLLWLRERGFP VEHGFTRALGAEGVEEVYQAWLKERRKLPFEADGVVVKLD DLALWRELGYTARTPRFALAYKFPAEEKETRLLSVAFQVGR TGRITPVGVLEPVFIEGSEVSRVTLHNESFIEELDVRIGDWVL VHKAGGVIPEVLRVLKERRTGEEKPIIWPENCPECGHALIKEG KVHRCPNPLCPAKRFEAIRHYASRKAMDIQGLGEKLIEKLLE KGLVRDVADLYRLKKEDLVNLERMGEKSAENLLRQIEESKG RGLERLLYALGLPGVGEVLARNLALRFGHMDRLLEAGLEDL LEVEGVGELTARAILNTLKDPEFRDLVRRLKEAGVEMEAKE REGEALKGLTFVITGELSRPREEVKALLRRLGAKVTDSVSRK TSFLVVGENPGSKLEKARALGVPTLSEEELYRLIEERTGKDPR ALTA	90

【表７－２３】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
Thermus thermophilus HB8	MTLEEARKRVNELRDLIRYHNYRYYVLADPEISDAEYDRLL RELKELEERFPELKSPDSPTLQVGARPLEATFRPVRHPTRMYS LDNAFNLDELKAFEERIERALGRKGPFAYTVEHKVDGLSVNL YYEEGVLVYGATRGDGEVGEEVTQNLLTIPTIPRRLKGVPER LEVRGEVYMPIEAFLRLNEELEERGERIFKNPRNAAAGSLRQ KDPRITAKRGLRATFYALGLGLEEVEREGVATQFALLHWLK EKGFPVEHGYARAVGAEGVEAVYQDWLKKRRALPFEADGV VVKLDELALWRELGYTARAPRFAIAYKFPAEEKETRLLDVV FQVGRTGRVTPVGILEPVFLEGSEVSRVTLHNESYIEELDIRIG DWVLVHKAGGVIPEVLRVLKERRTGEERPIRWPETCPECGH RLLKEGKVHRCPNPLCPAKRFEAIRHFASRKAMDIQGLGEKL IERLLEKGLVKDVADLYRLRKEDLVGLERMGEKSAQNLLRQ IEESKKRGLERLLYALGLPGVGEVLARNLAARFGNMDRLLE ASLEELLEVEEVGELTARAILETLKDPAFRDLVRRLKEAGVE MEAKEKGGEALKGLTFVITGELSRPREEVKALLRRLGAKVT DSVSRKTSYLVVGENPGSKLEKARALGVPTLTEEELYRLLEA RTGKKAEELV	91
Zymomonas mobilis	MNADIDLFSYLNPEKQDLSALAPKDLSREQAVIELERLAKLIS HYDHLYHDKDNPAVPDSEYDALVLRNRRIEQFFPDLIRPDSP SKKVGSRPNSRLPKIAHRAAMLSLDNGFLDQDVEDFLGRVR RFFNLKENQAVICTVEPKIDGLSCSLRYEKGILTQAVTRGDG VIGEDVTPNVRVIDDIPKTLKGDNWPEIIEIRGEVYMAKSDFA ALNARQTEENKKLFANPRNAAAGSLRQLDPNITARRSLRFLA HGWGEATSLPADTQYGMMKVIESYGLSVSNLLARADDIGQ MLDFYQKIEAERADLDFDIDGVVYKLDQLDWQQRFGFSARA PRFALAHKFPAEKAQTTLLDIEIQVGRTGVLTPVAKLEPVTV GGVVVSSATLHNSDEIERLGVRPGDRVLVQRAGDVIPQIVEN LTPDVDRPIWRFPHRCPVCDSVARREEGEVAWRCTGGLICPA QRVERLCHFVSRTAFEIEGLGKSHIESFFADKLIETPADIFRLF QKRQLLIEREGWGELSVDNLISAIDKRRKVPFDRFLFALGIRH VGAVTARDLAKSYQTWDNFKAAIDEAAHLRTILQPSSEESEE KYQKRVDKELISFFHIPNMGGKIIRSLLDFFAETHNSDVVSDL LQEVQIEPLYFELASSPLSGKIIVFTGSLQKITRDEAKRQAENL GAKVASSVSKKTNLVVAGEAAGSKLSKAKELDISIIDEDRWH RIVENDGQDSIKI	92

【表７－２４】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
Campylobacter jejuni	MKKEEYLEKVALANLWMRAYYEKDEPLASDEEYDVLIREL RVFEEQNKDEISKDSPTQKIAPTIQSEFKKIAHLKRMWSMED VFDESELRAWAKRAKCEKNFFIEPKFDGASLNLLYENGKLVS GATRGDGEVGEDITLNVFEIENIPKNIAYKERIEIRGEVVILKD DFEKINEKRALLNQSLFANPRNAASGSLRQLDTSITKERNLKF YPWGVGENTLNFTKHSEVMQFIRELGFLKDDFIKLCANLDEV LKAYDELLALREKKPMMMDGMVVRIDDLALCEELGYTVKF PKFMAAFKFPALEKTTRLIGVNLQVGRSGVITPVAVLEPVNL DGVVVKSATLHNFDEIARLDVKINDFVSVIRSGDVIPKITKVF KDRREGLEMEISRPKLCPTCQSELLDEGTLIKCQNIDCEDRLV NSIIHFVSKKCLNIDGLGENIVELLYKHKKITTLESIFHLKFSDF EGLEGFKEKKINNLLNAIEQARECELFRFITALGIEHIGEVAAK KLSLSFGKEWHKQSFEAYANLEGFGEQMALSLCEFTRVNHV RIDEFYKLLNLKIEKLEIKSDGVIFGKTFVITGTLSRPRDEFKA LIEKLGGKVSSSVSKKTDYVLFGEEAGSKLIKAKELEVKCIDE SAFNELVKE	93
Mycobacterium tuberculosis ligA	MSSPDADQTAPEVLRQWQALAEEVREHQFRYYVRDAPIISD AEFDELLRRLEALEEQHPELRTPDSPTQLVGGAGFATDFEPV DHLERMLSLDNAFTADELAAWAGRIHAEVGDAAHYLCELKI DGVALSLVYREGRLTRASTRGDGRTGEDVTLNARTIADVPE RLTPGDDYPVPEVLEVRGEVFFRLDDFQALNASLVEEGKAPF ANPRNSAAGSLRQKDPAVTARRRLRMICHGLGHVEGFRPAT LHQAYLALRAWGLPVSEHTTLATDLAGVRERIDYWGEHRH EVDHEIDGVVVKVDEVALQRRLGSTSRAPRWAIAYKYPPEE AQTKLLDIRVNVGRTGRITPFAFMTPVKVAGSTVGQATLHN ASEIKRKGVLIGDTVVIRKAGDVIPEVLGPVVELRDGSEREFI MPTTCPECGSPLAPEKEGDADIRCPNARGCPGQLRERVFHVA SRNGLDIEVLGYEAGVALLQAKVIADEGELFALTERDLLRTD LFRTKAGELSANGKRLLVNLDKAKAAPLWRVLVALSIRHVG PTAARALATEFGSLDAIAAASTDQLAAVEGVGPTIAAAVTE WFAVDWHREIVDKWRAAGVRMVDERDESVPRTLAGLTIVV TGSLTGFSRDDAKEAIVARGGKAAGSVSKKTNYVVAGDSPG SKYDKAVELGVPILDEDGFRRLLADGPASRT	94

【表７－２５】

名称	リガーゼポリペプチド配列	配列番号
Emiliania huxleyi ウイルスDNAリガーゼ	MEAMCTECEDRDARLDVIDIQLFHALNPKSCNRTTWEQVPKI MGKQGDFVAEGKLDGERDASHLYGESMEDVLCECVREDVT SLLLDGEMMVVDLETGRYLPFGENRSLKDFGTSMRHCFVAF DLLLYNGRSMTGATLAERSELLRKAVRTKQHALTLIERFEVG ERGAGATTAVMRQLDVMMSRGLEGVVFKSLSSKYDPGSRD KSWIKLKPDFVDGMGDTLDLLILGGYYGEGRRRSGAVSTFL MGVRAPPEAAKRVGGAAHPLFYPFCKVGTGYSLPQLRELRE RLMPASLTRRRGNALGHGASLTAVSCEQVSHEWKNSRRPAH LCHWEPSKRDDIPDYWFEPEASVVLELTAFEIITPRESFLPAN YTLRFPRVVKRVRYDKGWEGAETFERVVELFKECDGRLSANK RRAEEIAASRASAGPAAKKRAAGVAPTVGVPWHLKLSADLA NTAVECYALDGVVAVVKGTLSRRPGVETQIKRLGGKVHKN MTSLTTHLVDAPGAEVLAEVERARRGGGSFEVVTAAWVDE CSRVHARVTLEPRYVRHVSEATREQIEAIMDEWGDNYTIAA DPESLVDSMRLVREQRSAGGNCGDSPLAREAHVADALRDLD DETAVALRTRYAMLRGVVAYVPRGSVALRLRLRLLGAQTV DEPSADSTHAVLSASTSADERQRLRDKFTEDRVRDGRPSCGR HIVSDRWLAECERRGQREPEAQEDAWFGDRVGIRDRAL	95
Lymantria dispar マルチカプシド核多角体病ウイルス	MENHDSFYKFCQLCQSLYDADDHQEKRDALERHFADFRGS AFMWRELLAPAESDAAADRELTLIFETILSIERTEQENVTRNL KCTIDGAAVPLSRESRITVPQVYEFINDLRGSGSRQERLRLIG QFAAGCTDEDLLTVFRVVSDHAHAGLSAEDVMELVEPWERF QKPVPPALAQPCRRLASVLVKHPEGALAEVKYDGERVQVHK AGSRFKFFSRTLKPVPEHKVAGCREHLTRAFPRARNFILDAEI VMVDGSGEALPFGTLGRLKQMEHADGHVCMYIFDCLRYNG VSYLNATPLDFRRRVLQDEIVPIEGRVVLSAMERTNTLSELRR FVHRTLATGAEGVVLKGRLSSYAPNKRDWFKMKKEHLCDG ALVDTLDLVVLGAYYGTGRNCRKMSVFLMGCLDRESNVWT TVTKVHSGLADAALTALSKELRPLMAAPRDDLPEWFDCNES MVPHLLAADPEKMPVWEIACSEMKANIGAHTAGVTMRFPR VKRFRPDKDWSTATDLQEAEQLIRNSQENTKKTFARLATTY DGPSPNKKLKLN	96

【００６８】

いくつかの態様は、ＤＮＡスプリントに対合したＤＮＡ鎖塩基をライゲーションするＤＮＡリガーゼを含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡリガーゼは、ＲＮＡスプリントに対合したＤＮＡ鎖塩基をライゲーションする。いくつかの実施形態では、ＤＮＡリガーゼは、配列番号５５～９６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列と少なくとも８０％同一のアミノ酸配列、またはその機能的断片を含む。

【００６９】

いくつかの態様では、リガーゼは、少なくとも１つのＮＬＳ（例えば、表２のＮＬＳのうちのいずれか１つ）を含む。いくつかの態様では、リガーゼは、少なくとも１つの追加のドメインを含む。いくつかの態様では、少なくとも１つの追加のドメインは、二量体化ドメイン（例えば、表３の二量体化ドメインのうちのいずれか１つ）である。いくつかの

態様では、二量体化ドメインを含むリガーゼは、エンドヌクレアーゼで二量体化されて、ヘテロ二量体を形成することができる。いくつかの態様では、少なくとも１つの追加のドメインは、機能ドメインである。例えば、機能ドメインは、クロマチン修飾ドメイン（例えば、表４のクロマチン修飾ドメインのうちのいずれか１つ）または細胞透過性ペプチド（例えば、表５の細胞透過性ペプチドのうちのいずれか１つ）を含むことができる。いくつかの態様では、リガーゼは、リンカーを含み、当該リンカーは、リガーゼを別のポリペプチド（例えば、エンドヌクレアーゼ）と共有結合的に接続させることができる。いくつかの態様では、リンカーは、リガーゼを少なくとも１つの追加のドメインに共有結合的に接続する。いくつかの態様では、リガーゼは、タグ（例えば、表６のタグのうちのいずれか１つ）を含み、タグは、リガーゼの発現を増加させる、同定する、または精製するために使用され得る。リンカーは、リガーゼを核局在化シグナル、クロマチン修飾ドメイン、細胞透過性ペプチド、またはタグポリペプチドから分離してもよい。本明細書に記載の任意のリンカーが含まれ得る。

【００７０】

リガーゼは、核酸モチーフ（例えば、ヘアピンモチーフ）に結合するための結合モチーフを含み得る。いくつかの態様では、リガーゼ（例えば、ＤＮＡリガーゼ）は、ＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）ペプチドを含む。リガーゼは、ＭＣＰペプチドなどのヘアピン結合モチーフを含み得る。ＭＣＰペプチドは、リガーゼを、ＭＳ２ヘアピンを含むガイド核酸に動員するために有用であり得る。ＭＣＰペプチド及びＭＳ２ヘアピンを使用する利点は、Ｃａｓニッカーゼ（またはそれらの一部）などのリガーゼ及びエンドヌクレアーゼを分離し、ＡＡＶベクターなどの別個のベクター内での適合を可能にすることである。いくつかの態様では、リガーゼは、ループ領域を含む。いくつかの態様では、ループ領域は、２ａループまたは３ａループである。ループ領域は、２ａループを含み得る。ループ領域は、３ａループを含み得る。

【００７１】

融合タンパク質

本明細書に開示されるのは、融合タンパク質である。いくつかの態様は、融合タンパク質をコードする核酸（例えば、発現ベクター）を含む。融合タンパク質は、エンドヌクレアーゼを含み得る。融合タンパク質は、リガーゼを含み得る。融合タンパク質は、リンカーを含み得る。エンドヌクレアーゼ及びリガーゼは、リンカーを介して接続され得る。融合タンパク質は、共有結合的にカップリングされたエンドヌクレアーゼ及びＤＮＡリガーゼの一例であり得る。融合タンパク質は、ＤＮＡリガーゼに融合したＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼを含み得る。

【００７２】

融合タンパク質は、非天然に存在し得る。融合タンパク質は、操作され得る。融合タンパク質は、合成され得る。融合タンパク質は、予備合成され得る。融合タンパク質は、対象または細胞に付加され得る。融合タンパク質は、核酸によってコードされ得る。コード核酸は、操作され得るか、合成され得るか、または対象もしくは細胞に付加され得る。

【００７３】

融合タンパク質は、様々な配向のうちの１つを含み得る。例えば、融合タンパク質は、ＤＮＡリガーゼに対して上流（例えば、Ｎ末端もしくはＮ方向）または下流（例えば、Ｃ末端もしくはＣ方向）のＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含んでもよい。融合タンパク質は、ＤＮＡリガーゼに対してＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼアミノ（Ｎ）末端を含み得る。融合タンパク質は、ＤＮＡリガーゼに対してＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼカルボキシ（Ｃ）末端を含み得る。エンドヌクレアーゼは、リガーゼに対して融合ポリペプチド内のアミノ方向にあり得る。エンドヌクレアーゼは、リガーゼに対して融合ポリペプチド内のカルボキシ方向にあり得る。エンドヌクレアーゼは、Ｎ末端であり得る。エンドヌクレアーゼは、Ｃ末端であり得る。リガーゼは、Ｎ末端であり得る。リガーゼは、Ｃ末端であり得る。

【００７４】

融合タンパク質は、核局在化シグナル、クロマチン修飾ドメイン、細胞透過性ペプチド、タグポリペプチド、またはエキソヌクレアーゼを含み得る。融合タンパク質は、核局在化シグナルを含み得る。融合タンパク質は、クロマチン修飾ドメインを含み得る。融合タンパク質は、細胞透過性ペプチドを含み得る。融合タンパク質は、タグポリペプチドを含み得る。融合タンパク質は、エキソヌクレアーゼを含み得る。核局在化シグナル、クロマチン修飾ドメイン、細胞透過性ペプチド、タグポリペプチド、またはエキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、またはリガーゼのうちのいずれかは、別のもの、またはエンドヌクレアーゼもしくはリガーゼに直接接続され得る。核局在化シグナル、クロマチン修飾ドメイン、細胞透過性ペプチド、タグポリペプチド、またはエキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、またはリガーゼのうちのいずれかは、リンカーによって別のものに、またはエンドヌクレアーゼもしくはリガーゼに接続され得る。複数のリンカーが、融合タンパク質に含まれ得る。融合タンパク質は、ポリメラーゼを除外し得る。

【００７５】

リンカーは、アミノ酸リンカーを含み得る。アミノ酸リンカーは、残基の長さを含み得る。長さは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、もしくは１００個の残基、または前述の整数のうちのいずれか２つによって画定される残基の範囲を含み得る。長さは、少なくとも１個の残基、少なくとも２個の残基、少なくとも３個の残基、少なくとも４個の残基、少なくとも５個の残基、少なくとも６個の残基、少なくとも７個の残基、少なくとも８個の残基、少なくとも９個の残基、少なくとも１０個の残基、少なくとも１５個の残基、少なくとも２０個の残基、少なくとも２５個の残基、少なくとも３０個の残基、少なくとも４０個の残基、少なくとも５０個の残基、少なくとも６０個の残基、少なくとも７０個の残基、少なくとも８０個の残基、少なくとも９０個の残基、または少なくとも１００個の残基を含み得る。いくつかの態様では、長さは、２個未満の残基、３個未満の残基、４個未満の残基、５個未満の残基、６個未満の残基、７個未満の残基、８個未満の残基、９個未満の残基、１０個未満の残基、１５個未満の残基、２０個未満の残基、２５個未満の残基、３０個未満の残基、４０個未満の残基、５０個未満の残基、６０個未満の残基、７０個未満の残基、８０個未満の残基、９０個未満の残基、または１００個未満の残基を含み得る。残基の例としては、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、もしくはバリン、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。リンカーは、非酵素的であり得るか、または任意の酵素活性を欠き得る。

【００７６】

接続は、共有結合であり得る。共有結合は、ペプチド結合を含み得る。ペプチド結合は、アミド結合を含み得る。接続は、Ｎ末端と別のＮ末端との間にあり得る。接続は、Ｃ末端と別のＣ末端との間にあり得る。接続は、Ｎ末端とＣ末端との間にあり得る。接続は、Ｃ末端とＮ末端との間にあり得る。

【００７７】

融合タンパク質は、様々な配向の接続を含み得る。エンドヌクレアーゼは、そのＣ末端で接続され得る。エンドヌクレアーゼは、そのＮ末端で接続され得る。リガーゼは、そのＣ末端で接続され得る。リガーゼは、そのＮ末端で接続され得る。

【００７８】

図７は、融合タンパク質のいくつかの例を示す。図は、エンドヌクレアーゼ、リンカー、リガーゼ、または核局在化シグナルの配置及び配向の例を含む。他の態様が、示される例に組み込まれ得る。

【００７９】

非共有結合的にカップリングされたタンパク質

本明細書に開示されるのは、非共有結合的にカップリングされたタンパク質である。いくつかの態様は、タンパク質をコードする、またはタンパク質の少なくとも一部をコード

する核酸（例えば、発現ベクター）に関する。タンパク質は、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼを含み得る。非共有結合的にカップリングされたタンパク質のタンパク質は、エンドヌクレアーゼの一部を含み得る。非共有結合的にカップリングされたタンパク質のタンパク質は、リガーゼの一部を含み得る。タンパク質は、ＤＮＡリガーゼなどのリガーゼを含み得る。非共有結合的にカップリングされたタンパク質のタンパク質は、融合タンパク質を含み得る。

【００８０】

非共有結合的にカップリングされたタンパク質は、ヘテロ二量体化ドメインを通して一緒に結合され得る。ヘテロ二量体化ドメインの例には、ロイシンジッパー、ＰＤＺドメイン、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン結合タンパク質、フォールドンドメイン、疎水性部分、またはそれらの機能的結合断片が含まれ得る。ヘテロ二量体化ドメインは、ロイシンジッパーを含み得る。ヘテロ二量体化ドメインは、ＰＤＺドメインを含み得る。ヘテロ二量体化ドメインは、ストレプトアビジンを含み得る。ヘテロ二量体化ドメインは、ストレプトアビジン結合タンパク質を含み得る。ヘテロ二量体化ドメインは、フォールドンドメインを含み得る。ヘテロ二量体化ドメインは、疎水性部分を含み得る。ヘテロ二量体化ドメインは、抗体または抗体断片を含み得る。非共有結合的にカップリングされたタンパク質は、インテインを通して一緒に結合され得る。

【００８１】

エンドヌクレアーゼ及びリガーゼは、別個の分子によって一緒にカップリングされ得る。別個の分子は、核酸（例えば、ガイド核酸）を含み得る。リガーゼは、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ及びＤＮＡリガーゼが核酸とカップリングされているヘアピン結合モチーフを含み得る。核酸は、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼに結合する足場、及びヘアピン結合モチーフに結合するヘアピンを含み得る。ヘアピン結合モチーフは、ＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）ペプチドを含み得る。ヘアピンは、ＭＳ２ヘアピンを含み得る。

【００８２】

エンドヌクレアーゼ及びリガーゼは、ヘテロ二官能性分子によって一緒にカップリングされ得る。ヘテロ二官能性分子は、エンドヌクレアーゼ結合ドメイン及びＤＮＡリガーゼ結合ドメインを含み得る。ヘテロ二官能性分子は、エンドヌクレアーゼ結合ドメインを含み得る。エンドヌクレアーゼ結合ドメインは、ヘテロ二量体化ドメインを含み得る。エンドヌクレアーゼ結合ドメインは、抗体または抗体結合断片を含み得る。ヘテロ二官能性分子は、ＤＮＡリガーゼ結合ドメインなどのリガーゼ結合ドメインを含み得る。ＤＮＡリガーゼ結合ドメインは、ヘテロ二量体化ドメインを含み得る。ＤＮＡリガーゼ結合ドメインは、抗体または抗体結合断片を含み得る。ヘテロ二官能性分子は、小分子を含み得る。小分子は、キメラを標的とするタンパク質分解（ＰＲＯＴＡＣ）、または関連するヘテロ二官能性分子を含み得る。

【００８３】

いくつかの態様は、ＤＮＡリガーゼに結合したＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含む、タンパク質複合体を含む。エンドヌクレアーゼ及びＤＮＡリガーゼは、ヘテロ二量体化ドメインを通して一緒に結合され得る。ヘテロ二量体化ドメインが、ロイシンジッパー、ＰＤＺドメイン、ストレプトアビジン及びストレプトアビジン結合タンパク質、フォールドンドメイン、疎水性ポリペプチド、Ｃａｓニッカーゼに結合する抗体、またはＤＮＡリガーゼに結合する抗体、またはその１つ以上の結合断片を含み得る、実施形態７５に記載のタンパク質複合体。タンパク質複合体は、細胞内に含まれ得る。細胞は、異種ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ、及び細胞に導入されたＤＮＡリガーゼを更に含み得る。細胞は、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼとは異なるヌクレアーゼを更に含み得る。

【００８４】

ガイド核酸

本明細書に開示されるのは、ガイド核酸である。ガイド核酸は、本明細書に開示される組成物、システムまたは方法に含まれ得る。いくつかの態様は、ガイドＲＮＡなどのガイド核酸をコードする核酸（例えば、ＤＮＡまたは発現ベクター）に関する。本明細書で提

供されるのは、プログラム可能なエンドヌクレアーゼ（例えば、ｎＣａｓ９）を標的核酸（例えば、ゲノム遺伝子座）に向けるガイド核酸（例えば、ｇＲＮＡ）である。ガイド核酸は、遺伝子座での核酸置き換えまたは遺伝子編集のために、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを標的核酸遺伝子座に誘導し得る。本開示のガイド核酸は、ドナー鎖が標的核酸の標的部位に挿入されることを容易にし得る。本開示のガイド核酸は、標的核酸の標的部位における核酸配列の編集を容易にし得る。ガイド核酸は、場合によっては、ガイド核酸の一部に対合した２つの核酸鎖塩基をライゲーションするためなど、本明細書に記載のＤＮＡリガーゼのスプリントとしても機能し得る。ガイド核酸は、一本鎖であり得る。ガイド核酸は、ＲＮＡを含み得る。ガイド核酸は、ＲＮＡであり得る。ガイド核酸は、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含み得る。場合によっては、ガイド核酸は、ＤＮＡを含み得る。

【００８５】

ガイド核酸は、非天然に存在し得る。ガイド核酸は、操作され得る。ガイド核酸は、合成であり得る。ガイド核酸は、予備合成され得る。ガイド核酸は、対象または細胞に付加され得る。いくつかの態様では、ガイド核酸は、ポリメラーゼのテンプレートを含まない。

【００８６】

ガイド核酸は、組み込み核酸結合部位を含み得る。組み込み核酸結合部位は、「ドナー結合部位」と称され得る。

【００８７】

本明細書に開示されるのは、標的核酸の第１の領域に逆相補的なスペーサーと、エンドヌクレアーゼに結合するように構成された足場と、組み込み核酸結合部位及び任意選択で核酸フラップに逆相補的なフラップ結合部位を含む、ガイド核酸である。

【００８８】

いくつかの態様では、ガイド核酸は、細胞内のゲノム遺伝子座に相補的なスペーサー、少なくとも１つのエンドヌクレアーゼと複合体化するための足場、ドナー鎖に少なくとも部分的に相補的であるドナー結合部位、ゲノム遺伝子座における、もしくはそれに隣接するゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的であるフラップ結合部位、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの態様では、ガイド核酸は、少なくとも１つのエンドヌクレアーゼに、ゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断するように指示することができる。いくつかの態様では、ガイド核酸は、ドナー鎖に少なくとも部分的に相補的であり得るか、またはゲノムフラップ（例えば、ガイド核酸がエンドヌクレアーゼをゲノム遺伝子座に動員するときに、移動され、一本鎖になるゲノム核酸配列）に少なくとも部分的に相補的であり得る。いくつかの態様では、ドナー鎖に少なくとも部分的に相補的であるか、またはゲノムフラップに少なくとも部分的に相補的であるガイド核酸は、ドナー鎖をゲノム遺伝子座の切断に近接させる。

【００８９】

本明細書に開示されるのは、いくつかの実施形態では、足場を含むガイド核酸である。足場は、ヌクレアーゼに結合し得る。足場は、ＣａｓヌクレアーゼまたはＣａｓニッカーゼに結合し得る。足場は、ＣａｓニッカーゼまたはＣａｓニッカーゼに結合し得る。足場は、Ｓ．Ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９ヌクレアーゼに結合し得る。足場は、Ｓ．Ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９ニッカーゼに結合し得る。足場は、足場核酸配列を含み得る。本明細書に記載のシステムは、第１のガイド核酸を含み得る。システムは、第２のガイド核酸を含むことができる。第１のガイド核酸は、第１のＣａｓニッカーゼに結合し得る。第２のガイド核酸は、第２のＣａｓニッカーゼに結合し得る。

【００９０】

ガイド核酸は、（ｉ）～（ｉｖ）のうちのいずれかの態様を含み得る。（ｉ）ゲノム鎖のゲノム遺伝子座の領域に相補的なスペーサー、（ｉｉ）ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと複合体化するための足場、（ｉｉｉ）組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的であるドナー結合部位、または（ｉｖ）ゲノム遺伝子座における、またはそれに隣接するゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的であるフラップ結合部位。ガイド核酸

は、（ｉ）～（ｉｉｉ）の任意の態様を含み得る。（ｉ）ゲノム鎖のゲノム遺伝子座の領域に相補的なスペーサー、（ｉｉ）ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと複合体化するための足場、または（ｉｉｉ）スプリント核酸に少なくとも部分的に相補的であるドナー結合部位。（ｉ）、（ｉｉ）、または（ｉｉｉ）の構成要素は、単一のガイド核酸に含まれ得るか、または複数のガイド核酸の間で分割され得るか、もしくは複数のガイド核酸の中にまとめて含まれ得る。

【００９１】

いくつかの態様では、ガイド核酸は、修飾ヌクレオシド間結合を含む。いくつかの態様では、修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合を含む。いくつかの態様では、修飾ヌクレオシド間結合は、ガイド核酸の５’末端または３’末端における４つの末端ヌクレオシドのうちのいずれかの間である。ガイド核酸は、複数の修飾ヌクレオシド間結合を含み得る。例えば、ガイド核酸は、ガイド核酸の５’末端及び３’末端の核酸、例えば、５’末端の最後の４つの核酸間、及び３’末端の最後の４つの核酸間の修飾ヌクレオシド間結合を含み得る。いくつかの態様では、ガイド核酸は、修飾ヌクレオシドを含む。いくつかの態様では、修飾ヌクレオチドは、ロックド核酸（ＬＮＡ）、２’フルオロ、２’Ｏ－アルキル、またはそれらの組み合わせを含む。修飾ヌクレオシドは、ＬＮＡ、２’フルオロ、２’Ｏ－アルキル、メチル化シトシン、反転チミジン、またはそれらの組み合わせを含み得る。修飾ヌクレオシドは、ＬＮＡを含み得る。修飾ヌクレオシドは、２’フルオロを含み得る。修飾ヌクレオシドは、２’Ｏ－アルキルを含み得る。修飾ヌクレオシドは、メチル化シトシンを含み得る。いくつかの態様では、修飾ヌクレオシドは、ガイド核酸の５’末端または３’末端における３末端ヌクレオシドのうちのいずれかである。ガイド核酸は、複数の修飾ヌクレオシドを含み得る。例えば、ガイド核酸は、５’末端における最後の３つの核酸及び３’末端における最後の３つの核酸など、ガイド核酸の５’末端及び３’末端の核酸における修飾ヌクレオチドを含み得る。

【００９２】

いくつかの態様では、ガイド核酸は、少なくとも１つの核酸修飾を含む。いくつかの態様では、少なくとも核酸修飾は、ガイド核酸の骨格、糖、塩基、またはそれらの組み合わせを修飾することを含む。いくつかの態様では、少なくとも１つの核酸修飾は、分解に対する（例えば、ヌクレアーゼ分解または加水分解に対する）ガイド核酸の耐性を増加させることができる。いくつかの態様では、少なくとも１つの核酸修飾は、少なくとも１つのエンドヌクレアーゼに対するガイド核酸の複合体化を増加させることができる。いくつかの態様では、少なくとも１つの核酸修飾は、ドナー鎖に対するガイド核酸の複合体化を増加させることができる。いくつかの態様では、少なくとも１つの核酸修飾は、ゲノムフラップに相補的であることによって、ゲノム遺伝子座へのガイド核酸の複合体化を増加させることができる。

【００９３】

いくつかの態様では、ガイド核酸は、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、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０またはそれ以上の核酸修飾を含む。いくつかの態様では、核酸修飾は、３’ＯＨ基、５’ＯＨ基、骨格、糖成分、またはヌクレオチド塩基において起こり得る。核酸修飾は、鎖間または鎖内架橋の非天然に存在するリンカー分子を含み得る。一態様では、修飾核酸は、３’ＯＨまたは５’ＯＨ基、骨格、糖成分、もしくはヌクレオチド塩基のうちの１つ以上の修飾、または非天然に存在するリンカー分子の付加を含む。いくつかの態様において、修飾骨格は、ホスホジエステル骨格以外の骨格を含む。いくつかの態様では、修飾糖は、（修飾ＤＮＡ中の）デオキシリボース以外の糖、または（修飾ＲＮＡ中の）リボース以外の糖を含む。いくつかの態様では、修飾塩基は、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、またはウラシル以外の塩基を含む。いくつかの態様では、ガイド核酸は、少なくとも１つの修飾塩基を含む。いくつかの例では、ガイド核酸は、少なくとも１、２、３、４

、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、またはそれ以上の修飾塩基を含む。場合によっては、塩基部分に対する核酸修飾は、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、またはウラシルの天然及び合成修飾、及びプリンまたはピリミジン塩基を含む。

【００９４】

いくつかの態様では、ガイド核酸の少なくとも１つの核酸修飾は、以下のうちのいずれか１つまたはいずれかの組み合わせの修飾を含む：２’－Ｏ－メチル、２’－Ｏ－メトキシエチル（２’－Ｏ－ＭＯＥ）、２’－Ｏ－アミノプロピル、２’－デオキシ、２’－デオキシ－２’－フルオロ、２’－Ｏ－アミノプロピル（２’－Ｏ－ＡＰ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＯＥ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノプロピル（２’－Ｏ－ＤＭＡＰ）、２’－Ｏ－ジメチルアミノエチルオキシエチル（２’－Ｏ－ＤＭＡＥＯＥ）、もしくは２’－Ｏ－Ｎ－メチルアセトアミド（２’－Ｏ－ＮＭＡ）を含む２’修飾ヌクレオチド；ホスホジエステル骨格結合における非結合リン酸酸素の一方または両方の修飾；ホスホエステル骨格結合における結合リン酸酸素のうちの１つ以上の修飾；リボース糖の構成要素の修飾；「デホスホ」リンカーによるリン酸部分の置き換え；天然に存在する核酸塩基の修飾または置き換え；リボース－リン酸化骨格の修飾；ポリヌクレオチドの５’末端の修飾；ポリヌクレオチドの修飾；ポリヌクレオチドの３’末端の修飾；デオキシリボースリン酸骨格の修飾；リン酸基の置換；リボリン酸骨格の修飾；ヌクレオチドの糖の修飾；ヌクレオチドの塩基の修飾；またはヌクレオチドの立体純粋。ガイド核酸に対する核酸修飾の非限定的な例としては、ホスホジエステル骨格結合（例えば、硫黄（Ｓ）、セレン（Ｓｅ）、ＢＲ３（式中、Ｒは、例えば、水素、アルキル、もしくはアリールであり得る）、Ｃ（例えば、アルキル基、アリール基など）、Ｈ、ＮＲ２（式中、Ｒは、例えば、水素、アルキル、もしくはアリールであり得る）、または式中、Ｒは、例えば、アルキルもしくはアリールであり得る）の非結合または結合リン酸オキシゲンの一方または両方の修飾；「デホスホ」リンカーによるリン酸部分の置き換え（例えば、メチルホスホネート、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、またはメチレンオキシメチルイミノによる置き換え）；天然に存在する核酸塩基を核酸類似体で修飾または置き換え；デオキシリボース－リン酸またはリボース－リン酸骨格の修飾（例えば、リボース－リン酸骨格を修飾して、ホスホロチオエート、ホスホノチオアセテート、ホスホロセレン酸塩、ボラノホスフェート、ボラノリン酸エステル、リン酸水素、ホスホノカルボキシレート、ホスホロアミダート、アルキルもしくはアリールホスホネート、ホスホノアセテート、またはホスホトリエステル；核酸配列の５’末端（例えば、５’キャップもしくは５’キャップ－ＯＨの修飾）または３’末端（３’テールもしくは３’末端－ＯＨの修飾））の修飾；メチルホスホネート、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、またはメチレンオキシメチルイミノによるホスフェート基の置換；モルホリノ（ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマーＰＭＯ）、シクロブチル、ピロリジン、またはペプチド核酸（ＰＮＡ）ヌクレオシドサロゲートを組み込むためのリボホスフェート骨格の修飾；ロックド核酸（ＬＮＡ）、アンロックド核酸（ＵＮＡ）、エチレン核酸（ＥＮＡ）、制約エチル（ｃＥｔ）糖、または架橋核酸（ＢＮＡ）を組み込むためのヌクレオチドの糖に対する修飾；リボース糖（例えば、２’－Ｏ－メチル、２’－Ｏ－メトキシ－エチル（２’－ＭＯＥ）、２’－フルオロ、２’－アミノエチル、２’－デオキシ－２’－フロアラビ核酸（ｆｕｌｏａｒａｂｉｎｏｕ－ｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ）、２’－デオキシ、２’－Ｏ－メチル、３’－ホスホロチオエート、３’－ホスホノアセテート（ＰＡＣＥ）、または３’－ホスホノチオアセテート（ｔｈｉｏＰＡＣＥ））の構成要素の修飾；ヌクレオチド（Ａ、Ｔ、Ｃ、ＧもしくはＵ）の塩基に対する修飾；及びヌクレオチドの立体純粋

（例えば、ホスホロチオエートのＳコンフォメーションもしくはホスホロチオエートのＲコンフォメーション）。

【００９５】

いくつかの態様では、核酸修飾は、ガイド核酸のホスホジエステル骨格結合における非結合リン酸塩酸素原子のうちの１つまたは両方の少なくとも１つの置換を含む。いくつかの態様では、ガイド核酸の少なくとも１つの核酸修飾は、ガイド核酸のホスホジエステル骨格結合における結合リン酸塩酸素原子のうちの１つ以上の置換を含む。リン酸塩酸素原子の核酸修飾の非限定的な例は、硫黄原子である。いくつかの態様では、核酸修飾は、糖に対する少なくとも１つの修飾を含む。いくつかの態様では、核酸修飾は、糖の構成要素の修飾を含む糖に対する少なくとも１つの核酸修飾を含み、糖はリボース糖である。いくつかの態様では、ガイド核酸の核酸修飾は、２’－Ｏ－メチル基を含むガイド核酸のヌクレオチドのリボース糖の構成成分に対する少なくとも１つの修飾を含む。いくつかの態様では、核酸修飾は、ガイド核酸のリン酸塩部分をデホスホリンカーで置き換えることを含む、少なくとも１つの修飾を含む。いくつかの態様では、の核酸修飾は、リン酸塩骨格の少なくとも１つの修飾を含む。いくつかの態様では、修飾は、ホスホロチオエート基を含む。いくつかの態様では、核酸修飾は、ガイド核酸のヌクレオチドの塩基への修飾を含む少なくとも１つの修飾を含む。いくつかの態様では、核酸修飾は、ヌクレオチドの非天然塩基を含む少なくとも１つの修飾を含む。いくつかの態様では、核酸修飾は、少なくとも１つの立体純粋な核酸を含む少なくとも１つの修飾を含む。いくつかの態様では、少なくとも１つの核酸修飾は、ガイド核酸の５’末端の近位に位置付けることができる。いくつかの態様では、少なくとも１つの核酸修飾は、ガイド核酸の３’末端の近位に位置付けることができる。いくつかの態様では、少なくとも１つの核酸修飾は、ガイド核酸の５’末端及び３’末端の両方の近位に位置付けることができる。

【００９６】

いくつかの態様では、本明細書に記載のガイド核酸は、共有結合的に連結された複数の糖及びリン酸塩部分を含む骨格を含む。場合によっては、ガイド核酸の骨格は、ＤＮＡのデオキシリボースの５’炭素上のリン酸基の第１のヒドロキシル基またはＲＮＡのリボースと、ＤＮＡのデオキシリボースの３’炭素上の第２のヒドロキシル基またはＲＮＡのリボースとの間のホスホジエステル結合連結を含む。いくつかの態様では、ガイド核酸の骨格は、溶媒に曝露することができる５’還元ヒドロキシル、３’還元ヒドロキシル、または両方を欠き得る。いくつかの態様では、ガイド核酸の骨格は、ヌクレアーゼに曝露することができる５’還元ヒドロキシル、３’還元ヒドロキシル、または両方を欠き得る。いくつかの態様では、ガイド核酸の骨格は、加水分解酵素に曝露することができる５’還元ヒドロキシル、３’還元ヒドロキシル、または両方を欠き得る。いくつかの例では、ガイド核酸の骨格は、１つのヌクレオチドが他のヌクレオチドの後に続く、円形の二次元フォーマットのポリヌクレオチド配列として表され得る。いくつかの例では、ガイド核酸の骨格は、１つのヌクレオチドが他のヌクレオチドの後に続くループされた二次元フォーマットのポリヌクレオチド配列として表され得る。場合によっては、５’ヒドロキシル、３’ヒドロキシル、または両方は、リン－酸素結合を介して接合される。場合によっては、５’ヒドロキシル、３’ヒドロキシル、または両方は、リン含有部分を有するホスホエステルに修飾される。いくつかの態様では、ガイド核酸は、以下のうちのいずれか１つを含む、少なくとも１つの核酸修飾を含む：５’アデニレート、５’グアノシン－トリホスフェートキャップ、５’Ｎ７－メチルグアノシン－トリホスフェートキャップ、５’トリホスフェートキャップ、３’ホスフェート、３’チオホスフェート、５’ホスフェート、５’チオホスフェート、シス－シンチミジンダイマー、トリマー、Ｃ１２スペーサー、Ｃ３スペーサー、Ｃ６スペーサー、ｄＳｐａｃｅｒ、ＰＣスペーサー、ｒＳｐａｃｅｒ、スペーサー１８、スペーサー９、３’－３’修飾、５’－５’修飾、脱塩基性、アクリジン、アゾベンゼン、ビオチン、ビオチンＢＢ、ビオチンＴＥＧ、コレステリルＴＥＧ、デスチオビオチンＴＥＧ、ＤＮＰ　ＴＥＧ、ＤＮＰ－Ｘ、ＤＯＴＡ、ｄＴ－ビオチン、デュアルビオチン、ＰＣビオチン、ソラレンＣ２、ソラレンＣ６、ＴＩＮＡ、３’ＤＡＢＣＹＬ、ブラックホールクエン

チャー１、ブラックホールクエンチャー２、ＤＡＢＣＹＬ　ＳＥ、ｄＴ－ＤＡＢＣＹＬ、ＩＲＤｙｅ　ＱＣ－１、ＱＳＹ－２１、ＱＳＹ－３５、ＱＳＹ－７、ＱＳＹ－９、カルボキシルリンカー、チオールリンカー、２’デオキシリボヌクレオシド類似体プリン、２’デオキシリボヌクレオシド類似体ピリミジン、リボヌクレオシド類似体、２’－Ｏ－メチルリボヌクレオシド類似体、糖修飾類似体、ゆらぎ／ユニバーサル塩基、蛍光色素ラベル、２’フルオロＲＮＡ、２’Ｏ－メチルＲＮＡ、メチルホスホネート、ホスホジエステルＤＮＡ、ホスホジエステルＲＮＡ、ホスホチオエートＤＮＡ、ホスホロチオエートＲＮＡ、ＵＮＡ、ＬＮＡ、ｃＥｔ、プソイドウリジン－５’－トリホスフェート、５－メチルシチジン－５’－トリホスフェート、２－Ｏ－メチル－ホスホロチオエート、またはそれらの任意の組み合わせ。

【００９７】

核酸修飾はまた、ホスホロチオエート置換であり得る。場合によっては、天然のホスホジエステル結合は、細胞ヌクレアーゼによって急速に分解されやすいことがあり、ホスホロチオエート（ＰＳ）結合置換を使用するヌクレオチド間結合の修飾は、細胞分解による加水分解に対してより安定していることがある。修飾は、ポリ核酸における安定性を増加させることができる。修飾はまた、生物学的活性を増強することもできる。場合によっては、ホスホロチオエートで増強されたＲＮＡポリ核酸は、ＲＮａｓｅ　Ａ、ＲＮａｓｅ　Ｔ１、仔牛血清ヌクレアーゼ、またはそれらの任意の組み合わせを阻害することができる。これらの特性は、インビボまたはインビトロでヌクレアーゼに曝露される可能性が高い用途において、ＰＳ－ＲＮＡポリ核酸の使用を可能にすることができる。例えば、ホスホロチオエート（ＰＳ）結合を、ポリ核酸の５’または３’末端の最後の３～５つのヌクレオチド間に導入して、エキソヌクレアーゼ分解を阻害することができる。場合によっては、ホスホロチオエート結合は、エンドヌクレアーゼによる攻撃を低減するために、ポリ核酸全体にわたって付加され得る。いくつかの態様では、ガイド核酸は、ＰＳ結合を含む少なくとも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、５０、１００、またはそれ以上のヌクレオチド間結合を含む。いくつかの態様では、ガイド核酸は、ヌクレオチド間結合修飾としてＰＳ結合のみを含む。いくつかの態様では、本明細書におけるガイド核酸の全てのヌクレオチド間結合は、完全にＰＳ修飾されるか、またはホスホロチオエートヌクレオチド間結合を含む。

【００９８】

ガイド核酸は、ヘアピンを含み得る。ヘアピンは、ＤＮＡリガーゼ上のヘアピン結合モチーフなどのヘアピン結合モチーフに結合し得る。ヘアピンは、ＭＳ２ヘアピンなどのＭＳ２ヘアピンＡヘアピンを含み得るが、ＭＣＰペプチドを含むＤＮＡリガーゼを動員するのに有用であり得る。

【００９９】

ガイド核酸は、図１Ａ～６Ｃに含まれる任意の態様を含み得る。表８は、本明細書に記載のガイド核酸のうちのいくつかの非限定的な例を示す。表中のガイド核酸のうちのいくつかは、核酸修飾を含む。

【表８－１】

表８．核酸配列の例

名称	核酸配列(5’から3’へ)	配列番号
BFP	atggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgccGgtgccctggcccaccCTCgtgaccaccctgaccCATggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgccccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacaccccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccaagctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagTAA	97
Rep1.BFP.FwdGuide	mC*mU*mG*AAGUUCAUCUGCACCACGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCGUGGGCCAGGGCACCGGCAGCUUGCCGGUGGUGCAGAUGmA*mA*mC*U	98
Rep1.BFP.RevGuide	mG*mA*mC*GUAGCCUUCGGGCAUGGGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUGAAGCAGCACGACUUCUUCAAGUCCGCCAUGCCCGAAGmG*mC*mU*A	99
Rep1.BFP.FwdGuide.SpPAMmut	mC*mU*mG*AAGUUCAUCUGCACCACGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCGUGGGCCAGGGCACCGGCAGCUUGCCGGUUGUGCAGAUGmA*mA*mC*U	100
Rep1.BFP.RevGuide.SpPAMmut	mG*mA*mC*GUAGCCUUCGGGCAUGGGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUGAAGCAGCACGACUUCUUCAAGUCAGCCAUGCCCGAAGmG*mC*mU*A	101
Rep1.BFP 2GFP.Top Donor.5P	/5Phos/caccggcaagctgccGgtgccctggcccaccCTCgtgaccaccctgaccTACggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccaca	102
Rep1.BFP 2GFP.Bot Donor.5P	/5Phos/tggcggacttgaagaagtcgtgctgcttcatgtggtcggggtagcggctgaagcactgcacgccGTAggtcagggtggtcacGAGg	103
Rep1.BFP 2GFP.Top Donor.Recoded.5P	/5Phos/caccggcaagctgccGgtgccctggcccacTCTTGTGACCACCTTGACCtACGGTGTCCAGTGTTTTAGCAGGTATCCGGATCACA	104

【表８－２】

名称	核酸配列(5’から3’へ)	配列番号
Rep1.BFP2GFP.BotDonor.Recoded.5P	/5Phos/tggcggacttgaagaagtcgtgctgcttcaTGTGATCCGGATACCTGCTAAAACACTGGACACCGTaGGTCAAGGTGGTCACAAGA	105
Rep1.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.Recoded.5P	/5Phos/AaccggcaagctgccggtgccctggcccacTCTTGTGACCACCTTGACCtACGGTGTCCAGTGTTTTAGCAGGTATCCGGATCACA	106
Rep1.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.Recoded.5P	/5Phos/tggcTgacttgaagaagtcgtgctgcttcaTGTGATCCGGATACCTGCTAAAACACTGGACACCGTaGGTCAAGGTGGTCACAAGA	107
Rep1.BFP2GFP.TopDonor.Recoded.5P.endPhos	/5Phos/c*a*c*cggcaagctgccggtgccctggcccacTCTTGTGACCACCTTGACCtACGGTGTCCAGTGTTTTAGCAGGTATCCGGATC*A*C*A	108
Rep1.BFP2GFP.BotDonor.Recoded.5P.endPhos	/5Phos/t*g*g*cggacttgaagaagtcgtgctgcttcaTGTGATCCGGATACCTGCTAAAACACTGGACACCGTaGGTCAAGGTGGTCACA*A*G*A	109
Rep2.BFP.FwdGuide	mC*mU*mG*AAGUUCAUCUGCACCACGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCCUACGGCAAGCUGACCmC*mU*mG*A	110
Rep2.BFP.RevGuide	mG*mA*mC*GUAGCCUUCGGGCAUGGGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCAGAUGGUGCGCUCCUGmG*mA*mC*G	111
Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.5P	/5Phos/AaccggcaagctgccggtgccctggcccaccCTCgtgaccaccctgaccTACggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtcAgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatct	112
Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.5P	/5Phos/tggcTgacttgaagaagtcgtgctgcttcatgtggtcggggtagcggctgaagcactgcacgccGTAggtcagggtggtcacGAGggtgggccagggcacCggcagcttgccggtTgtgcagatgaacttcagggtcagcttgccgtag	113
Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.Recoded.5P	/5Phos/AACCGGTAAGTTGCCAGTCCCGTGGCCTACTCTTGTGACCACCTTGACCtACGGTGTCCAGTGTTTTAGCAGGTATCCGGATCACATGAAACAGCATGACTTCTTTAAATCAGCTATGcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatct	114

【表８－３】

名称	核酸配列(5’から3’へ)	配列番号
Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.Recoded.5P	/5Phos/TAGCTGATTTAAAGAAGTCATGCTGTTTCATGTGATCCGGATACCTGCTAAAACACTGGACACCGTaGGTCAAGGTGGTCACAAGAGTAGGCCACGGGACTGGCAACTTACCGGTTgtgcagatgaacttcaggtcagcttgccgtag	115
Rep2.BFP2GFP.TopDonor.5P	/5Phos/caccggcaagctgccGgtgccctggcccaccCTCgtgaccaccctgaccTACggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatct	116
Rep2.BFP2GFP.BotDonor.5P	/5Phos/tggcggacttgaagaagtcgtgctgcttcatgtggtcggggtagcggctgaagcactgcacgccGTAggtcagggtggtcacGAGggtgggccagggcacCggcagcttgccggtggtgcagatgaacttcagggtcagcttgccgtag	117
Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.Recoded.5P.endPhos	/5Phos/A*A*C*CGGTAAGTTGCCAGTCCCGTGGCCTACTCTTGTGACCACCTTGACCtACGGTGTCCAGTGTTTTAGCAGGTATCCGGATCACATGAAACAGCATGACTTCTTTAAATCAGCTATGcccgaaggctacgtccaggagcgcacca*t*c*t	118
Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.Recoded.5P.endPhos	/5Phos/T*A*G*CTGATTTAAAGAAGTCATGCTGTTTCATGTGATCCGGATACCTGCTAAAACACTGGACACCGTaGGTCAAGGTGGTCACAAGAGTAGGCCACGGGACTGGCAACTTACCGGTTgtgcagatgaacttcagggtcagcttgccg*t*a*g	119
Rep2.CBX1.FwdGuide	mG*mA*mA*AGCUGGCGGGCACUAUGGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCGUCACCCUUUACACCAmG*mA*mA*A	120
Rep2.CBX1.RevGuide	mC*mU*mU*UGCCCUUUACCACUCGAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUAGGAGGUACUCCAmC*mU*mU*U	121

【表８－４】

名称	核酸配列(5’から3’へ)	配列番号
Rep2.mGL-CBX1.TopDonor.SpPAMmut.5P	ATGgtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtccgcggcgagggcgagggcgatgccaccaacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccttaggctacggcgtggcctgcttcgcccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatctctttcaaggacgacggtacctacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgtgctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaacttcaacagccacaaggtctatatcacggccgacaagcagaagaacggcatcaaggctaacttcaagacccgccacaacgttgaggacggcggcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcctatcagtccaaactgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgaaggagagggtgaccgccgccgggattacacatgacatggacgagctgtacaagtctggaggatctagcggaggatccGGGAAGAAACAAAACAAGAAGAAAGTGGAGGAGGTGCTAGAAGAGGAGGAAGAGGAATATGTGGTGGAAAAAGTTCTCGAtCGTCGAGTGGTAAAGGGCAAAGTGGAGTACCTCCTAAA	122
Rep2.mGL-CBX1.BotDonor.SpPAMmut.5P	CGACGaTCGAGAACTTTTTCCACCACATATTCCTCTTCCTCCTCTTCTAGCACCTCCTCCACTTTCTTCTTGTTTTGTTTCTTCCCggatcctccgctagatcctccagacttgtacagctcgtccatgtcatgtgtaatcccggcggcggtcaccctctccttcaggaccatgtgatcgcgcttctcgttggggtctttgctcagtttggactgatggctcaggtagtggttgtcgggcagcagcacgggggccgtcgccgatgggggtgttctgctggtagtggtcggcgagctgcacgccgccgtcctcaacgttgtggcgggtcttgaagttagccttgatgccgttcttctgcttgtcggccgtgatatagaccttgtggctgttgaagttgtactccagcttgtgccccaggatgttgccgtcctccttgaagtcgatgcccttcagcacgatgcggttcaccagggtgtcgccctcgaacttcacctcggcgcgggtcttgtaggtaccgtcgtccttgaaagagatggtgcgctcctggacgtagccttcgggcatggcggacttgaagaagtcgtgctgcttcatgtggtcggggtagcgggcgaagcaggccacgccgtagcctaaggtggtcacgagggtgggccagggcacgggcagcttgccggtggtgcagatgaacttcagggtcagcttgccgttggtggcatcgccctcgccctcgccgcggacgctgaacttgtggccgtttacgtcgccgtccagctcgaccaggatgggcaccaccccggtgaacagctcctcgcccttgctcacCATAGTGCCCGCCAGCTTTCTGGTGTAAAGGGTGAC	123
CBX1-001 エクソン2(ORFの開始を含む)	CAGCGTCACCCTTTACACCAGAAAGCTGGCGGGCACTATGGGGAAAAAACAAAACAAGAAGAAAGTGGAGGAGGTGCTAGAAGAGGAGGAAGAGGAATATGTGGTGGAAAAAGTTCTCGACCGTCGAGTGGTAAAGGGCAAAGTGGAGTACCTCCTAAAGTGGAAGGGATTCTCAGA	124

【０１００】

ガイド核酸は、ガイド核酸の構成要素間の連結核酸（例えば、連結ＲＮＡまたはＤＮＡヌクレオチド）の配列を含み得る。例えば、ガイド核酸は、以下の構成要素：スペーサー、足場、ドナー結合部位、またはフラップ結合部位のうちのいずれかの間の連結核酸の配列を含み得る。ガイド核酸は、スペーサー、足場、またはドナー結合部位間の連結核酸の配列を含み得る。ガイド核酸は、足場とドナー結合部位との間の連結核酸の配列を含み得る。ガイド核酸は、スペーサーと足場との間の連結核酸の配列を含み得る。ガイド核酸は、構成要素間の連結核酸の複数の配列を含み得る。

【０１０１】

連結核酸の配列は、Ａ、Ｕ、Ｔ、Ｇ、もしくはＣなどの任意の塩基、またはそれらの組

み合わせを含み得る。連結核酸の配列は、Ａ、Ｔ、Ｇ、もしくはＣ、またはそれらの組み合わせを含み得る。連結核酸の配列は、Ａ、Ｕ、Ｇ、もしくはＣ、またはそれらの組み合わせを含み得る。連結核酸の配列は、一連のＡを含み得る。連結核酸の配列は、一連のＴを含み得る。連結核酸の配列は、一連のＵを含み得る。連結核酸の配列は、一連のＣを含み得る。連結核酸の配列は、一連のＧを含み得る。

【０１０２】

連結核酸の配列は、ヌクレオチドの数などの長さを含み得る。長さは、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、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、もしくは１００ヌクレオチド、または前述の数のヌクレオチドのうちのいずれか２つによって画定される範囲を含み得る。長さは、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、少なくとも５５、少なくとも６０、少なくとも６５、少なくとも７０、少なくとも７５、少なくとも８０、少なくとも８５、少なくとも９０、少なくとも９５、または少なくとも１００ヌクレオチドを含み得る。いくつかの態様では、長さは、２未満、３未満、４未満、５未満、６未満、７未満、８未満、９未満、１０、１１未満、１２未満、１３未満、１４未満、１５未満、１６未満、１７未満、１８未満、１９未満、２０未満、２１未満、２２未満、２３未満、２４未満、２５未満、３０未満、３５未満、４０未満、４５未満、５０未満、５５未満、６０未満、６５未満、７０未満、７５未満、８０未満、８５未満、９０未満、９５未満、または１００未満のヌクレオチドであってもよい。

【０１０３】

いくつかの態様は、細胞中のゲノム遺伝子座に少なくとも部分的に相補的であるスペーサーと、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと複合体化するための足場と、組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的であるドナー結合部位と、を含むガイド核酸に関する。ガイド核酸は、ゲノム遺伝子座のゲノム配列に少なくとも部分的に相補的なフラップ結合部位を更に含み得る。ガイド核酸は、少なくとも１つの核酸修飾を更に含み得る。少なくとも１つの核酸修飾は、骨格、糖、塩基、またはそれらの組み合わせに対する修飾を含み得る。ガイド核酸は、ＲＮＡを含み得る。

【０１０４】

いくつかの態様は、標的核酸の第１の領域に少なくとも部分的に相補的なスペーサーと、エンドヌクレアーゼに結合するように構成された足場と、核酸フラップに少なくとも部分的に相補的なフラップ結合部位と、組み込み核酸結合部位と、を含むガイド核酸を含む。

【０１０５】

組み込み核酸

本明細書に開示されるのは、組み込み核酸である。組み込み核酸は、本明細書に開示される組成物、システムまたは方法に含まれ得る。いくつかの態様は、組み込み核酸をコードする核酸に関する。本明細書で提供されるのは、遺伝子座における宿主ゲノムなどの標的核酸に挿入される核酸を組み込むことである。例えば、組み込み核酸は、標的核酸内の核酸を置き換えてもよい。組み込み核酸は、「ドナー核酸」、「ドナー」または「ドナー鎖」と称され得る。ゲノム遺伝子座が記載されている場合、遺伝子座が含まれ得るか、またはその逆であり得る。例えば、遺伝子座は、宿主ゲノムの一部であり得るか、または非ゲノム核酸の一部であり得る。ドナーは、ＤＮＡを含み得る。同様に、標的核酸は、ＤＮＡを含み得る。場合によっては、ドナーは、例えば、標的核酸がＲＮＡを含む場合、ＲＮＡを含み得る。組み込み核酸は、標的核酸のゲノム遺伝子座に挿入される遺伝子または調

節エレメントなどの任意の挿入物を含んでもよい。ドナー鎖は、遺伝子座と少なくとも部分的に相同である配列を含んでもよい。組み込み核酸はまた、いくつかの例では、本明細書に記載のＤＮＡリガーゼのためのスプリントとして、例えば、スプリント組み込み核酸の一部に対合した２つの核酸鎖塩基をライゲーションするためのスプリントとしても機能し得る。場合によっては、スプリントは、組み込み核酸の一方の鎖を含み、ライゲーションされている部分は、組み込み核酸の別の鎖であり得る。場合によっては、スプリントは、組み込み核酸の鎖を含み、ライゲーションされている部分は、組み込み核酸の同じ鎖の上流または下流部分であり得る。組み込み核酸は、一本鎖であり得る。組み込み核酸は、二本鎖であり得る。組み込み核酸は、２つの鎖として送達され得る。組み込み核酸は、複数の鎖、例えば、２つの鎖として送達され得る。

【０１０６】

組み込み核酸は、非天然に存在する核酸であり得る。組み込み核酸は、操作され得る。組み込み核酸は、合成であり得る。組み込み核酸は、予備合成され得る。組み込み核酸は、対象または細胞に付加され得る。いくつかの態様では、組み込み核酸は、ポリメラーゼ用のテンプレートを含まない。

【０１０７】

本明細書に開示されるのは、標的核酸に挿入される二本鎖ＤＮＡ領域を含む組み込み核酸であり、二本鎖ＤＮＡ領域は、フラップ結合部位及び／またはガイド結合部位を含む少なくとも１つのオーバーハングに隣接している。

【０１０８】

組み込み核酸は、ゲノム鎖などの標的核酸にライゲーションされ得る。組み込み核酸は、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼによって生成されたゲノム鎖の３’末端にライゲーションされ得る５’末端を含み得る。

【０１０９】

ドナーは、図１Ａ～６Ｃに含まれる任意の態様を含み得る。例えば、ドナーは、ガイド結合部位、フラップ結合部位、またはオーバーハングなどの態様を含み得る。ドナーは、ガイド結合部位を含み得る。ドナーは、２つのガイド結合部位を含み得る。ドナーは、フラップ結合部位を含み得る。ドナーは、２つのフラップ結合部位を含み得る。ドナーは、オーバーハングを含み得る。ドナーは、２つのオーバーハングを含み得る。態様は、ドナーの５’末端または３’末端、または両端に含まれ得る。ガイド結合部位またはフラップ結合部位は、ドナーの内部領域にあり得る。

【０１１０】

いくつかの態様は、標的核酸に挿入される二本鎖ＤＮＡ領域を含む、組み込み核酸を含み、二本鎖ＤＮＡ領域は、フラップ結合部位またはガイド結合部位を含む少なくとも１つのオーバーハングに隣接している。

【０１１１】

いくつかの態様では、組み込み核酸は、修飾ヌクレオシド間結合を含む。いくつかの態様では、修飾ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合を含む。いくつかの態様では、修飾ヌクレオシド間結合は、組み込み核酸の５’末端または３’末端における４つの末端ヌクレオシドのうちのいずれかの間である。組み込み核酸は、複数の修飾ヌクレオシド間結合を含み得る。例えば、組み込み核酸は、組み込み核酸の５’末端及び３’末端の核酸、例えば、５’末端の最後の４つの核酸間、及び３’末端の最後の４つの核酸間の修飾ヌクレオシド間結合を含み得る。いくつかの態様では、組み込み核酸は、修飾ヌクレオシドを含む。いくつかの態様では、修飾ヌクレオシドは、ロックド核酸（ＬＮＡ）、２’フルオロ、２’Ｏ－アルキル、５’Ｏ－メチル、２’－Ｏ－メチル、またはそれらの組み合わせを含む。修飾ヌクレオシドは、ＬＮＡ、２’フルオロ、２’Ｏ－アルキル、メチル化シトシン、反転チミジン、またはそれらの組み合わせを含み得る。修飾ヌクレオシドは、ＬＮＡを含み得る。修飾ヌクレオシドは、２’フルオロを含み得る。修飾ヌクレオシドは、２’Ｏ－アルキルを含み得る。修飾ヌクレオシドは、メチル化シトシンを含み得る。いくつかの態様では、修飾ヌクレオシドは、組み込み核酸の５’末端または３’末端における３つの末端

ヌクレオシドのうちのいずれかである。組み込み核酸は、複数の修飾ヌクレオシドを含み得る。例えば、組み込み核酸は、５’末端における最後の３つの核酸及び３’末端における最後の３つの核酸など、組み込み核酸の５’末端及び３’末端の核酸における修飾ヌクレオチドを含み得る。組み込み核酸は、宿主ゲノムなどの標的核酸にライゲーションされた後、組み込み核酸の機能を干渉しない限り、ガイド核酸に関連して記載された修飾ヌクレオシドまたは修飾ヌクレオシド間結合などの任意の修飾を含み得る。組み込み核酸は、組み込み核酸の機能に干渉しない限り、ガイド核酸に関連して記載された数または組み合わせなどの任意の数または組み合わせの修飾を含み得る。表８は、核酸配列を組み込むいくつかの例を含む。

【０１１２】

組み込み核酸は、メチル化ヌクレオチドを含み得る。組み込み核酸は、非メチル化ヌクレオチドを含み得る。メチル化ヌクレオチドの例には、メチル化シトシンを含むヌクレオチドが含まれ得る。シトシンは、シトシン環のＣ－５位置でメチル化され得る。非メチル化ヌクレオチドの例には、非メチル化シトシンが含まれ得る。非メチル化ヌクレオチドは、シトシン環のＣ－５位置でメチル化されていないシトシンを含み得る。

【０１１３】

標的核酸

本明細書に開示されるのは、標的核酸である。標的核酸は、ＤＮＡを含み得る。標的核酸は、ＤＮＡであり得る。標的核酸は、ＲＮＡを含み得る。標的核酸は、細胞内にあり得る。標的核酸は、メチル化され得る。標的核酸は、非メチル化され得る。標的核酸は、ゲノムを含み得る。標的核酸は、ゲノムＤＮＡを含み得る。標的核酸は、染色体を含み得る。標的核酸は、遺伝子を含み得る。

【０１１４】

標的核酸は、対象内にあり得る。標的核酸は、細胞内にあり得る。標的核酸は、試験管内にあり得る。

【０１１５】

標的核酸は、編集され得る。標的核酸は、インビトロで編集され得る。標的核酸は、インビボで編集され得る。

【０１１６】

システム

本明細書に記載されるのは、核酸編集（遺伝子編集としても知られる）のためのシステムである。編集システムは、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ、ガイド核酸、及び組み込み核酸などのエンドヌクレアーゼを含み得る。遺伝子編集が記載される場合、編集は、遺伝子、調節エレメント、または核酸の任意の配列であり得ると考えられる。また、遺伝子座におけるゲノム編集などのゲノム編集が記載されている場合、ゲノムを含まない核酸編集を行うこともできると考えられる。例えば、ゲノム編集は、生物のゲノムの編集を指し得るか、またはゲノムの一部ではない核酸の編集を含み得る。本明細書に記載されるシステムは、遺伝子編集方法において使用され得る。

【０１１７】

本明細書に記載されるのは、いくつかの態様では、少なくとも１つのエンドヌクレアーゼ、少なくとも１つのガイド核酸、少なくとも１つのリガーゼ、少なくとも１つのドナー鎖、またはそれらの組み合わせを含むシステムである。いくつかの態様では、ガイド核酸は、ゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断するためにエンドヌクレアーゼをゲノム遺伝子座に誘導し、切断後にドナー鎖がライゲーションされ、したがってリガーゼによってゲノム遺伝子座に組み込まれる。いくつかの態様では、システムは、第１のガイド核酸と複合体化される第１のエンドヌクレアーゼ（第１のエンドヌクレアーゼは、第１のリガーゼに作動可能にカップリングされ得る）と、第２のガイド核酸と複合体化される第２のエンドヌクレアーゼ（第２のエンドヌクレアーゼは、第２のリガーゼに作動可能にカップリングされ得る）と、を含む。そのようなシステムでは、第１のエンドヌクレアーゼ及び第２のエンドヌクレアーゼの各々は、ドナー鎖の組み込みのために、ゲノム遺伝子座の少

なくとも１つの鎖を各々切断することができる。

【０１１８】

いくつかの態様では、システムは、１つ、２つ、３つ、またはそれ以上のエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの態様では、システムは、１つのエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの態様では、２つのエンドヌクレアーゼは各々、異なるガイド核酸と複合体化することができる。いくつかの態様では、２つのエンドヌクレアーゼは各々、リガーゼに作動可能にカップリングすることができる。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、プログラム可能なエンドヌクレアーゼである。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含み、ガイド核酸は、ガイドＲＮＡを含む。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、ニッカーゼを含み、エンドヌクレアーゼは、１つの鎖のみを切断する（二本鎖切断を行うのではない）。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、ゲノム遺伝子座の近傍（例えば、核内）におけるエンドヌクレアーゼの蓄積を増加させるための局在化シグナル配列を含む。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、少なくとも１つの追加のドメインを含む。いくつかの態様では、少なくとも１つの追加のドメインは、二量体化ドメインである。いくつかの態様では、二量体化ドメインを含むエンドヌクレアーゼは、リガーゼで二量体化されて、ヘテロ二量体を形成することができる。いくつかの態様では、少なくとも１つの追加のドメインは、機能ドメインである。例えば、機能ドメインは、クロマチン修飾ドメインまたは細胞透過性ペプチドを含むことができる。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、リンカーを含み、リンカーは、エンドヌクレアーゼを別のポリペプチド（例えば、リガーゼ）と共有結合的に接続することができる。いくつかの態様では、リンカーは、エンドヌクレアーゼを少なくとも１つの追加のドメインに共有結合的に接続する。いくつかの態様では、エンドヌクレアーゼは、タグを含み、タグは、エンドヌクレアーゼの発現の増加、同定、または精製に使用され得る。

【０１１９】

いくつかの態様では、システムは、１つ、２つ、３つ、またはそれ以上のガイド核酸を含む。いくつかの態様では、システムは、１つのガイド核酸を含み、１つのガイド核酸は、少なくとも１つのエンドヌクレアーゼと複合体化され得る。いくつかの態様では、システムは、２つのガイド核酸を含み、２つのガイド核酸は各々、少なくとも１つのエンドヌクレアーゼと複合体化され得る。いくつかの態様では、ガイド核酸は、細胞内のゲノム遺伝子座に相補的なスペーサー、少なくとも１つのエンドヌクレアーゼと複合体化するための足場、ドナー鎖に少なくとも部分的に相補的であるドナー結合部位、ゲノム遺伝子座における、もしくはそれに隣接するゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的であるフラップ結合部位、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの態様では、ガイド核酸は、少なくとも１つのエンドヌクレアーゼに、ゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断するように指示することができる。いくつかの態様では、ガイド核酸は、ドナー鎖に少なくとも部分的に相補的であり得るか、またはゲノムフラップ（例えば、ガイド核酸がエンドヌクレアーゼをゲノム遺伝子座に動員するときに、置換され、一本鎖になるゲノム核酸配列）に少なくとも部分的に相補的であり得る。いくつかの態様では、ドナー鎖に少なくとも部分的に相補的であるか、またはゲノムフラップに少なくとも部分的に相補的であるガイド核酸は、ドナー鎖をゲノム遺伝子座の切断に近接させる。いくつかの態様では、ガイド核酸は、少なくとも１つの核酸修飾を含む。いくつかの態様では、少なくとも核酸修飾は、ガイド核酸の骨格、糖、塩基、またはそれらの組み合わせを修飾することを含む。いくつかの態様では、少なくとも１つの核酸修飾は、分解に対する（例えば、ヌクレアーゼ分解または加水分解に対する）ガイド核酸の耐性を増加させることができる。いくつかの態様では、少なくとも１つの核酸修飾は、少なくとも１つのエンドヌクレアーゼに対するガイド核酸の複合体化を増加させることができる。いくつかの態様では、少なくとも１つの核酸修飾は、ドナー鎖に対するガイド核酸の複合体化を増加させることができる。いくつかの態様では、少なくとも１つの核酸修飾は、ゲノムフラップに相補的であることによって、を介して、ゲノム遺伝子座へのガイド核酸の複合体化を増加させること

ができる。

【０１２０】

いくつかの態様では、システムは、１つ、２つ、３つ、またはそれ以上のリガーゼを含む。いくつかの態様では、システムは、１つのリガーゼを含む。いくつかの態様では、１つのリガーゼは、少なくとも１つのエンドヌクレアーゼと作動可能にカップリングされ、リガーゼは、ドナー鎖の少なくとも一端を切断されたゲノム遺伝子座にライゲーションすることができ、したがって、ドナー鎖をゲノム遺伝子座に組み込む。いくつかの態様では、システムは、２つのリガーゼを含む。いくつかの態様では、２つのリガーゼは各々、異なるエンドヌクレアーゼに作動可能にカップリングすることができ、ゲノム遺伝子座は、２つ以上の位置で切断される。そのようなシナリオでは、２つのリガーゼは各々、ドナー鎖の一端を切断されたゲノム遺伝子座にライゲーションすることができ、したがって、ドナー鎖をゲノム遺伝子座に組み込む。いくつかの態様では、リガーゼは、ＤＮＡを含む基質をライゲーションすることができるリガーゼを含む。いくつかの態様では、リガーゼは、ＤＮＡスプリントを含む基質をライゲーションすることができるリガーゼを含む。いくつかの態様では、リガーゼは、ＤＮＡ／ＲＮＡを含む基質をライゲーションすることができるリガーゼを含む。いくつかの態様では、リガーゼは、ＲＮＡスプリントを含む基質をライゲーションすることができるリガーゼを含む。いくつかの態様では、リガーゼは、少なくとも１つの追加のドメインを含む。いくつかの態様では、少なくとも１つの追加のドメインは、二量体化ドメインである。いくつかの態様では、二量体化ドメインを含むリガーゼは、エンドヌクレアーゼで二量体化されて、ヘテロ二量体を形成することができる。いくつかの態様では、少なくとも１つの追加のドメインは、機能ドメインである。例えば、機能ドメインは、クロマチン修飾ドメインまたは細胞透過性ペプチドを含むことができる。いくつかの態様では、リガーゼは、リンカーを含み、当該リンカーは、リガーゼを別のポリペプチド（例えば、エンドヌクレアーゼ）と共有結合的に接続させることができる。いくつかの態様では、リンカーは、リガーゼを少なくとも１つの追加のドメインに共有結合的に接続する。いくつかの態様では、リガーゼは、タグを含み、タグは、リガーゼの発現の増加、同定、または精製に使用され得る。

【０１２１】

本明細書に開示されるのは、リガーゼに融合されたＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含む融合タンパク質である。表９は、本明細書に記載のシステムの構成要素（例えば、リガーゼに融合したエンドヌクレアーゼ）を含む融合ポリペプチドをコードするポリペプチド及び核酸配列の非限定的な例を示す。配列番号１２５は、配列番号１２６のポリペプチド配列をコードする核酸配列を示し、配列番号１２６は、Ｎ末端のＮＬＳ、続いて、リンカーを介してリガーゼ（ｈＬＩＧ１、１１９－９１９断片）に共有結合的に接続されたエンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）、続いてＣ末端ＮＬＳを含む融合タンパク質（ＮＬＳ－ｎＣａｓ９－リンカー－ｈＬＩＧ１（１１９－９１９）－ｂｐＮＬＳ）を示す。配列番号１２７は、配列番号１２８のポリペプチド配列をコードする核酸配列を示し、配列番号１２８は、Ｎ末端のＮＬＳ、続いて、リンカーを介してリガーゼ（ｈＬＩＧ１、２３３－９１９断片）に共有結合的に接続されたエンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）、続いてＣ末端ＮＬＳを含む融合タンパク質（ＮＬＳ－ｎＣａｓ９－リンカー－ｈＬＩＧ１（２３３－９１９）－ｂｐＮＬＳ）を示す。配列番号１２９は、配列番号１３０のポリペプチド配列をコードする核酸配列を示し、配列番号１３０は、Ｎ末端のＮＬＳ、続いて、リンカーを介してリガーゼ（ＳｐｌｉｎｔＲ）に共有結合的に接続されたエンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）、続いてＣ末端ＮＬＳを含む融合タンパク質（ＮＬＳ－ｎＣａｓ９－リンカー－ＳｐｌｉｎｔＲ－ｂｐＮＬＳ）を示す。配列番号１３１は、配列番号１３２のポリペプチド配列をコードする核酸配列を示し、配列番号１３２は、Ｎ末端のＮＬＳ、続いて、リンカーを介してリガーゼ（Ｔ４ＬＩＧ）に共有結合的に接続されたエンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）、続いてＣ末端ＮＬＳを含む融合タンパク質（ＮＬＳ－ｎＣａｓ９－リンカー－Ｔ４ＬＩＧ－ｂｐＮＬＳ）を示す。配列番号１３３は、Ｎ末端ＮＬＳ及びロイシンジッパー（ＬＺ）二量体化ドメインを含むエンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）をコードする核酸

配列を示す。配列番号１３４は、Ｎ末端における第１のＮＬＳ（ＮＬＳ１）、続いて、リンカー１を介してエンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）に共有結合的に接続され、更にリンカー２を介してリガーゼ（Ｔ４ＬＩＧ）に共有結合的に接続されたエキソヌクレアーゼ（ｈＦＥＮ１）、続いてＣ末端における第２のＮＬＳ（ＮＬＳ２）を含む融合タンパク質（ＮＬＳ１－ｈＦＥＮ１－リンカー１－ｎＣａｓ９－リンカー２－Ｔ４ＬＩＧ－ＮＬＳ２）を示す。配列番号１３５は、Ｎ末端ＮＬＳ１、リンカー１を介してリガーゼ（Ｔ４ＬＩＧ）に共有結合的に接続され、更にリンカー２を介してエンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）に共有結合的に接続されたエキソヌクレアーゼ（ｈＦＥＮ１）、続いてＣ末端ＮＬＳ２を含む融合タンパク質（ＮＬＳ１－ｈＦＥＮ１－リンカー１－Ｔ４ＬＩＧ－リンカー２－ｎＣａｓ９－ＮＬＳ２）を示す。配列番号１３６は、Ｎ末端ＮＬＳ１、続いてリンカー１を介してエキソヌクレアーゼ（ｈＦＥＮ１）に共有結合的に接続され、更にリガーゼ２を介してリガーゼ（Ｔ４ＬＩＧ）に共有結合的に接続されたエンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）、続いてＣ末端ＮＬＳ２を含む融合タンパク質（ＮＬＳ１－ｎＣａｓ９－リンカー１－ｈＦＥＮ１－リンカー２－Ｔ４ＬＩＧ－ＮＬＳ２）を示す。配列番号１３７は、Ｎ末端ＮＬＳ１、続いてリンカー１を介してエンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）に共有結合的に接続され、更にリガーゼ２を介してエキソヌクレアーゼ（ｈＦＥＮ１）に共有結合的に接続されたリガーゼ（Ｔ４ＬＩＧ）、続いてＣ末端ＮＬＳ２を含む融合タンパク質（ＮＬＳ１－Ｔ４ＬＩＧ－リンカー１－ｎＣａｓ９－リンカー２－ｈＦＥＮ１－ＮＬＳ２）を示す。配列番号１３８は、Ｎ末端ＮＬＳ１、リンカー１を介してリガーゼ（Ｔ４ＬＩＧ）に共有結合的に接続され、更にリンカー２を介してエキソヌクレアーゼ（ｈＦＥＮ１）に共有結合的に接続されたエンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）、続いてＣ末端ＮＬＳ２を含む融合タンパク質（ＮＬＳ１－ｎＣａｓ９－リンカー１－Ｔ４ＬＩＧ－リンカー２－ｈＦＥＮ１－ＮＬＳ２）を示す。配列番号１３９は、Ｎ末端ＮＬＳ１、リンカー１を介してエキソヌクレアーゼ（ｈＦＥＮ１）に共有結合的に接続され、更にリンカー２を介してエンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）に共有結合的に接続されたリガーゼ（Ｔ４ＬＩＧ）、続いてＣ末端ＮＬＳ２を含む融合タンパク質（ＮＬＳ１－Ｔ４ＬＩＧ－リンカー１－ｈＦＥＮ１－リンカー２－ｎＣａｓ９－ＮＬＳ２）を示す。配列番号１４０は、Ｎ末端ＮＬＳ１、続いてリンカー１を介してエンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）に共有結合的に接続され、更にリガーゼ２を介してリガーゼ（Ｔ４ＬＩＧ）に共有結合的に接続されたエキソヌクレアーゼ（ＥＸＯ）、続いてＣ末端ＮＬＳ２を含む融合タンパク質（ＮＬＳ１－Ｔ５　ＥＸＯ－リンカー１－ｎＣａｓ９－リンカー２－Ｔ４ＬＩＧ－ＮＬＳ２）を示す。配列番号１４１は、二量体化ドメイン（ＬＺ）に融合されたリガーゼ（ＳｐｌｉｎｔＲ）及びＮＬＳを含む融合タンパク質（ＬＺ－ＳｐｌｉｎｔＲ－ｂｐＮＬＳ）をコードする核酸配列を示す。配列番号１４２は、二量体化ドメイン（ＬＺ）に融合されたリガーゼ（Ｔ４ＬＩＧ）及びＮＬＳを含む融合タンパク質（ＬＺ－Ｔ４ＬＩＧ－ｂｐＮＬＳ）をコードする核酸配列を示す。配列番号１４３は、二量体化ドメイン（ＬＺ）に融合されたリガーゼ（ｈＬＩＧ）及びＮＬＳを含む融合タンパク質（ＬＺ－ｈＬＩＧ　２３３－９１９ポリペプチド断片－ｂｐＮＬＳ）をコードする核酸配列を示す。配列番号１４４は、二量体化ドメイン（ＬＺ）に融合されたリガーゼ（ｈＬＩＧ）及びＮＬＳを含む融合タンパク質（ＬＺ－ｈＬＩＧ１１１９－９１９ポリペプチド断片－ｂｐＮＬＳ）をコードする核酸配列を示す。配列番号１４５は、二量体化ドメイン（ＬＺ）に融合されたリガーゼ（Ｔ４）及びＮＬＳを含む融合タンパク質（Ｔ４－ＬＺ）をコードする核酸配列を示す。配列番号１４６は、二量体化ドメイン（ＬＺ）に融合したリガーゼポリペプチド断片（ｈＬＩＧ４（１－６２０））及びＮＬＳを含む融合タンパク質（ＬＺ－ｈＬＩＧ４（１－６２０））をコードする核酸配列を示す。配列番号１４７は、二量体化ドメイン（ＬＺ）に融合されたエンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）及びＮＬＳを含む融合タンパク質（ＬＺ－ｎＣａｓ９）をコードする核酸配列を示す。配列番号１４８は、二量体化ドメイン（ＬＺ）に融合されたリガーゼ（ＳｐｌｉｎｔＲ）及びＮＬＳを含む融合タンパク質（ＳｐｌｉｎｔＲ－ＬＺ）をコードする核酸配列を示す。配列番号１４９は、二量体化ドメイン（ＬＺ）に融合したリガーゼポリペプチド断片（ｈＬＩＧ４（１－６２０））及びＮＬＳを含む融合タンパク質（ｈＬＩＧ

４（１－６２０）－ＬＺ）をコードする核酸配列を示す。配列番号１５０は、エンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）に融合されたリガーゼポリペプチド断片（ｈＬＩＧ４（１－６２０））及びＮＬＳを含む融合タンパク質（ｎＣａｓ９－ｈＬＩＧ４（１－６２０））をコードする核酸配列を示す。配列番号１５１は、エンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）に融合したリガーゼ（Ｔ４）及びＮＬＳを含む、融合タンパク質（Ｔ４－ｎＣａｓ９）をコードする核酸配列を示す。配列番号１５２は、エンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）及びＮＬＳに融合されたリガーゼ（ＳｐｌｉｎｔＲ）を含む、融合タンパク質（ＳｐｌｉｎｔＲ－ｎＣａｓ９）をコードする核酸配列を示す。配列番号１５３は、エンドヌクレアーゼ（ｎＣａｓ９）及びＮＬＳに融合されたリガーゼポリペプチド断片（ｈＬＩＧ４（１－６２０））を含む、融合タンパク質（ｈＬＩＧ４（１－６２０）－ｎＣａｓ９）をコードする核酸配列を示す。

【表９－１】

表９．融合タンパク質ポリペプチド配列または融合タンパク質をコードする核酸配列の非限定的な例

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(119-919)-bpNLS	atgaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtcgacaagaagtacagc atcggcctggacatcggcaccaactctgtgggctgggccgtgatcaccgacgagtacaaggtgcccagcaaga aattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagc ggcgaaacagccgaggccacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggat ctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttcttccacagactggaagagtc cttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcacccccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctacc acgagaagtaccccaccatctaccacctgagaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggct gatctatctggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctgaaccccgacaa cagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaacg ccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgc ccagctgccccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgaccccaact tcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctgga caacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaagaacctgtccgacgccatcct gctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggcccccctgagcgcctctatgatcaagagatacg acgagcaccaccaggacctgaccctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagatt ttcttcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagtt catcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctg cggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgc ggcggcaggaagattttttacccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcc cctactacgtgggccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcgaggaaaccat caccccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcatcgagcggatgaccaact tcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcacagcctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacg agctgaccaaagtgaaatacgtgaccgagggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcgagcagaaaaagg ccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaaa atcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccctgggcacataccacgatc tgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgac cctgacactgtttgaggacagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagt gatgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccg ggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacggcttcgccaacagaaacttcatgcagct gatccacgacgacagcctgaccttttaaagaggacatccagaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctg cacgagcacattgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtgg acgagctcgtgaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagagagaaccaga ccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggcatcaaagagctgggc agccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgca gaatgggcgggatatgtacgtggaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggacgctatcgt	125

【表９－２】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	gcctcagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaag agcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacgccaagc tgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccgg cttcatcaagagacagctggtggaaacccggcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatga acactaagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctggtgtcc gatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctga acgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaag gtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttcta cagcaacatcatgaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcga gacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggattttgccaccgtgcggaaagtgctgagc atgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggcttcagcaaagagtctatcctgcccaa gaggaacagcgataagctgatcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccc caccgtggcctattctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaag agctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgactttctggaagccaagggct acaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttcgagctggaaaacggccggaag agaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctg tacctggccagccactatgagaagctgaagggctccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtggaaca gcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaagagagtgatcctggccgacgcta atctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatc cacctgtttaccctgaccaatctgggagccccctgccgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccggaagaggt acaccagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggat cgacctgtctcagctgggaggtgacTCCGGCGGAAGCTCTGGTGGCAGCAAGCGGA CCGCCGACGGCTCTGAATTCGAGAGCCCTAAGAAGAAAAGAAAGGT GAGCGGAGGCTCTAGCGGCGGAAGCCCGAAGCGCCGGACTGCACGA AAGCAACTGCCAAAACGGACTATACAAGAAGTCCTGGAAGAACAAA GCGAAGATGAGGATCGCGAAGCCAAGCGCAAGAAAGAGGAAGAGG AAGAAGAGACTCCAAAGGAGTCCTTGACCGAAGCAGAAGTCGCAAC GGAGAAGGAAGGTGAGGATGGGGATCAGCCAACAACCCCGCCTAAA CCTCTGAAAACCTCTAAGGCGGAGACACCAACTGAGAGTGTCAGCG AACCGGAGGTAGCCACGAAACAAGAGCTTCAGGAGGAAGAAGAAC AGACAAAGCCACCTCGGCGGGCTCCCAAAACCCTTAGCTCCTTCTTC ACGCCTCGAAAGCCAGCAGTGAAGAAAGAAGTGAAGGAGGAGGAA CCTGGCGCCCCTGGAAAGGAGGGCGCAGCCGAGGGCCCGCTGGACC CTTCAGGGTATAACCCGGCAAAAAATAATTACCACCCGGTCGAGGA CGCTTGTTGGAAACCAGGCCAAAAGGTACCTTACCTCGCCGTCGCTA GGACCTTTGAGAAGATAGAGGAAGTTAGTGCTAGGTTGAGAATGGT CGAAACCCTTAGTAACCTTCTCAGGTCCGTAGTCGCCCTTAGTCCCC	

【表９－３】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	CAGACCTGCTTCCGGTGCTGTACCTGTCCCTGAACCATCTCGGTCCCC CCCAACAGGGACTGGAGTTGGGCGTCGGTGACGGCGTTCTCCTGAA AGCGGTTGCACAAGCTACAGGAAGGCAACTGGAATCTGTCCGGGCT GAGGCTGCAGAGAAAGGTGACGTGGGGCTTGTGGCAGAGAATAGTC GGTCAACACAGCGGCTGATGCTGCCACCGCCCCCGCTTACGGCTAGT GGGGTATTCTCCAAATTTAGAGATATAGCACGGCTGACGGGATCAGC TTCCACTGCGAAGAAGATCGATATCATTAAGGGTTTGTTCGTGGCTT GCAGGCATTCCGAAGCACGCTTCATTGCACGCTCCCTTTCAGGGAGA CTCAGACTTGGGCTGGCCGAGCAATCTGTACTGGCGGCCCTGTCTCA GGCGGTGAGCCTTACGCCGCCCGGGCAAGAGTTCCCTCCTGCGATGG TCGATGCTGGGAAGGGAAAAACCGCCGAAGCTCGAAAAACATGGCT GGAGGAGCAAGGAATGATTTTGAAGCAGACGTTCTGTGAAGTACCG GACTTGGATCGCATCATACCTGTGCTTCTCGAACATGGTTTGGAGCG GCTCCCCGAGCATTGCAAACTCTCTCCGGGCATCCCCCTCAAGCCAA TGCTCGCCCACCCCACGCGCGGAATCAGTGAGGTACTGAAACGCTTT GAAGAGGCAGCGTTTACTTGTGAATACAAGTACGATGGCCAAAGGG CACAAATTCATGCACTTGAAGGCGGGGAAGTTAAGATATTCAGCAG GAATCAGGAGGACAACACGGGAAAATATCCTGACATAATATCTCGA ATCCCTAAAATTAAGTTGCCTAGCGTAACCAGCTTCATCCTGGATAC CGAAGCCGTGGCGTGGGATAGGGAGAAAAAGCAAATACAGCCATTT CAGGTGCTTACAACTAGAAAACGAAAAGAGGTGGACGCTAGTGAAA TCCAAGTCCAGGTATGTCTTTATGCCTTCGATTTGATATACCTTAATG GTGAGTCCCTTGTACGGGAACCGCTTAGTAGGAGGCGGCAGTTGCTG AGGGAAAATTTTGTCGAAACTGAGGGAGAGTTTGTATTTGCAACGTC ATTGGATACAAAGGACATAGAACAAATAGCAGAATTTCTGGAGCAG TCAGTAAAAGACTCCTGCGAGGGCCTGATGGTGAAAACTCTTGATGT GGACGCCACTTATGAAATCGCAAAAAGGTCACACAATTGGCTGAAA CTTAAAAAGGATTACTTGGACGGGGTCGGGGATACCCTCGATCTCGT CGTAATCGGAGCTTATCTCGGTAGGGGGAAGCGAGCCGGGCGATAC GGAGGCTTTCTCTTGGCTAGTTATGACGAAGATTCCGAAGAGCTGCA GGCCATATGCAAGCTTGGAACGGGTTTCAGCGATGAGGAATTGGAG GAGCATCATCAGAGCTTGAAGGCACTGGTGCTCCCCTCTCCTAGGCC GTACGTTAGAATAGACGGAGCAGTGATACCCGATCATTGGCTCGATC CGTCAGCTGTTTGGGAGGTGAAGTGTGCAGACCTGTCCCTCTCTCCT ATTTACCCTGCAGCACGCGGTCTGGTTGACTCTGACAAAGGGATTAG CTTGAGGTTCCCTAGATTTATTCGGGTGCGCGAAGATAAACAGCCTG AACAGGCGACAACGTCCGCGCAGGTCGCATGCCTTTATCGAAAACA	

【表９－４】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	GAGTCAGATCCAGAATCAACAAGGAGAAGATTCAGGGAGTGACCCG GAGGACACTTATAGTGGCGGCTCAAAACGAACCGCCGATAGTCAGC ATTCAACACCTCCAAAAACTAAAAGGAAAGTCGAGTTTGAGCCAAA GAAGAAGCGCAAAGTCTAA	
NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(119-919)-bpNLS	MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSK KFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYH EKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQL PGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIK PILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQE DFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWN FEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIEC FDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTL FEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDK QSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQ KGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGR DMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSD FRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDY KVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLI ETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKS VKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI DLSQLGGDSGGSSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVSGGSSGGSPKRRTAR KQLPKRTIQEVLEEQSEDEDREAKRKKEEEEEETPKESLTEAEVATEKEG EDGDQPTTPPKPLKTSKAETPTESVSEPEVATKQELQEEEEQTKPPRRAP KTLSSFFTPRKPAVKKEVKEEEPGAPGKEGAAEGPLDPSGYNPAKNNYH PVEDACWKPGQKVPYLAVARTFEKIEEVSARLRMVETLSNLLRSVVAL	126

【表９－５】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	SPPDLLPVLYLSLNHLGPPQQGLELGVGDGVLLKAVAQATGRQLESVR AEAAEKGDVGLVAENSRSTQRLMLPPPPLTASGVFSKFRDIARLTGSAS TAKKIDIIKGLFVACRHSEARFIARSLSGRLRLGLAEQSVLAALSQAVSL TPPGQEFPPAMVDAGKGKTAEARKTWLEEQGMILKQTFCEVPDLDRIIP VLLEHGLERLPEHCKLSPGIPLKPMLAHPTRGISEVLKRFEEAAFTCEYK YDGQRAQIHALEGGEVKIFSRNQEDNTGKYPDIISRIPKIKLPSVTSFILDT EAVAWDREKKQIQPFQVLTTRKRKEVDASEIQVQVCLYAFDLIYLNGES LVREPLSRRRQLLRENFVETEGEFVFATSLDTKDIEQIAEFLEQSVKDSCE GLMVKTLDVDATYEIAKRSHNWLKLKKDYLDGVGDTLDLVVIGAYLG RGKRAGRYGGFLLASYDEDSEELQAICKLGTGFSDEELEEHHQSLKALV LPSPRPYVRIDGAVIPDHWLDPSAVWEVKCADLSLSPIYPAARGLVDSD KGISLRFPRFIRVREDKQPEQATTSAQVACLYRKQSQIQNQQGEDSGSDP EDTYSGGSKRTADSQHSTPPKTKRKVEFEPKKKRKV*	
NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(233-919)-bpNLS	atgaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtcgacaagaagtacagc atcggcctggacatcggcaccaactctgtgggctgggccgtgatcaccgacgagtacaaggtgcccagcaaga aattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagc ggcgaaacagccgaggccacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggat ctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttcttccacagactggaagagtc cttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcacccccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctacc acgagaagtaccccaccatctaccacctgagaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggct gatctatctggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctgaaccccgacaa cagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaacg ccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgc ccagctgccccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgaccccaact tcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctgga caacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaagaacctgtccgacgccatcct gctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggcccccctgagcgcctctatgatcaagagatacg acgagcaccaccaggacctgaccctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagatt ttcttcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagtt catcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctg cggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgc ggcggcaggaagattttttacccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcc cctactacgtgggccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcgaggaaaccat caccccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcatcgagcggatgaccaact tcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcacagcctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacg agctgaccaaagtgaaatacgtgaccgagggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcgagcagaaaaagg ccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaaa	127

【表９－６】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	atcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccctgggcacataccacgatc tgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgac cctgacactgtttgaggacagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagt gatgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccg ggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacggcttcgccaacagaaacttcatgcagct gatccacgacgacagcctgaccttaaagaggacatccagaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctg cacgagcacattgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtgg acgagctcgtgaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagagagaaccaga ccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggcatcaaagagctgggc agccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgca gaatgggcgggatatgtacgtggaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggacgctatcgt gcctcagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaag agcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacgccaagc tgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccgg cttcatcaagagacagctggtggaaacccggcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatga acactaagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctggtgtcc gatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctga acgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaag gtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttcta cagcaacatcatgaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcga gacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggattttgccaccgtgcggaaagtgctgagc atgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggcttcagcaaagagtctatcctgcccaa gaggaacagcgataagctgatcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccc caccgtggcctattctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaag agctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgactttctggaagccaagggct acaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttcgagctggaaaacggccggaag agaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctg tacctggccagccactatgagaagctgaagggctccccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtggaaca gcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaagagagtgatcctggccgacgcta atctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatc cacctgtttaccctgaccaatctgggagccccctgccgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccggaagaggt acaccagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggat cgacctgtctcagctgggaggtgacTCCGGCGGAAGCTCTGGTGGCAGCAAGCGGA CCGCCGACGGCTCTGAATTCGAGAGCCCTAAGAAGAAAAGAAAGGT GAGCGGAGGCTCTAGCGGCGGAAGCACACCCAGGAAACCAGCCGTG AAAAAAGAGGTTAAAGAAGAGGAACCTGGGGCTCCGGGAAAGGAG GGAGCAGCGGAAGGTCCGCTCGACCCTTCAGGATACAACCCAGCCA	

【表９－７】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	AAAACAACTACCACCCCGTAGAGGATGCTTGCTGGAAGCCAGGCCA AAAGGTGCCCTATTTGGCCGTTGCTAGGACTTTCGAAAAAATTGAGG AGGTGAGCGCGCGACTCAGAATGGTAGAGACTCTGTCTAACCTCCTT CGCTCCGTAGTGGCTCTTTCACCTCCAGATCTTCTTCCAGTGCTGTAC CTGAGCCTGAACCACTTGGGCCCTCCCCAGCAGGGACTGGAACTGG GCGTAGGGGACGGAGTATTGCTGAAGGCTGTTGCTCAGGCAACCGG ACGACAGCTCGAGTCTGTGCGAGCAGAAGCTGCAGAAAAGGGGGAC GTCGGGTTGGTTGCCGAAAATTCAAGATCTACCCAACGATTGATGTT GCCACCGCCGCCTCTGACTGCGTCAGGTGTATTCTCCAAGTTCCGGG ATATTGCCAGGCTTACGGGTAGCGCTTCCACTGCTAAAAAGATCGAC ATAATAAAAGGTCTGTTCGTCGCTTGTCGCCATTCAGAGGCGAGGTT TATAGCCAGATCCCTTTCCGGACGACTTCGACTCGGCTTGGCTGAGC AGTCAGTACTGGCAGCTTTGTCTCAAGCTGTATCACTCACGCCCCCC GGACAAGAATTTCCACCCGCCATGGTTGACGCAGGCAAGGGTAAGA CTGCTGAGGCAAGAAAGACGTGGCTGGAGGAACAAGGTATGATACT TAAACAAACGTTTTGCGAAGTTCCGGACTTGGACCGGATCATACCTG TGTTGCTGGAGCACGGCCTCGAGCGCTTGCCCGAACACTGTAAACTG TCTCCAGGAATACCTCTCAAACCCATGTTGGCTCATCCTACGAGGGG AATCTCAGAGGTACTTAAACGGTTTGAAGAAGCCGCTTTCACGTGCG AATACAAGTATGATGGTCAGAGAGCGCAAATCCACGCATTGGAAGG GGGTGAGGTAAAGATTTTTTCAAGGAATCAGGAGGACAATACAGGG AAGTACCCCGATATCATCAGTCGGATTCCTAAAATTAAGCTTCCATC AGTCACGTCCTTCATACTGGACACTGAGGCAGTGGCTTGGGACCGAG AGAAGAAGCAGATACAACCCTTTCAGGTACTTACAACCAGAAAGCG CAAGGAAGTCGACGCTTCTGAGATTCAAGTACAAGTCTGCCTTTATG CGTTTGACCTGATCTATCTTAATGGAGAGAGTTTGGTGAGAGAACCC TTGAGCAGACGACGGCAGCTCTTGAGAGAAAATTTCGTAGAAACTG AGGGGGAGTTCGTCTTTGCGACTAGTCTCGACACCAAAGACATTGAG CAAATCGCGGAATTCCTCGAACAGTCAGTTAAAGACTCCTGCGAAG GTCTGATGGTTAAGACTCTTGACGTGGATGCTACCTACGAGATAGCT AAGCGGTCACACAATTGGCTGAAACTGAAAAAGGACTATCTGGATG GAGTTGGGGACACGCTGGATTTGGTCGTTATCGGGGCCTATCTGGGA CGCGGTAAGCGGGCAGGGAGATATGGTGGATTCCTCCTCGCTTCATA CGATGAGGACTCTGAAGAGCTGCAGGCTATATGCAAACTTGGGACG GGTTTTTCCGATGAAGAATTGGAGGAACATCATCAGTCACTGAAGGC CCTTGTATTGCCAAGTCCACGCCCATACGTACGAATCGATGGAGCAG TAATCCCTGACCACTGGCTTGACCCGTCCGCCGTCTGGGAAGTAAAG	

【表９－８】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	TGCGCGGATCTCTCTCTCAGTCCGATCTACCCAGCCGCACGGGGGCT GGTTGACAGTGACAAGGGTATCAGCCTGCGATTTCCTCGATTCATAC GCGTCCGGGAAGACAAGCAACCGGAACAGGCTACGACCTCTGCACA GGTCGCATGTTTGTATAGAAAACAGAGCCAAATTCAGAATCAACAA GGCGAAGACAGTGGGTCCGATCCTGAAGATACCTACTCAGGCGGCA GTAAACGGACAGCTGATAGCCAACACTCAACTCCTCCGAAGACTAA AAGGAAGGTAGAGTTCGAACCAAAAAAGAAAAGGAAAGTGTAA	
NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(233-919)-bpNLS	MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSK KFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYH EKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQL PGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIK PILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQE DFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWN FEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIEC FDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTL FEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDK QSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQ KGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGR DMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSD FRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDY KVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLI ETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKS VKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI DLSQLGGDSGGSSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVSGGSSGGSTPRKPAV KKEVKEEEPGAPGKEGAAEGPLDPSGYNPAKNNYHPVEDACWKPGQK	128

【表９－９】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	VPYLAVARTFEKIEEVSARLRMVETLSNLLRSVVALSPPDLLPVLYLSLN HLGPPQQGLELGVGDGVLLKAVAQATGRQLESVRAEAAEKGDVGLVA ENSRSTQRLMLPPPPLTASGVFSKFRDIARLTGSASTAKKIDIIKGLFVAC RHSEARFIARSLSGRLRLGLAEQSVLAALSQAVSLTPPGQEFPPAMVDA GKGKTAEARKTWLEEQGMILKQTFCEVPDLDRIIPVLLEHGLERLPEHC KLSPGIPLKPMLAHPTRGISEVLKRFEEAAFTCEYKYDGQRAQIHALEGG EVKIFSRNQEDNTGKYPDIISRIPKIKLPSVTSFILDTEAVAWDREKKQIQP FQVLTTRKRKEVDASEIQVQVCLYAFDLIYLNGESLVREPLSRRRQLLRE NFVETEGEFVFATSLDTKDIEQIAEFLEQSVKDSCEGLMVKTLDVDATY EIAKRSHNWLKLKKDYLDGVGDTLDLVVIGAYLGRGKRAGRYGGFLL ASYDEDSEELQAICKLGTGFSDEELEEHHQSLKALVLPSPRPYVRIDGAV IPDHWLDPSAVWEVKCADLSLSPIYPAARGLVDSDKGISLRFPRFIRVRE DKQPEQATTSAQVACLYRKQSQIQNQQGEDSGSDPEDTYSGGSKRTAD SQHSTPPKTKRKVEFEPKKKRKV*	
NLS-nCas9-リンカー-SplintR-bpNLS	atgaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtcgacaagaagtacagc atcggcctggacatcggcaccaactctgtgggctgggccgtgatcaccgacgagtacaaggtgcccagcaaga aattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagc ggcgaaacagccgaggccacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggat ctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttcttccacagactggaagagtc cttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctacc acgagaagtaccccaccatctaccacctgagaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggct gatctatctggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctgaaccccgacaa cagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaacg ccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgc ccagctgccccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgaccccaact tcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctgga caacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaagaacctgtccgacgccatcct gctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggcccccctgagcgcctctatgatcaagagatacg acgagcaccaccaggacctgaccctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagatt ttcttcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagtt catcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctg cggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgc ggcggcaggaagatttttacccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcc cctactacgtgggccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcgaggaaaccat caccccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcatcgagcggatgaccaact tcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcacagcctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacg agctgaccaaagtgaaatacgtgaccgagggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcgagcagaaaaagg	129

【表９－１０】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	ccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaaa atcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccctgggcacataccacgatc tgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgac cctgacactgtttgaggacagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagt gatgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccg ggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacggcttcgccaacagaaacttcatgcagct gatccacgacgacagcctgaccttaaagaggacatccagaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctg cacgagcacattgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtgg acgagctcgtgaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagagagaaccaga ccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggcatcaaagagctgggc agccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgca gaatgggcgggatatgtacgtggaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggacgctatcgt gcctcagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaag agcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacgccaagc tgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccgg cttcatcaagagacagctggtggaaacccggcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatga acactaagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctggtgtcc gatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctga acgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaag gtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttcta cagcaacatcatgaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcga gacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggattttgccaccgtgcggaaagtgctgagc atgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggcttcagcaaagagtctatcctgcccaa gaggaacagcgataagctgatcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccc caccgtggcctattctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaag agctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgactttctggaagccaagggct acaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttcgagctggaaaacggccggaag agaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctg tacctggccagccactatgagaagctgaagggctccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtggaaca gcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaagagagtgatcctggccgacgcta atctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatc cacctgtttaccctgaccaatctgggagcccctgccgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccggaagaggt acaccagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggat cgacctgtctcagctgggaggtgacTCCGGCGGAAGCTCTGGTGGCAGCAAGCGGA CCGCCGACGGCTCTGAATTCGAGAGCCCTAAGAAGAAAAGAAAGGT GAGCGGAGGCTCTAGCGGCGGAAGCATGGCAATCACTAAGCCCCTC TTGGCGGCGACTTTGGAAAACATCGAGGATGTGCAATTCCCGTGCCT	

【表９－１１】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	TGCCACACCAAAGATAGACGGGATCCGATCAGTGAAGCAAACGCAG ATGCTCTCTAGAACGTTCAAGCCTATTAGAAACTCAGTGATGAATCG GCTCTTGACTGAGCTGTTGCCGGAAGGCAGCGATGGGGAAATATCTA TCGAGGGAGCCACATTTCAAGACACTACGAGCGCCGTAATGACTGG ACATAAGATGTATAATGCTAAATTCTCCTACTATTGGTTTGACTATGT CACTGATGACCCTCTTAAGAAATATATAGACCGAGTGGAGGATATG AAAAATTATATTACTGTACACCCGCATATTCTGGAACATGCCCAAGT TAAGATTATTCCTCTCATTCCCGTCGAGATTAATAATATCACAGAAC TGCTTCAGTATGAGCGCGACGTATTGTCCAAAGGCTTTGAAGGGGTT ATGATACGCAAACCGGACGGCAAGTACAAGTTCGGAAGAAGCACAT TGAAAGAGGGTATATTGCTGAAGATGAAGCAGTTTAAGGATGCTGA GGCAACAATAATCAGCATGACAGCACTTTTTAAAAATACCAACACG AAAACTAAGGACAATTTTGGTTATAGTAAGCGGTCAACGCACAAAA GTGGGAAGGTAGAAGAAGACGTAATGGGTAGCATTGAGGTGGATTA TGACGGGGTGGTTTTCAGCATAGGGACTGGGTTTGATGCAGATCAAC GGAGGGACTTTTGGCAGAACAAAGAATCATATATAGGCAAAATGGT AAAGTTCAAATACTTCGAAATGGGAAGTAAAGACTGCCCCAGATTC CCTGTATTCATTGGCATCAGGCACGAGGAGGACAGGAGTGGGGGAT CAAAGCGGACTGCTGATAGTCAGCATAGTACTCCACCCAAGACCAA GCGGAAAGTTGAGTTTGAGCCGAAGAAAAAGCGAAAAGTGTAA	
NLS-nCas9-リンカー-SplintR-bpNLS	MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSK KFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYH EKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQL PGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIK PILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQE DFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWN FEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIEC FDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTL FEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDK QSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQ KGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGR	130

【表９－１２】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	DMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSD FRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDY KVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLI ETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKS VKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI DLSQLGGDSGGSSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVSGGSSGGSMAITKPL LAATLENIEDVQFPCLATPKIDGIRSVKQTQMLSRTFKPIRNSVMNRLLT ELLPEGSDGEISIEGATFQDTTSAVMTGHKMYNAKFSYYWFDYVTDDP LKKYIDRVEDMKNYITVHPHILEHAQVKIIPLIPVEINNITELLQYERDVL SKGFEGVMIRKPDGKYKFGRSTLKEGILLKMKQFKDAEATIISMTALFK NTNTKTKDNFGYSKRSTHKSGKVEEDVMGSIEVDYDGVVFSIGTGFDA DQRRDFWQNKESYIGKMVKFKYFEMGSKDCPRFPVFIGIRHEEDRSGGS KRTADSQHSTPPKTKRKVEFEPKKKRKV*	
NLS-nCas9-リンカー-T4LIG-bpNLS	atgaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtcgacaagaagtacagc atcggcctggacatcggcaccaactctgtgggctgggccgtgatcaccgacgagtacaaggtgcccagcaaga aattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagc ggcgaaacagccgaggccacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggat ctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttcttccacagactggaagagtc cttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctacc acgagaagtaccccaccatctaccacctgagaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggct gatctatctggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctgaaccccgacaa cagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaacg ccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgc ccagctgccccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgaccccaact tcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctgga caacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaagaacctgtccgacgccatcct gctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggcccccctgagcgcctctatgatcaagagatacg acgagcaccaccaggacctgaccctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagatt ttcttcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagtt catcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctg cggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgc	131

【表９－１３】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	ggcggcaggaagatttttacccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcc cctactacgtgggccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcgaggaaaccat caccccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcatcgagcggatgaccaact tcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcacagcctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacg agctgaccaaagtgaaatacgtgaccgagggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcgagcagaaaaagg ccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaaa atcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccctgggcacataccacgatc tgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgac cctgacactgtttgaggacagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagt gatgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccg ggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacggcttcgccaacagaaacttcatgcagct gatccacgacgacagcctgaccttaaagaggacatccagaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctg cacgagcacattgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtgg acgagctcgtgaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagagagaaccaga ccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggcatcaaagagctgggc agccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgca gaatgggcgggatatgtacgtggaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggacgctatcgt gcctcagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaag agcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacgccaagc tgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccgg cttcatcaagagacagctggtggaaacccggcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatga acactaagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctggtgtcc gatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctga acgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaag gtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttcta cagcaacatcatgaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcga gacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggattttgccaccgtgcggaaagtgctgagc atgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggcttcagcaaagagtctatcctgcccaa gaggaacagcgataagctgatcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccc caccgtggcctattctgtggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaag agctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgacttttctggaagccaagggct acaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttcgagctggaaaacggccggaag agaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctg tacctggccagccactatgagaagctgaagggctccccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtggaaca gcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaagagagtgatcctggccgacgcta atctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatc cacctgtttaccctgaccaatctgggagcccctgccgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccggaagaggt	

【表９－１４】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	acaccagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggat cgacctgtctcagctgggaggtgacTCCGGCGGAAGCTCTGGTGGCAGCAAGCGGA CCGCCGACGGCTCTGAATTCGAGAGCCCTAAGAAGAAAAGAAAGGT GAGCGGAGGCTCTAGCGGCGGAAGCATGATTCTTAAAATTCTTAACG AGATTGCGAGTATTGGCAGCACGAAACAAAAGCAGGCCATATTGGA AAAGAATAAGGACAATGAGTTGCTTAAACGCGTGTATAGGCTCACTT ACTCTCGCGGACTGCAATACTATATTAAAAAATGGCCTAAGCCCGGC ATCGCTACTCAAAGCTTCGGAATGCTTACGCTGACAGATATGCTCGA CTTCATCGAGTTTACTCTCGCAACAAGGAAGTTGACTGGCAACGCCG CGATTGAAGAATTGACGGGTTATATCACGGACGGGAAGAAGGATGA TGTTGAGGTGCTGAGGCGCGTTATGATGCGCGACCTCGAATGTGGTG CCTCAGTTTCCATAGCCAATAAAGTTTGGCCAGGCTTGATCCCGGAG CAGCCACAGATGCTGGCCAGTAGCTACGACGAGAAGGGTATTAACA AAAATATCAAGTTTCCAGCGTTTGCACAACTTAAAGCGGATGGGGCG CGGTGTTTCGCCGAAGTCCGGGGTGACGAATTGGACGATGTGCGCCT TCTGAGTCGCGCAGGAAATGAATATCTGGGGCTTGACCTCTTGAAGG AGGAGCTGATTAAGATGACAGCAGAAGCCAGGCAGATCCATCCAGA GGGGGTACTTATTGATGGTGAACTCGTATACCATGAGCAGGTTAAGA AGGAGCCAGAGGGTTTGGATTTCCTCTTTGACGCCTATCCCGAGAAT TCAAAGGCAAAGGAGTTCGCCGAGGTTGCAGAATCAAGAACGGCTT CCAACGGCATAGCGAATAAATCACTCAAAGGAACTATATCTGAAAA GGAGGCACAGTGTATGAAATTCCAAGTGTGGGACTATGTGCCGCTTG TCGAGATTTACAGCTTGCCTGCTTTCCGATTGAAGTACGATGTACGG TTTAGTAAGCTCGAGCAAATGACTTCAGGTTACGATAAAGTCATCTT GATTGAGAACCAGGTCGTTAATAATCTTGACGAGGCGAAGGTCATAT ATAAGAAATATATAGATCAAGGGCTCGAGGGTATCATTCTGAAGAA TATAGATGGCTTGTGGGAAAACGCCAGGTCCAAAAACCTGTATAAG TTTAAGGAAGTAATAGATGTAGATTTGAAAATAGTTGGAATTTACCC CCATCGGAAGGACCCCACGAAAGCGGGTGGGTTTATCCTCGAGAGC GAGTGTGGGAAGATAAAAGTGAATGCCGGCTCCGGATTGAAGGACA AGGCAGGTGTGAAAAGTCATGAGCTCGATCGGACGAGAATAATGGA AAACCAGAATTACTACATTGGAAAGATTTTGGAATGCGAGTGTAAC GGCTGGTTGAAGAGCGACGGACGCACCGATTACGTGAAACTCTTTCT GCCAATTGCAATCAGGTTGAGAGAGGATAAGACTAAGGCCAATACT TTCGAGGACGTCTTCGGAGACTTTCACGAAGTCACTGGGCTTTCTGG GGGTAGTAAGAGAACTGCAGATAGCCAGCATTCAACGCCGCCAAAA ACAAAGCGAAAGGTAGAATTCGAACCAAAGAAAAAGCGGAAAGTA	

【表９－１５】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	TAA	
NLS-nCas9-リンカー-T4LIG-bpNLS	MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSK KFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYH EKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQL PGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIK PILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQE DFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWN FEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIEC FDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTL FEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDK QSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQ KGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGR DMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSD FRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDY KVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLI ETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKS VKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI DLSQLGGDSGGSSGGSKRTADGSEFESPKKKRKVSGGSSGGSMILKILN EIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIAT QSFGMLTLTDMLDFIEFTLATRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLR RVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKFPAF AQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAE ARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKEPEGLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAE SRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYD VRFSKLEQMTSGYDKVILIENQVVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNI	132

【表９－１６】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	DGLWENARSKNLYKFKEVIDVDLKIVGIYPHRKDPTKAGGFILESECGKI KVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTRIMENQNYYIGKILECECNGWLKSDG RTDYVKLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGLSGGSKRTADSQ HSTPPKTKRKVEFEPKKKRKV*	
NLS-nCas9-LZ	atgaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtcgacaagaagtacagc atcggcctggacatcggcaccaactctgtgggctgggccgtgatcaccgacgagtacaaggtgcccagcaaga aattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagc ggcgaaacagccgaggccacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggat ctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttcttccacagactggaagagtc cttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctacc acgagaagtaccccaccatctaccacctgagaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggct gatctatctggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctgaaccccgacaa cagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaacg ccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgc ccagctgccccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgaccccaact tcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctgga caacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaagaacctgtccgacgccatcct gctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggcccccctgagcgcctctatgatcaagagatacg acgagcaccaccaggacctgaccctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagatt ttcttcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagtt catcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctg cggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatcccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgc ggcggcaggaagatttttacccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcc cctactacgtgggccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcgaggaaaccat caccccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcatcgagcggatgaccaact tcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcacagcctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacg agctgaccaaagtgaaatacgtgaccgagggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcgagcagaaaaagg ccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaaa atcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccctgggcacataccacgatc tgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgac cctgacactgtttgaggacagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagt gatgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccg ggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacggcttcgccaacagaaacttcatgcagct gatccacgacgacagcctgaccttaaagaggacatccagaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctg cacgagcacattgccaatctggccggcagcccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtgg acgagctcgtgaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagagagaaccaga ccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggcatcaaagagctgggc	133

【表９－１７】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	agccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgca gaatgggcgggatatgtacgtggaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggacgctatcgt gcctcagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaag agcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacgccaagc tgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccgg cttcatcaagagacagctggtggaaacccggcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatga acactaagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctggtgtcc gatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctga acgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaag gtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttcta cagcaacatcatgaacttttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcga gacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggattttgccaccgtgcggaaagtgctgagc atgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggcttcagcaaagagtctatcctgcccaa gaggaacagcgataagctgatcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccc caccgtggcctattctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaag agctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgactttctggaagccaagggct acaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttcgagctggaaaacggccggaag agaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctg tacctggccagccactatgagaagctgaagggctccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtggaaca gcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaagagagtgatcctggccgacgcta atctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatc cacctgtttaccctgaccaatctgggagcccctgccgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccggaagaggt acaccagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggat cgacctgtctcagctgggaggtgacggctcaaaaagaaccgccgacggcagcgaattcgagcccaagaagaa gaggaaagtcGGAGGAGGAGGCAGTGGTGGGCGACTTGAAATTAGAGCC GCGTTCCTGCGCCAGAGGAATACGGCTCTCCGCACGGAGGTAGCCG AACTTGAGCAAGAAGTACAGAGATTGGAGAACGAGGTTTCACAGTA TGAGACACGATATGGCCCCCTTGGCGGCGGAAAGtaa	

【表９－１８】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
NLS1-hFEN1-リンカー1-nCas9-リンカー2-T4LIG-NLS2	KRTADGSEFESPKKKRKVMGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKV AIDASMSIYQFLIAVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMMENGIK PVYVFDGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQAQAAGAEQEVEKFTK RLVKVTKQHNDECKHLLSLMGIPYLDAPSEAEASCAALVKAGKVYAA ATEDMDCLTFGSPVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLSRILQELGLNQEQFV DLCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHKSIEEIVRRLDPNKYPVPENWL HKEAHQLFLEPEVLDPESVELKWSEPNEEELIKFMCGEKQFSEERIRSGV KRLSKSRQGSTQGRLDDFFKVTGSLSSAKRKEPEPKGSTKKKAKTGAA GKFKRGKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSMDKKYSIGLD IGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETA EATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEE DKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLAL AHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVD AKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFD LAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQS KNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRT FDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPL ARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLP NEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDL LFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKII KDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQ LKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHD DSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQS FLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLIT QRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTK YDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLN AVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFF YSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSP TVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKG YKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNF LYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADA NLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKR YTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSSGGSKRTADGSEF	134

【表９－１９】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	ESPKKKRKVSGGSSGGSMILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKR VYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGMLTLTDMLDFIEFTLATRKLT GNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLI PEQPQMLASSYDEKGINKNIKFPAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVR LLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE PEGLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQC MKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVRFSKLEQMTSGYDKVILIENQV VNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIDVD LKIVGIYPHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDR TRIMENQNYYIGKILECECNGWLKSDGRTDYVKLFLPIAIRLREDKTKA NTFEDVFGDFHEVTGLSGGSKRTADSQHSTPPKTKRKVEFEPKKKRKV	

【表９－２０】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
NLS1-hFEN1-リンカー1-T4LIG-リンカー2-nCas9-NLS2	KRTADGSEFESPKKKRKVMILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLK RVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGMLTLTDMLDFIEFTLATRKL TGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGL IPEQPQMLASSYDEKGINKNIKFPAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVR LLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE PEGLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQC MKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVRFSKLEQMTSGYDKVILIENQV VNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIDVD LKIVGIYPHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDR TRIMENQNYYIGKILECECNGWLKSDGRTDYVKLFLPIAIRLREDKTKA NTFEDVFGDFHEVTGLSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSM GIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSIYQFLIAVRQGGD VLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMMENGIKPVYVFDGKPPQLKSGELAK RSERRAEAEKQLQQAQAAGAEQEVEKFTKRLVKVTKQHNDECKHLLS LMGIPYLDAPSEAEASCAALVKAGKVYAAATEDMDCLTFGSPVLMRHL TASEAKKLPIQEFHLSRILQELGLNQEQFVDLCILLGSDYCESIRGIGPKR AVDLIQKHKSIEEIVRRLDPNKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPESVE LKWSEPNEEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRLDDFFK VTGSLSSAKRKEPEPKGSTKKKAKTGAAGKFKRGKSGGSSGGSKRTAD GSEFESPKKKRKVSGGSSGGSMDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKN RICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNP DNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLI AQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDL DNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRY DEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFY KFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILR RQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETIT PWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYN ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVL TLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGI RDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDS LHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQ TTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRG	135

【表９－２１】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	KSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFV YGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSK ESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSK KLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFEL ENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQ KQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGL YETRIDLSQLGGDSGGSKRTADSQHSTPPKTKRKVEFEPKKKRKV	

【表９－２２】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
NLS1-nCas9-リンカー1-hFEN1-リンカー2-T4LIG-NLS2	KRTADGSEFESPKKKRKVMDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSK KFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYH EKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQL PGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIK PILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQE DFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWN FEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIEC FDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTL FEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDK QSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQ KGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGR DMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSD FRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDY KVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLI ETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKS VKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI DLSQLGGDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSMGIQGLAKL IADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSIYQFLIAVRQGGDVLQNEEGE TTSHLMGMFYRTIRMMENGIKPVYVFDGKPPQLKSGELAKRSERRAEA EKQLQQAQAAGAEQEVEKFTKRLVKVTKQHNDECKHLLSLMGIPYLD APSEAEASCAALVKAGKVYAAATEDMDCLTFGSPVLMRHLTASEAKK LPIQEFHLSRILQELGLNQEQFVDLCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQK HKSIEEIVRRLDPNKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPESVELKWSEP NEEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRLDDFFKVTGSLS SAKRKEPEPKGSTKKKAKTGAAGKFKRGKSGGSSGGSKRTADGSEFES	136

【表９－２３】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	PKKKRKVSGGSSGGSMILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVY RLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGMLTLTDMLDFIEFTLATRKLTGN AAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGLIPE QPQMLASSYDEKGINKNIKFPAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVRLL SRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKEPE GLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQCMK FQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVRFSKLEQMTSGYDKVILIENQVVNN LDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIDVDLKIV GIYPHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDRTRIM ENQNYYIGKILECECNGWLKSDGRTDYVKLFLPIAIRLREDKTKANTFE DVFGDFHEVTGLSGGSKRTADSQHSTPPKTKRKVEFEPKKKRKV	

【表９－２４】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
NLS1-T4LIG-リンカー1-nCas9-リンカー2-hFEN1-NLS2	KRTADGSEFESPKKKRKVMILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLK RVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGMLTLTDMLDFIEFTLATRKL TGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGL IPEQPQMLASSYDEKGINKNIKFPAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVR LLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE PEGLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQC MKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVRFSKLEQMTSGYDKVILIENQV VNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIDVD LKIVGIYPHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDR TRIMENQNYYIGKILECECNGWLKSDGRTDYVKLFLPIAIRLREDKTKA NTFEDVFGDFHEVTGLSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSM DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGA LLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFH RLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDK ADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEE NPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGL TPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNL SDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEK YKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRE DLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFR IPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMT NFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQ KKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGT YHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFD DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRN FMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVK VVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKE LGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDV DAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQL LNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQIL DSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHH AHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGK ATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFA TVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKK YGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPI DFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELAL PSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSK	137

【表９－２５】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	RVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYF DTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSSGGSK RTADGSEFESPKKKRKVSGGSSGGSMGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKS YFGRKVAIDASMSIYQFLIAVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIR MMENGIKPVYVFDGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQAQAAGAE QEVEKFTKRLVKVTKQHNDECKHLLSLMGIPYLDAPSEAEASCAALVK AGKVYAAATEDMDCLTFGSPVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLSRILQELG LNQEQFVDLCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHKSIEEIVRRLDPNKY PVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPESVELKWSEPNEEELIKFMCGEKQFS EERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRLDDFFKVTGSLSSAKRKEPEPKGSTKK KAKTGAAGKFKRGKSGGSKRTADSQHSTPPKTKRKVEFEPKKKRKV	

【表９－２６】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
NLS1-nCas9-リンカー1-T4LIG-リンカー2-hFEN1-NLS2	KRTADGSEFESPKKKRKVMDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSK KFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYH EKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQL PGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNL LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIK PILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQE DFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWN FEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIEC FDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTL FEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDK QSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHE HIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQ KGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGR DMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSD FRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDY KVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLI ETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILP KRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKS VKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGR KRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLF VEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAEN IIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI DLSQLGGDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSMILKILNEIA SIGSTKQKQAILEKNKDNELLKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQS FGMLTLTDMLDFIEFTLATRKLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRV MMRDLECGASVSIANKVWPGLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKFPAFAQ LKADGARCFAEVRGDELDDVRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEAR QIHPEGVLIDGELVYHEQVKKEPEGLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAESR TASNGIANKSLKGTISEKEAQCMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVR FSKLEQMTSGYDKVILIENQVVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDG LWENARSKNLYKFKEVIDVDLKIVGIYPHRKDPTKAGGFILESECGKIKV	138

【表９－２７】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	NAGSGLKDKAGVKSHELDRTRIMENQNYYIGKILECECNGWLKSDGRT DYVKLFLPIAIRLREDKTKANTFEDVFGDFHEVTGLSGGSSGGSKRTAD GSEFESPKKKRKVSGGSSGGSMGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGR KVAIDASMSIYQFLIAVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMMEN GIKPVYVFDGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQAQAAGAEQEVEK FTKRLVKVTKQHNDECKHLLSLMGIPYLDAPSEAEASCAALVKAGKVY AAATEDMDCLTFGSPVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLSRILQELGLNQEQ FVDLCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHKSIEEIVRRLDPNKYPVPEN WLHKEAHQLFLEPEVLDPESVELKWSEPNEEELIKFMCGEKQFSEERIRS GVKRLSKSRQGSTQGRLDDFFKVTGSLSSAKRKEPEPKGSTKKKAKTG AAGKFKRGKSGGSKRTADSQHSTPPKTKRKVEFEPKKKRKV	

【表９－２８】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
NLS1-T4LIG-リンカー1-hFEN1-リンカー2-nCas9-NLS2	KRTADGSEFESPKKKRKVMILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNELLK RVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGMLTLTDMLDFIEFTLATRKL TGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWPGL IPEQPQMLASSYDEKGINKNIKFPAFAQLKADGARCFAEVRGDELDDVR LLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVKKE PEGLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQC MKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVRFSKLEQMTSGYDKVILIENQV VNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIDVD LKIVGIYPHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELDR TRIMENQNYYIGKILECECNGWLKSDGRTDYVKLFLPIAIRLREDKTKA NTFEDVFGDFHEVTGLSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSM GIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSIYQFLIAVRQGGD VLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMMENGIKPVYVFDGKPPQLKSGELAK RSERRAEAEKQLQQAQAAGAEQEVEKFTKRLVKVTKQHNDECKHLLS LMGIPYLDAPSEAEASCAALVKAGKVYAAATEDMDCLTFGSPVLMRHL TASEAKKLPIQEFHLSRILQELGLNQEQFVDLCILLGSDYCESIRGIGPKR AVDLIQKHKSIEEIVRRLDPNKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPESVE LKWSEPNEEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRLDDFFK VTGSLSSAKRKEPEPKGSTKKKAKTGAAGKFKRGKSGGSSGGSKRTAD GSEFESPKKKRKVSGGSSGGSMDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKN RICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNP DNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLI AQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDL DNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRY DEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFY KFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILR RQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETIT PWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYN ELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFK KIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVL TLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGI RDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDS LHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQ TTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRG	139

【表９－２９】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	KSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFV YGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSK ESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSK KLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFEL ENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQ KQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIRE QAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGL YETRIDLSQLGGDSGGSKRTADSQHSTPPKTKRKVEFEPKKKRKV	

【表９－３０】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
NLS1-T5 EXO-リンカー1-nCas9-リンカー2-T4LIG-NLS2	KRTADGSEFESPKKKRKVMSKSWGKFIEEEEAEMASRRNLMIVDGTNL GFRFKHNNSKKPFASSYVSTIQSLAKSYSARTTIVLGDKGKSVFRLEHLP EYKGNRDEKYAQRTEEEKALDEQFFEYLKDAFELCKTTFPTFTIRGVEA DDMAAYIVKLIGHLYDHVWLISTDGDWDTLLTDKVSRFSFTTRREYHL RDMYEHHNVDDVEQFISLKAIMGDLGDNIRGVEGIGAKRGYNIIREFGN VLDIIDQLPLPGKQKYIQNLNASEELLFRNLILVDLPTYCVDAIAAVGQD VLDKFTKDILEIAEQSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSMDK KYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLE ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADL RLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPI NASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPN FKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDA ILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKE IFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLL RKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPY YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNF DKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYH DLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDK VMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFM QLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGS QILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAI VPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLN AKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSR MNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHD AYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATA KYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVR KVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYG GFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFL EAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSK YVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVI LADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTI DRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSSGGSKRTAD GSEFESPKKKRKVSGGSSGGSMILKILNEIASIGSTKQKQAILEKNKDNEL LKRVYRLTYSRGLQYYIKKWPKPGIATQSFGMLTLTDMLDFIEFTLATR	140

【表９－３１】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	KLTGNAAIEELTGYITDGKKDDVEVLRRVMMRDLECGASVSIANKVWP GLIPEQPQMLASSYDEKGINKNIKFPAFAQLKADGARCFAEVRGDELDD VRLLSRAGNEYLGLDLLKEELIKMTAEARQIHPEGVLIDGELVYHEQVK KEPEGLDFLFDAYPENSKAKEFAEVAESRTASNGIANKSLKGTISEKEAQ CMKFQVWDYVPLVEIYSLPAFRLKYDVRFSKLEQMTSGYDKVILIENQ VVNNLDEAKVIYKKYIDQGLEGIILKNIDGLWENARSKNLYKFKEVIDV DLKIVGIYPHRKDPTKAGGFILESECGKIKVNAGSGLKDKAGVKSHELD RTRIMENQNYYIGKILECECNGWLKSDGRTDYVKLFLPIAIRLREDKTK ANTFEDVFGDFHEVTGLSGGSKRTADSQHSTPPKTKRKVEFEPKKKRK V	
LZ-Splint R-bpNLS	ATGTTGGAGATAGAGGCTGCTTTCCTTGAACGGGAGAATACGGCCCT CGAGACTAGGGTTGCTGAGCTTAGACAGCGAGTCCAAAGACTGCGA AACCGGGTGTCCCAATATAGGACCAGATACGGACCTCTGGGTGGAG GGAAATCCGGTGGGAGTAGCGGCGGGTCTAGTGGCTCAGAGACACC TGGCACGAGCGAGAGTGCGACTCCTGAAAGCTCCGGCGGCAGCAGT GGGGGAAGTTCCATGGCAATCACTAAGCCCCTCTTGGCGGCGACTTT GGAAAACATCGAGGATGTGCAATTCCCGTGCCTTGCCACACCAAAG ATAGACGGGATCCGATCAGTGAAGCAAACGCAGATGCTCTCTAGAA CGTTCAAGCCTATTAGAAACTCAGTGATGAATCGGCTCTTGACTGAG CTGTTGCCGGAAGGCAGCGATGGGGAAATATCTATCGAGGGAGCCA CATTTCAAGACACTACGAGCGCCGTAATGACTGGACATAAGATGTAT AATGCTAAATTCTCCTACTATTGGTTTGACTATGTCACTGATGACCCT CTTAAGAAATATATAGACCGAGTGGAGGATATGAAAAATTATATTA CTGTACACCCGCATATTCTGGAACATGCCCAAGTTAAGATTATTCCT CTCATTCCCGTCGAGATTAATAATATCACAGAACTGCTTCAGTATGA GCGCGACGTATTGTCCAAAGGCTTTGAAGGGGTTATGATACGCAAAC CGGACGGCAAGTACAAGTTCGGAAGAAGCACATTGAAAGAGGGTAT ATTGCTGAAGATGAAGCAGTTTAAGGATGCTGAGGCAACAATAATC AGCATGACAGCACTTTTTAAAAATACCAACACGAAAACTAAGGACA ATTTTGGTTATAGTAAGCGGTCAACGCACAAAAGTGGGAAGGTAGA AGAAGACGTAATGGGTAGCATTGAGGTGGATTATGACGGGGTGGTT TTCAGCATAGGGACTGGGTTTGATGCAGATCAACGGAGGGACTTTTG GCAGAACAAAGAATCATATATAGGCAAAATGGTAAAGTTCAAATAC TTCGAAATGGGAAGTAAAGACTGCCCCAGATTCCCTGTATTCATTGG CATCAGGCACGAGGAGGACAGGAGTGGGGGATCAAAGCGGACTGCT GATAGTCAGCATAGTACTCCACCCAAGACCAAGCGGAAAGTTGAGT TTGAGCCGAAGAAAAAGCGAAAAGTGTAA	141

【表９－３２】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
LZ-T4LIG-bpNLS	ATGCTTGAGATCGAGGCGGCGTTCCTCGAAAGAGAGAACACCGCAC TTGAAACTCGCGTGGCAGAATTGAGGCAGCGGGTGCAAAGACTTAG AAATAGAGTCTCTCAGTATCGGACCCGATATGGTCCTCTGGGAGGCG GGAAGTCTGGAGGTTCAAGCGGAGGCAGTTCCGGGAGTGAGACACC GGGAACTTCTGAGAGTGCAACTCCTGAGAGCTCTGGTGGATCATCCG GAGGCTCCAGTATGATTCTTAAAATTCTTAACGAGATTGCGAGTATT GGCAGCACGAAACAAAAGCAGGCCATATTGGAAAAGAATAAGGAC AATGAGTTGCTTAAACGCGTGTATAGGCTCACTTACTCTCGCGGACT GCAATACTATATTAAAAAATGGCCTAAGCCCGGCATCGCTACTCAAA GCTTCGGAATGCTTACGCTGACAGATATGCTCGACTTCATCGAGTTT ACTCTCGCAACAAGGAAGTTGACTGGCAACGCCGCGATTGAAGAAT TGACGGGTTATATCACGGACGGGAAGAAGGATGATGTTGAGGTGCT GAGGCGCGTTATGATGCGCGACCTCGAATGTGGTGCCTCAGTTTCCA TAGCCAATAAAGTTTGGCCAGGCTTGATCCCGGAGCAGCCACAGAT GCTGGCCAGTAGCTACGACGAGAAGGGTATTAACAAAAATATCAAG TTTCCAGCGTTTGCACAACTTAAAGCGGATGGGGCGCGGTGTTTCGC CGAAGTCCGGGGTGACGAATTGGACGATGTGCGCCTTCTGAGTCGCG CAGGAAATGAATATCTGGGGCTTGACCTCTTGAAGGAGGAGCTGATT AAGATGACAGCAGAAGCCAGGCAGATCCATCCAGAGGGGGTACTTA TTGATGGTGAACTCGTATACCATGAGCAGGTTAAGAAGGAGCCAGA GGGTTTGGATTTCCTCTTTGACGCCTATCCCGAGAATTCAAAGGCAA AGGAGTTCGCCGAGGTTGCAGAATCAAGAACGGCTTCCAACGGCAT AGCGAATAAATCACTCAAAGGAACTATATCTGAAAAGGAGGCACAG TGTATGAAATTCCAAGTGTGGGACTATGTGCCGCTTGTCGAGATTTA CAGCTTGCCTGCTTTCCGATTGAAGTACGATGTACGGTTTAGTAAGC TCGAGCAAATGACTTCAGGTTACGATAAAGTCATCTTGATTGAGAAC CAGGTCGTTAATAATCTTGACGAGGCGAAGGTCATATATAAGAAAT ATATAGATCAAGGGCTCGAGGGTATCATTCTGAAGAATATAGATGG CTTGTGGGAAAACGCCAGGTCCAAAAACCTGTATAAGTTTAAGGAA GTAATAGATGTAGATTTGAAAATAGTTGGAATTTACCCCCATCGGAA GGACCCCACGAAAGCGGGTGGGTTTATCCTCGAGAGCGAGTGTGGG AAGATAAAAGTGAATGCCGGCTCCGGATTGAAGGACAAGGCAGGTG TGAAAAGTCATGAGCTCGATCGGACGAGAATAATGGAAAACCAGAA TTACTACATTGGAAAGATTTTGGAATGCGAGTGTAACGGCTGGTTGA AGAGCGACGGACGCACCGATTACGTGAAACTCTTTCTGCCAATTGCA ATCAGGTTGAGAGAGGATAAGACTAAGGCCAATACTTTCGAGGACG TCTTCGGAGACTTTCACGAAGTCACTGGGCTTTCTGGGGGTAGTAAG	142

【表９－３３】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	AGAACTGCAGATAGCCAGCATTCAACGCCGCCAAAAACAAAGCGAA AGGTAGAATTCGAACCAAAGAAAAAGCGGAAAGTATAA	
LZ-hLIG1(233-919)-bpNLS	ATGCTCGAGATCGAAGCTGCATTTCTGGAGAGGGAGAATACCGCCCT CGAAACCCGGGTGGCTGAATTGCGACAGAGAGTGCAACGGCTCCGG AATAGAGTATCTCAATATCGAACCCGCTATGGGCCTCTCGGAGGGGG TAAATCTGGCGGAAGTTCTGGCGGTAGTTCAGGAAGTGAGACACCG GGAACTAGTGAATCCGCGACTCCCGAATCAAGTGGGGGATCATCTG GAGGGTCAAGCACACCCAGGAAACCAGCCGTGAAAAAAGAGGTTAA AGAAGAGGAACCTGGGGCTCCGGGAAAGGAGGGAGCAGCGGAAGG TCCGCTCGACCCTTCAGGATACAACCCAGCCAAAAACAACTACCACC CCGTAGAGGATGCTTGCTGGAAGCCAGGCCAAAAGGTGCCCTATTTG GCCGTTGCTAGGACTTTCGAAAAAATTGAGGAGGTGAGCGCGCGAC TCAGAATGGTAGAGACTCTGTCTAACCTCCTTCGCTCCGTAGTGGCT CTTTCACCTCCAGATCTTCTTCCAGTGCTGTACCTGAGCCTGAACCAC TTGGGCCCTCCCCAGCAGGGACTGGAACTGGGCGTAGGGGACGGAG TATTGCTGAAGGCTGTTGCTCAGGCAACCGGACGACAGCTCGAGTCT GTGCGAGCAGAAGCTGCAGAAAAGGGGGACGTCGGGTTGGTTGCCG AAAATTCAAGATCTACCCAACGATTGATGTTGCCACCGCCGCCTCTG ACTGCGTCAGGTGTATTCTCCAAGTTCCGGGATATTGCCAGGCTTAC GGGTAGCGCTTCCACTGCTAAAAAGATCGACATAATAAAAGGTCTGT TCGTCGCTTGTCGCCATTCAGAGGCGAGGTTTATAGCCAGATCCCTT TCCGGACGACTTCGACTCGGCTTGGCTGAGCAGTCAGTACTGGCAGC TTTGTCTCAAGCTGTATCACTCACGCCCCCCGGACAAGAATTTCCAC CCGCCATGGTTGACGCAGGCAAGGGTAAGACTGCTGAGGCAAGAAA GACGTGGCTGGAGGAACAAGGTATGATACTTAAACAAACGTTTTGC GAAGTTCCGGACTTGGACCGGATCATACCTGTGTTGCTGGAGCACGG CCTCGAGCGCTTGCCCGAACACTGTAAACTGTCTCCAGGAATACCTC TCAAACCCATGTTGGCTCATCCTACGAGGGGAATCTCAGAGGTACTT AAACGGTTTGAAGAAGCCGCTTTCACGTGCGAATACAAGTATGATG GTCAGAGAGCGCAAATCCACGCATTGGAAGGGGGTGAGGTAAAGAT TTTTTCAAGGAATCAGGAGGACAATACAGGGAAGTACCCCGATATC ATCAGTCGGATTCCTAAAATTAAGCTTCCATCAGTCACGTCCTTCAT ACTGGACACTGAGGCAGTGGCTTGGGACCGAGAGAAGAAGCAGATA CAACCCTTTCAGGTACTTACAACCAGAAAGCGCAAGGAAGTCGACG CTTCTGAGATTCAAGTACAAGTCTGCCTTTATGCGTTTGACCTGATCT ATCTTAATGGAGAGAGTTTGGTGAGAGAACCCTTGAGCAGACGACG GCAGCTCTTGAGAGAAAATTTCGTAGAAACTGAGGGGGAGTTCGTCT	143

【表９－３４】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	TTGCGACTAGTCTCGACACCAAAGACATTGAGCAAATCGCGGAATTC CTCGAACAGTCAGTTAAAGACTCCTGCGAAGGTCTGATGGTTAAGAC TCTTGACGTGGATGCTACCTACGAGATAGCTAAGCGGTCACACAATT GGCTGAAACTGAAAAAGGACTATCTGGATGGAGTTGGGGACACGCT GGATTTGGTCGTTATCGGGGCCTATCTGGGACGCGGTAAGCGGGCAG GGAGATATGGTGGATTCCTCCTCGCTTCATACGATGAGGACTCTGAA GAGCTGCAGGCTATATGCAAACTTGGGACGGGTTTTTCCGATGAAGA ATTGGAGGAACATCATCAGTCACTGAAGGCCCTTGTATTGCCAAGTC CACGCCCATACGTACGAATCGATGGAGCAGTAATCCCTGACCACTGG CTTGACCCGTCCGCCGTCTGGGAAGTAAAGTGCGCGGATCTCTCTCT CAGTCCGATCTACCCAGCCGCACGGGGGCTGGTTGACAGTGACAAG GGTATCAGCCTGCGATTTCCTCGATTCATACGCGTCCGGGAAGACAA GCAACCGGAACAGGCTACGACCTCTGCACAGGTCGCATGTTTGTATA GAAAACAGAGCCAAATTCAGAATCAACAAGGCGAAGACAGTGGGTC CGATCCTGAAGATACCTACTCAGGCGGCAGTAAACGGACAGCTGAT AGCCAACACTCAACTCCTCCGAAGACTAAAAGGAAGGTAGAGTTCG AACCAAAAAAGAAAAGGAAAGTGTAA	
LZ-hLIG1(119-919)-bpNLS	ATGCTCGAGATCGAGGCGGCGTTCCTTGAACGCGAGAACACTGCGCT GGAAACGAGGGTCGCGGAACTCCGCCAGAGGGTTCAACGGTTGAGG AATCGAGTGAGTCAGTACCGAACCCGATATGGACCACTGGGTGGCG GGAAATCAGGGGGCTCATCCGGCGGCTCCAGCGGGAGCGAAACCCC GGGTACCTCAGAATCTGCGACGCCAGAAAGCTCAGGCGGATCTAGC GGCGGTAGTTCACCGAAGCGCCGGACTGCACGAAAGCAACTGCCAA AACGGACTATACAAGAAGTCCTGGAAGAACAAAGCGAAGATGAGG ATCGCGAAGCCAAGCGCAAGAAAGAGGAAGAGGAAGAAGAGACTC CAAAGGAGTCCTTGACCGAAGCAGAAGTCGCAACGGAGAAGGAAG GTGAGGATGGGGATCAGCCAACAACCCCGCCTAAACCTCTGAAAAC CTCTAAGGCGGAGACACCAACTGAGAGTGTCAGCGAACCGGAGGTA GCCACGAAACAAGAGCTTCAGGAGGAAGAAGAACAGACAAAGCCA CCTCGGCGGGCTCCCAAAACCCTTAGCTCCTTCTTCACGCCTCGAAA GCCAGCAGTGAAGAAAGAAGTGAAGGAGGAGGAACCTGGCGCCCCT GGAAAGGAGGGCGCAGCCGAGGGCCCGCTGGACCCTTCAGGGTATA ACCCGGCAAAAAATAATTACCACCCGGTCGAGGACGCTTGTTGGAA ACCAGGCCAAAAGGTACCTTACCTCGCCGTCGCTAGGACCTTTGAGA AGATAGAGGAAGTTAGTGCTAGGTTGAGAATGGTCGAAACCCTTAG TAACCTTCTCAGGTCCGTAGTCGCCCTTAGTCCCCCAGACCTGCTTCC GGTGCTGTACCTGTCCCTGAACCATCTCGGTCCCCCCCAACAGGGAC	144

【表９－３５】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	TGGAGTTGGGCGTCGGTGACGGCGTTCTCCTGAAAGCGGTTGCACAA GCTACAGGAAGGCAACTGGAATCTGTCCGGGCTGAGGCTGCAGAGA AAGGTGACGTGGGGCTTGTGGCAGAGAATAGTCGGTCAACACAGCG GCTGATGCTGCCACCGCCCCCGCTTACGGCTAGTGGGGTATTCTCCA AATTTAGAGATATAGCACGGCTGACGGGATCAGCTTCCACTGCGAA GAAGATCGATATCATTAAGGGTTTGTTCGTGGCTTGCAGGCATTCCG AAGCACGCTTCATTGCACGCTCCCTTTCAGGGAGACTCAGACTTGGG CTGGCCGAGCAATCTGTACTGGCGGCCCTGTCTCAGGCGGTGAGCCT TACGCCGCCCGGGCAAGAGTTCCCTCCTGCGATGGTCGATGCTGGGA AGGGAAAAACCGCCGAAGCTCGAAAAACATGGCTGGAGGAGCAAG GAATGATTTTGAAGCAGACGTTCTGTGAAGTACCGGACTTGGATCGC ATCATACCTGTGCTTCTCGAACATGGTTTGGAGCGGCTCCCCGAGCA TTGCAAACTCTCTCCGGGCATCCCCCTCAAGCCAATGCTCGCCCACC CCACGCGCGGAATCAGTGAGGTACTGAAACGCTTTGAAGAGGCAGC GTTTACTTGTGAATACAAGTACGATGGCCAAAGGGCACAAATTCATG CACTTGAAGGCGGGGAAGTTAAGATATTCAGCAGGAATCAGGAGGA CAACACGGGAAAATATCCTGACATAATATCTCGAATCCCTAAAATTA AGTTGCCTAGCGTAACCAGCTTCATCCTGGATACCGAAGCCGTGGCG TGGGATAGGGAGAAAAAGCAAATACAGCCATTTCAGGTGCTTACAA CTAGAAAACGAAAAGAGGTGGACGCTAGTGAAATCCAAGTCCAGGT ATGTCTTTATGCCTTCGATTTGATATACCTTAATGGTGAGTCCCTTGT ACGGGAACCGCTTAGTAGGAGGCGGCAGTTGCTGAGGGAAAATTTT GTCGAAACTGAGGGAGAGTTTGTATTTGCAACGTCATTGGATACAAA GGACATAGAACAAATAGCAGAATTTCTGGAGCAGTCAGTAAAAGAC TCCTGCGAGGGCCTGATGGTGAAAACTCTTGATGTGGACGCCACTTA TGAAATCGCAAAAAGGTCACACAATTGGCTGAAACTTAAAAAGGAT TACTTGGACGGGGTCGGGGATACCCTCGATCTCGTCGTAATCGGAGC TTATCTCGGTAGGGGGAAGCGAGCCGGGCGATACGGAGGCTTTCTCT TGGCTAGTTATGACGAAGATTCCGAAGAGCTGCAGGCCATATGCAA GCTTGGAACGGGTTTCAGCGATGAGGAATTGGAGGAGCATCATCAG AGCTTGAAGGCACTGGTGCTCCCCTCTCCTAGGCCGTACGTTAGAAT AGACGGAGCAGTGATACCCGATCATTGGCTCGATCCGTCAGCTGTTT GGGAGGTGAAGTGTGCAGACCTGTCCCTCTCTCCTATTTACCCTGCA GCACGCGGTCTGGTTGACTCTGACAAAGGGATTAGCTTGAGGTTCCC TAGATTTATTCGGGTGCGCGAAGACAAACAGCCTGAACAGGCGACA ACGTCCGCGCAGGTCGCATGCCTTTATCGAAAACAGAGTCAGATCCA GAATCAACAAGGAGAAGATTCAGGGAGTGACCCGGAGGACACTTAT AGTGGCGGCTCAAAACGAACCGCCGATAGTCAGCATTCAACACCTC CAAAAACTAAAAGGAAAGTCGAGTTTGAGCCAAAGAAGAAGCGCA AAGTCTAA	

【表９－３６】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
T4-LZ	ATGATCCTTAAGATTCTCAACGAAATCGCTAGTATAGGGTCCACTAA GCAGAAGCAGGCCATATTGGAAAAAAATAAGGACAATGAACTTTTG AAGAGAGTCTATAGACTGACGTACTCTAGGGGGCTCCAGTACTACAT CAAGAAATGGCCTAAACCTGGCATTGCGACGCAGTCATTCGGTATGC TGACATTGACGGATATGTTGGATTTCATTGAGTTTACGCTGGCCACC AGAAAACTTACGGGTAATGCTGCGATAGAAGAACTTACAGGGTACA TAACAGACGGGAAGAAAGATGACGTGGAAGTGCTCAGACGAGTTAT GATGCGCGATCTCGAGTGCGGCGCTAGCGTGTCAATCGCGAACAAA GTCTGGCCCGGCCTCATACCAGAGCAGCCACAGATGCTGGCATCTTC CTATGACGAAAAAGGCATAAACAAGAATATTAAATTCCCGGCCTTC GCTCAACTCAAAGCAGATGGTGCCAGGTGTTTTGCCGAAGTTCGGGG TGATGAACTTGATGACGTGCGGCTCTTGTCTAGGGCAGGTAACGAGT ACCTCGGCCTGGACTTGCTTAAAGAGGAACTGATTAAAATGACAGCT GAGGCGCGGCAGATACACCCCGAGGGCGTCCTTATCGACGGGGAGC TGGTGTATCACGAACAAGTTAAAAAGGAACCGGAGGGTCTTGATTTT CTTTTCGACGCGTATCCTGAGAACAGCAAGGCGAAAGAATTTGCAG AAGTTGCAGAAAGCAGGACCGCAAGTAATGGAATCGCTAATAAAAG CCTCAAGGGTACCATCAGCGAAAAAGAAGCCCAGTGCATGAAATTT CAAGTTTGGGACTATGTCCCCTTGGTCGAAATTTACTCCCTGCCCGC ATTCCGGCTGAAGTATGATGTTCGCTTCAGTAAACTGGAGCAAATGA CGAGCGGTTATGATAAGGTTATACTTATTGAGAATCAGGTCGTAAAT AATTTGGACGAGGCGAAAGTTATATACAAAAAGTATATAGACCAAG GGTTGGAGGGGATCATTTTGAAGAACATAGACGGACTTTGGGAGAA CGCCCGGTCCAAGAATTTGTATAAATTCAAAGAAGTCATAGATGTTG ACCTCAAGATAGTAGGTATATATCCCCACAGAAAGGACCCAACCAA AGCAGGCGGATTCATTTTGGAGTCCGAGTGTGGGAAGATAAAGGTC AATGCTGGATCTGGACTCAAGGACAAAGCTGGTGTGAAGTCACATG AACTGGACCGAACCAGGATTATGGAGAATCAGAACTATTACATCGG GAAGATATTGGAGTGTGAATGCAACGGCTGGCTTAAATCAGATGGA AGAACTGATTACGTTAAATTGTTCCTGCCCATAGCCATACGACTCCG CGAGGACAAAACGAAGGCTAACACGTTTGAAGACGTATTCGGAGAT TTCCATGAGGTGACTGGCCTTAGTGgaggctccaaacggacagcagactcccaacattca acaccccccaaaaacaaagcggaaggtagagtttgagccaaaaaagaaaagaaaggtcGGAGGAGGA GGCAGTGGTGGGCGACTTGAAATTAGAGCCGCGTTCCTGCGCCAGA GGAATACGGCTCTCCGCACGGAGGTAGCCGAACTTGAGCAAGAAGT ACAGAGATTGGAGAACGAGGTTTCACAGTATGAGACACGATATGGC CCCCTTGGCGGCGGAAAGTAA	145

【表９－３７】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
LZ-hLIG4(1-620)	ATGCTTGAGATCGAGGCGGCGTTCCTCGAAAGAGAGAACACCGCAC TTGAAACTCGCGTGGCAGAATTGAGGCAGCGGGTGCAAAGACTTAG AAATAGAGTCTCTCAGTATCGGACCCGATATGGTCCTCTGGGAGGCG GGAAGTCTGGAGGTTCAAGCGGAGGCAGTTCCGGGAGTGAGACACC GGGAACTTCTGAGAGTGCAACTCCTGAGAGCTCTGGTGGATCATCCG GAGGCTCCAGTGCAGCTTCTCAGACCTCTCAAACAGTAGCCTCTCAT GTACCGTTCGCTGACTTGTGTTCTACGCTCGAACGCATCCAGAAATC AAAGGGGCGCGCCGAGAAAATCCGGCACTTCAGAGAATTCTTGGAT TCCTGGAGGAAGTTTCATGATGCTCTCCACAAAAATCACAAAGATGT AACGGATAGTTTCTACCCTGCTATGAGACTTATACTGCCGCAGCTTG AGAGGGAACGCATGGCGTATGGTATAAAGGAGACAATGTTGGCGAA ATTGTATATTGAGCTGCTGAACTTGCCAAGAGATGGAAAGGACGCG CTCAAACTGCTGAACTATAGAACACCCACGGGTACCCATGGTGACGC CGGTGACTTTGCCATGATCGCCTATTTCGTACTGAAACCTCGATGTCT TCAAAAAGGTTCTCTTACAATTCAGCAAGTCAACGACCTGCTGGATT CAATTGCGAGTAACAACAGCGCTAAGCGAAAGGATCTCATTAAGAA AAGCCTCCTGCAGCTGATAACTCAGTCCTCTGCACTCGAACAAAAAT GGCTGATTCGGATGATTATCAAGGATTTGAAGTTGGGGGTATCTCAG CAAACTATTTTCAGCGTGTTTCACAATGATGCAGCAGAATTGCATAA TGTCACAACAGATCTTGAGAAAGTCTGCCGACAGTTGCACGACCCCT CTGTAGGCTTGAGTGACATATCTATAACACTTTTTTCTGCGTTCAAAC CCATGTTGGCTGCTATTGCGGACATAGAACACATCGAGAAAGACAT GAAACATCAGTCATTCTATATAGAGACTAAATTGGACGGCGAGAGG ATGCAAATGCACAAAGATGGTGATGTGTATAAATATTTTTCCCGCAA CGGCTACAACTACACTGATCAATTCGGAGCGTCCCCAACTGAAGGGT CCCTCACTCCTTTCATACACAATGCGTTTAAGGCCGATATTCAGATAT GTATCCTCGACGGCGAAATGATGGCGTACAATCCCAATACCCAGACC TTCATGCAAAAGGGAACGAAGTTCGATATTAAACGGATGGTTGAAG ATTCCGACCTCCAAACATGTTACTGTGTGTTTGATGTCCTGATGGTGA ATAACAAAAAACTCGGCCATGAAACCCTTCGAAAGCGATACGAAAT ACTCAGCAGTATATTTACTCCAATACCAGGCCGAATCGAGATCGTAC AGAAAACACAAGCCCATACTAAGAATGAAGTTATTGATGCACTGAA CGAAGCCATAGACAAGAGGGAAGAAGGCATAATGGTCAAGCAGCCT CTGAGTATATATAAACCTGACAAAAGGGGGGGAAGGATGGCTGAAGA TAAAGCCAGAATACGTGTCTGGTCTTATGGACGAATTGGACATTCTC ATCGTCGGAGGATATTGGGGTAAGGGTTCCAGGGGGGGGGATGATGT CCCACTTTCTGTGTGCGGTTGCCGAGAAACCGCCCCCAGGGGAAAAA	146

10 20 30 40 50

【表９－３８】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	CCATCAGTGTTCCATACGTTGTCACGCGTCGGCTCAGGTTGTACGAT GAAGGAACTTTACGATCTGGGGTTGAAACTCGCCAAATATTGGAAG CCATTCCATCGGAAAGCACCGCCCTCTAGTATCTTGTGTGGGACGGA GAAGCCAGAAGTTTATATAGAGCCATGTAACTCAGTAATTGTTCAAA TCAAAGCCGCAGAGATCGTCCCGTCAGACATGTACAAGACTGGATG CACCCTTAGATTTCCTCGCATCGAAAAAATAAGAGATGATAAAGAGT GGCATGAGTGCATGACTCTTGACGACCTTGAACAGCTCCGCGGGAA GGCCAGCGGTAAACTGGCTAGTAAGCACCTCTACATCGGGGGTGAC AGTGgaggctccaaacggacagcagactcccaacattcaacacccccaaaaacaaagcggaaggtagagtt tgagccaaaaaagaaaagaaaggtctaa	
LZ-nCas9	ATGCTTGAGATCGAGGCGGCGTTCCTCGAAAGAGAGAACACCGCAC TTGAAACTCGCGTGGCAGAATTGAGGCAGCGGGTGCAAAGACTTAG AAATAGAGTCTCTCAGTATCGGACCCGATATGGTCCTCTGGGAGGCG GGAAGTCTGGAGGTTCAAGCGGAGGCAGTTCCGGGAGTGAGACACC GGGAACTTCTGAGAGTGCAACTCCTGAGAGCTCTGGTGGATCATCCG GAGGCTCCAGTaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtc gacaagaagtacagcatcggcctggacatcggcaccaactctgtgggctgggccgtgatcaccgacgagtacaa ggtgcccagcaagaaattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagcc ctgctgttcgacagcggcgaaacagccgaggccacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccaga cggaagaaccggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttcttccac agactggaagagtccttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatcttcggcaacatcgtgga cgaggtggcctaccacgagaagtaccccaccatctaccacctgagaaagaaactggtggacagcaccgacaag gccgacctgcggctgatctatctggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgac ctgaaccccgacaacagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgagga aaaccccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagacggctg gaaaatctgatcgcccagctgccccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctggg cctgaccccaacttcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacg acgacgacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaagaacctg tccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggccccctgagcgcctctat gatcaagagatacgacgagcaccaccaggacctgaccctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgag aagtacaaagagattttcttcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccagga agagttctacaagttcatcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacag agaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatcccccaccagatccacctgggagagct gcacgccattctgcggcggcaggaagattttttacccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcct gaccttccgcatccccttactacgtgggccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaaga gcgaggaaaccatcaccccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcatcga gcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcacagcctgctgtacgagtactt	147

【表９－３９】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	caccgtgtataacgagctgaccaaagtgaaatacgtgaccgagggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcg agcagaaaaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagagga ctacttcaagaaaatcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccctgggc acataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaa gatatcgtgctgaccctgacactgtttgaggacagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgt tcgacgacaaagtgatgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctga tcaacggcatccgggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacggcttcgccaacaga aacttcatgcagctgatccacgacgacagcctgaccttaaagaggacatccagaaagcccaggtgtccggcca gggcgatagcctgcacgagcacattgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagaca gtgaaggtggtggacgagctcgtgaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggcca gagagaaccagaccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggcat caaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgcagaacgagaagctgta cctgtactacctgcagaatgggcgggatatgtacgtggaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacga tgtggacgctatcgtgcctcagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaa gaaccggggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagct gctgaacgccaagctgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagagaggcggcctgagcgaa ctggataaggccggcttcatcaagagacagctggtggaaacccggcagatcacaaagcacgtggcacagatcct ggactcccggatgaacactaagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagt ccaagctggtgtccgatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgccca cgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcgagttcgtgta cggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgc caagtacttcttctacagcaacatcatgaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagc ggcctctgatcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggattttgccaccgtgcg gaaagtgctgagcatgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggcttcagcaaagag tctatcctgcccaagaggaacagcgataagctgatcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcg gcttcgacagccccaccgtggcctattctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactga agagtgtgaaagagctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatccccatcgactttctgg aagccaagggctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttcgagctggaaa acggccggaagagaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaata tgtgaacttcctgtacctggccagccactatgagaagctgaagggctccccgaggataatgagcagaaacagct gtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaagagagtgatcct ggccgacgctaatctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatcagagagcaggcc gagaatatcatccacctgtttaccctgaccaatctgggagccccctgccgccttcaagtactttgacaccaccatcga ccggaagaggtacaccagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtac gagacacggatcgacctgtctcagctgggaggtgacggctcaaaaagaaccgccgacggcagcgaattcgagt cacccaagaagaagaggaaagtctaa	

【表９－４０】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
Splint R-LZ	atggcgataacgaagcccttgttggcagctacgttggaaaatattgaggacgtacagttcccatgccttgccactcc gaagatcgatggaatccgatccgtgaaacagacacaaatgcttagcagaacattcaaacccatcaggaacagcgt aatgaatagattgcttacggaactcttgcccgaagggtctgacggcgagattagcatcgaaggagcgactttccaa gatactacctcagcagttatgacgggacacaagatgtataatgctaaattctcatattactggtttgactatgttactga cgatcctttgaagaaatacatagacagggttgaagatatgaaaaattacataactgtccaccctcatatcctggagca tgcacaggtaaagattatcccgctcataccagtagaaattaacaatataaccgaattgttgcagtatgaacgcgatgt gctctctaaaggcttcgagggcgtgatgataaggaagcctgatggcaaatataagttcggtaggtccacattgaaa gagggaattctcttgaagatgaaacagtttaaggatgcggaagctactatcattagtatgacggcactgtttaaaaac actaacactaaaaccaaggacaactttggctatagtaaaaggagcacacacaaatcaggaaaagttgaggagga cgtaatgggcagtatagaggtagattacgatggtgtggtgtttagcattggaacgggcttcgacgctgaccagcgg agggacttttggcagaataaggaaagttacattggcaagatggttaaattcaaatacttcgagatgggctcaaaaga ctgtccgagatttcctgtgtttattggaatcagacacgaagaggataggAGTGgaggctccaaacggacagca gactcccaacattcaacacccccaaaaacaaagcggaaggtagagtttgagccaaaaaagaaaagaaaggtcG GAGGAGGAGGCAGTGGTGGGCGACTTGAAATTAGAGCCGCGTTCCT GCGCCAGAGGAATACGGCTCTCCGCACGGAGGTAGCCGAACTTGAG CAAGAAGTACAGAGATTGGAGAACGAGGTTTCACAGTATGAGACAC GATATGGCCCCCTTGGCGGCGGAAAGtaa	148

10

20

30

40

50

【表９－４１】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
hLIG4(1-620)-LZ	ATGGCAGCTTCTCAGACCTCTCAAACAGTAGCCTCTCATGTACCGTT CGCTGACTTGTGTTCTACGCTCGAACGCATCCAGAAATCAAAGGGGC GCGCCGAGAAAATCCGGCACTTCAGAGAATTCTTGGATTCCTGGAGG AAGTTTCATGATGCTCTCCACAAAAATCACAAAGATGTAACGGATAG TTTCTACCCTGCTATGAGACTTATACTGCCGCAGCTTGAGAGGGAAC GCATGGCGTATGGTATAAAGGAGACAATGTTGGCGAAATTGTATATT GAGCTGCTGAACTTGCCAAGAGATGGAAAGGACGCGCTCAAACTGC TGAACTATAGAACACCCACGGGTACCCATGGTGACGCCGGTGACTTT GCCATGATCGCCTATTTCGTACTGAAACCTCGATGTCTTCAAAAAGG TTCTCTTACAATTCAGCAAGTCAACGACCTGCTGGATTCAATTGCGA GTAACAACAGCGCTAAGCGAAAGGATCTCATTAAGAAAAGCCTCCT GCAGCTGATAACTCAGTCCTCTGCACTCGAACAAAAATGGCTGATTC GGATGATTATCAAGGATTTGAAGTTGGGGGTATCTCAGCAAACTATT TTCAGCGTGTTTCACAATGATGCAGCAGAATTGCATAATGTCACAAC AGATCTTGAGAAAGTCTGCCGACAGTTGCACGACCCCTCTGTAGGCT TGAGTGACATATCTATAACACTTTTTTCTGCGTTCAAACCCATGTTGG CTGCTATTGCGGACATAGAACACATCGAGAAAGACATGAAACATCA GTCATTCTATATAGAGACTAAATTGGACGGCGAGAGGATGCAAATG CACAAAGATGGTGATGTGTATAAATATTTTTCCCGCAACGGCTACAA CTACACTGATCAATTCGGAGCGTCCCCAACTGAAGGGTCCCTCACTC CTTTCATACACAATGCGTTTAAGGCCGATATTCAGATATGTATCCTC GACGGCGAAATGATGGCGTACAATCCCAATACCCAGACCTTCATGC AAAAGGGAACGAAGTTCGATATTAAACGGATGGTTGAAGATTCCGA CCTCCAAACATGTTACTGTGTGTTTGATGTCCTGATGGTGAATAACA AAAAACTCGGCCATGAAACCCTTCGAAAGCGATACGAAATACTCAG CAGTATATTTACTCCAATACCAGGCCGAATCGAGATCGTACAGAAAA CACAAGCCCATACTAAGAATGAAGTTATTGATGCACTGAACGAAGC CATAGACAAGAGGGAAGAAGGCATAATGGTCAAGCAGCCTCTGAGT ATATATAAACCTGACAAAAGGGGGGGAAGGATGGCTGAAGATAAAGC CAGAATACGTGTCTGGTCTTATGGACGAATTGGACATTCTCATCGTC GGAGGATATTGGGGTAAGGGTTCCAGGGGGGGGATGATGTCCCACT TTCTGTGTGCGGTTGCCGAGAAACCGCCCCCAGGGGAAAAACCATC AGTGTTCCATACGTTGTCACGCGTCGGCTCAGGTTGTACGATGAAGG AACTTTACGATCTGGGGGTTGAAACTCGCCAAATATTGGAAGCCATTC CATCGGAAAGCACCGCCCTCTAGTATCTTGTGTGGGACGGAGAAGCC AGAAGTTTATATAGAGCCATGTAACTCAGTAATTGTTCAAATCAAAG CCGCAGAGATCGTCCCGTCAGACATGTACAAGACTGGATGCACCCTT	149

【表９－４２】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	AGATTTCCTCGCATCGAAAAAATAAGAGATGATAAAGAGTGGCATG AGTGCATGACTCTTGACGACCTTGAACAGCTCCGCGGGAAGGCCAG CGGTAAACTGGCTAGTAAGCACCTCTACATCGGGGGGTGACAGTGgagg ctccaaacggacagcagactcccaacattcaacacccccaaaaacaaagcggaaggtagagtttgagccaaaaa agaaaagaaaggtcGGAGGAGGAGGCAGTGGTGGGCGACTTGAAATTAGAG CCGCGTTCCTGCGCCAGAGGAATACGGCTCTCCGCACGGAGGTAGCC GAACTTGAGCAAGAAGTACAGAGATTGGAGAACGAGGTTTCACAGT ATGAGACACGATATGGCCCCCTTGGCGGCGGAAAGtaa	
nCas9-hLIG4(1-620)	atgaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtcgacaagaagtacagc atcggcctggacatcggcaccaactctgtgggctgggccgtgatcaccgacgagtacaaggtgcccagcaaga aattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagc ggcgaaacagccgaggccacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggat ctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttcttccacagactggaagagtc cttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctacc acgagaagtaccccaccatctaccacctgagaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggct gatctatctggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctgaaccccgacaa cagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaacg ccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgc ccagctgccccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgaccccaact tcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctgga caacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaagaacctgtccgacgccatcct gctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggcccccctgagcgcctctatgatcaagagatacg acgagcaccaccaggacctgaccctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagatt ttcttcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagtt catcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctg cggaagcagcggacctttcgacaacggcagcatccccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgc ggcggcaggaagattttttacccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcc cctactacgtgggccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcgaggaaaccat caccccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcatcgagcggatgaccaact tcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcacagcctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacg agctgaccaaagtgaaatacgtgaccgagggaatgagaaagccccgccttcctgagcggcgagcagaaaaagg ccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaaa atcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccctgggcacataccacgatc tgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgac cctgacactgtttgaggacagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagt gatgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccg ggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacggcttcgccaacagaaacttcatgcagct	150

【表９－４３】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	gatccacgacgacagcctgacctttaaagaggacatccagaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctg cacgagcacattgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtgg acgagctcgtgaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagagagaaccaga ccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggcatcaaagagctgggc agccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgca gaatgggcgggatatgtacgtggaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggacgctatcgt gcctcagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaag agcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacgccaagc tgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccgg cttcatcaagagacagctggtggaaacccggcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatga acactaagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctggtgtcc gatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctga acgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaag gtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttcta cagcaacatcatgaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcga gacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggattttgccaccgtgcggaaagtgctgagc atgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggcttcagcaaagagtctatcctgcccaa gaggaacagcgataagctgatcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccc caccgtggcctattctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaag agctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgactttctggaagccaagggct acaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttcgagctggaaaacggccggaag agaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctg tacctggccagccactatgagaagctgaagggctccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtggaaca gcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaagagagtgatcctggccgacgcta atctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatc cacctgtttaccctgaccaatctgggagccccctgccgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccggaagaggt acaccagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggat cgacctgtctcagctgggaggtgacTCCGGTGGCTCCTCAGGGGGATCTAAACGCA CGGCCGATGGGTCCGAGTTTGAGTCTCCCAAGAAGAAAAGGAAAGT GAGTGGTGGAAGTAGCGGCGGTAGCGCAGCTTCTCAGACCTCTCAA ACAGTAGCCTCTCATGTACCGTTCGCTGACTTGTGTTCTACGCTCGAA CGCATCCAGAAATCAAAGGGGCGCGCCGAGAAAATCCGGCACTTCA GAGAATTCTTGGATTCCTGGAGGAAGTTTCATGATGCTCTCCACAAA AATCACAAAGATGTAACGGATAGTTTCTACCCTGCTATGAGACTTAT ACTGCCGCAGCTTGAGAGGGAACGCATGGCGTATGGTATAAAGGAG ACAATGTTGGCGAAATTGTATATTGAGCTGCTGAACTTGCCAAGAGA TGGAAAGGACGCGCTCAAACTGCTGAACTATAGAACACCCACGGGT	

【表９－４４】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	ACCCATGGTGACGCCGGTGACTTTGCCATGATCGCCTATTTCGTACT GAAACCTCGATGTCTTCAAAAAGGTTCTCTTACAATTCAGCAAGTCA ACGACCTGCTGGATTCAATTGCGAGTAACAACAGCGCTAAGCGAAA GGATCTCATTAAGAAAAGCCTCCTGCAGCTGATAACTCAGTCCTCTG CACTCGAACAAAAATGGCTGATTCGGATGATTATCAAGGATTTGAAG TTGGGGGTATCTCAGCAAACTATTTTCAGCGTGTTTCACAATGATGC AGCAGAATTGCATAATGTCACAACAGATCTTGAGAAAGTCTGCCGA CAGTTGCACGACCCCTCTGTAGGCTTGAGTGACATATCTATAACACT TTTTTCTGCGTTCAAACCCATGTTGGCTGCTATTGCGGACATAGAAC ACATCGAGAAAGACATGAAACATCAGTCATTCTATATAGAGACTAA ATTGGACGGCGAGAGGATGCAAATGCACAAAGATGGTGATGTGTAT AAATATTTTTCCCGCAACGGCTACAACTACACTGATCAATTCGGAGC GTCCCCAACTGAAGGGTCCCTCACTCCTTTCATACACAATGCGTTTA AGGCCGATATTCAGATATGTATCCTCGACGGCGAAATGATGGCGTAC AATCCCAATACCCAGACCTTCATGCAAAAGGGAACGAAGTTCGATA TTAAACGGATGGTTGAAGATTCCGACCTCCAAACATGTTACTGTGTG TTTGATGTCCTGATGGTGAATAACAAAAAACTCGGCCATGAAACCCT TCGAAAGCGATACGAAATACTCAGCAGTATATTTACTCCAATACCAG GCCGAATCGAGATCGTACAGAAAACACAAGCCCATACTAAGAATGA AGTTATTGATGCACTGAACGAAGCCATAGACAAGAGGGAAGAAGGC ATAATGGTCAAGCAGCCTCTGAGTATATATAAACCTGACAAAAGGG GGGAAGGATGGCTGAAGATAAAGCCAGAATACGTGTCTGGTCTTAT GGACGAATTGGACATTCTCATCGTCGGAGGATATTGGGGTAAGGGTT CCAGGGGGGGGATGATGTCCCACTTTCTGTGTGCGGTTGCCGAGAAA CCGCCCCCAGGGGAAAAACCATCAGTGTTCCATACGTTGTCACGCGT CGGCTCAGGTTGTACGATGAAGGAACTTTACGATCTGGGGTTGAAAC TCGCCAAATATTGGAAGCCATTCCATCGGAAAGCACCGCCCTCTAGT ATCTTGTGTGGGACGGAGAAGCCAGAAGTTTATATAGAGCCATGTA ACTCAGTAATTGTTCAAATCAAAGCCGCAGAGATCGTCCCGTCAGAC ATGTACAAGACTGGATGCACCCTTAGATTTCCTCGCATCGAAAAAAT AAGAGATGATAAAGAGTGGCATGAGTGCATGACTCTTGACGACCTT GAACAGCTCCGCGGGAAGGCCAGCGGTAAACTGGCTAGTAAGCACC TCTACATCGGGGGTGACtaa	

【表９－４５】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
T4-nCas9	atgatgatccttaagattctcaacgaaatcgctagtataggg tccactaagcagaagcaggccatattggaaaaaaa taaggacaatgaacttttgaagagagtctatagactgacgtactctaggggg ctccagtactacatcaagaaatggc ctaaacctggcattgcgacgcagtcattcggtatgctgacattgacggatatgttggatttcattgagtttacgctggc caccagaaaacttacgggtaatgctgcgatagaagaacttacagggtacataacagacgggaagaaagatgacg tggaagtgctcagacgagttatgatgcgcgatctcgagtgcggcgctagcgtgtcaatcgcgaacaaagtctggc ccggcctcataccagagcagccacagatgctggcatcttcctatgacgaaaaaggcataaacaagaatattaaatt cccggccttcgctcaactcaaagcagatggtgccaggtgttttgccgaagttcggggtgatgaacttgatgacgtg cggctcttgtctagggcaggtaacgagtacctcggcctggacttgcttaaagaggaactgattaaaatgacagctg aggcgcggcagatacaccccgagggcgtccttatcgacggggagctggtgtatcacgaacaagttaaaaagga accggagggtcttgattttcttttcgacgcgtatcctgagaacagcaaggcgaaagaatttgcagaagttgcagaaa gcaggaccgcaagtaatggaatcgctaataaaagcctcaagggtaccatcagcgaaaaagaagcccagtgcatg aaatttcaagtttgggactatgtccccttggtcgaaatttactccctgcccgcattccggctgaagtatgatgttcgctt cagtaaactggagcaaatgacgagcggttatgataaggttatacttattgagaatcaggtcgtaaataatttggacga ggcgaaagttatatacaaaaagtatatagaccaagggttggaggggatcattttgaagaacatagacggactttgg gagaacgcccggtccaagaatttgtataaattcaaagaagtcatagatgttgacctcaagatagtaggtatatatccc cacagaaaggacccaaccaaagcaggcggattcattttggagtccgagtgtgggaagataaaggtcaatgctgg atctggactcaaggacaaagctggtgtgaagtcacatgaactggaccgaaccaggattatggagaatcagaacta ttacatcgggaagatattggagtgtgaatgcaacggctggcttaaatcagatggaagaactgattacgttaaattgtt cctgcccatagccatacgactccgcgaggacaaaacgaaggctaacacgtttgaagacgtattcggagatttccat gaggtgactggcctttccggtggctcctcaggggggatctaaacgcacggccgatgggtccgagtttgagtctccc aagaagaaaaggaaagtgagtggtggaagtagcggcggtagcgacaagaagtacagcatcggcctggacatc ggcaccaactctgtgggctgggccgtgatcaccgacgagtacaaggtgcccagcaagaaattcaaggtgctggg caacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaaacagccga ggccacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggatctgctatctgcaaga gatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttcttccacagactggaagagtccttcctggtggaaga ggataagaagcacgagcggcaccccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaccccc accatctaccacctgagaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggctgatctatctggccct ggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctgaaccccgacaacagcgacgtggac aagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaacgccagcggcgtgga cgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgcccagctgccccggc gagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgaccccccaacttcaagagcaacttc gacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctggacaacctgctggccc agatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaagaacctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcc tgagagtgaacaccgagatcaccaaggccccctgagcgcctctatgatcaagagatacgacgagcaccacca ggacctgaccctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagattttcttcgaccagag caagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagttcatcaagcccatcc tggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcgga	151

【表９－４６】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	ccttcgacaacggcagcatccccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcaggaaga tttttacccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcccctactacgtgggcc ctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcgaggaaaccatcacccctggaactt cgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcatcgagcggatgaccaacttcgataagaacctgc ccaacgagaaggtgctgcccaagcacagcctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacgagctgaccaaagtga aatacgtgaccgagggaatgagaaagccgccttcctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctgct gttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaaaatcgagtgcttcgactc cgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccctgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaag gacaaggacttcctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgaccctgacactgtttgag gacagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagtgatgaagcagctgaa gcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccgggacaagcagtccg gcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacggcttcgccaacagaaacttcatgcagctgatccacgacgaca gcctgacctttaaagaggacatccagaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgcc aatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtggacgagctcgtgaaagt gatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagagagaaccagaccacccagaagggac agaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggcatcaaagagctgggcagccagatcctgaaa gaacaccccgtggaaaacacccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcgggatat gtacgtggaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggacgctatcgtgcctcagagctttctg aaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaagagcgacaacgtgcc ctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacgccaagctgattacccagagaa agttcgacaatctgaccaaggccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaagagaca gctggtggaaacccggcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatgaacactaagtacgac gagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctggtgtccgatttccggaaggat ttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggа accgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcg gaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttctacagcaacatcatga acttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcgagacaaacggcgaa accggggagatcgtgtgggataagggccgggattttgccaccgtgcggaaagtgctgagcatgccccaagtgaa tatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggcttcagcaaagagtctatcctgcccaagaggaacagcgata agctgatcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtggcctattct gtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaagagctgctggggatca ccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgactttctggaagccaagggctacaaagaagtgaaa aaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttcgagctggaaaacggccggaagagaatgctggcctct gccggcgaactgcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctgtacctggccagcca ctatgagaagctgaagggctcccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtggaacagcacaagcactacct ggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaagagagtgatcctggccgacgctaatctggacaaagtgct gtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatccacctgtttaccctgac	

【表９－４７】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	caatctgggagccccctgccgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccggaagaggtacaccagcaccaaag aggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggatcgacctgtctcagctg ggaggtgacaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtctaa	
SplintR-nCas9	atgatggcgataacgaagcccttgttggcagctacgttggaaaatattgaggacgtacagttcccatgccttgccac tccgaagatcgatggaatccgatccgtgaaacagacacaaatgcttagcagaacattcaaacccatcaggaacag cgtaatgaatagattgcttacggaactcttgcccgaagggtctgacggcgagattagcatcgaaggagcgactttc caagatactacctcagcagttatgacgggacacaagatgtataatgctaaattctcatattactggtttgactatgttac tgacgatcctttgaagaaatacatagacagggttgaagatatgaaaaattacataactgtccacccctcatatcctgga gcatgcacaggtaaagattatcccgctcataccagtagaaattaacaatataaccgaattgttgcagtatgaacgcg atgtgctctctaaaggcttcgagggcgtgatgataaggaagcctgatggcaaatataagttcggtaggtccacattg aaagagggaattctcttgaagatgaaacagtttaaggatgcggaagctactatcattagtatgacggcactgtttaaa aacactaacactaaaaccaaggacaactttggctatagtaaaaggagcacacacaaatcaggaaaagttgaggga ggacgtaatgggcagtatagaggtagattacgatggtgtggtgtttagcattggaacgggcttcgacgctgaccag cggagggacttttggcagaataaggaaagttacattggcaagatggttaaattcaaatacttcgagatgggctcaaa agactgtccgagatttcctgtgtttattggaatcagacacgaagaggataggtCCGGTGGCTCCTCAg ggggatctaaacgcacggccgatgggtccgagtttgagtctcccaagaagaaaaggaaagtgagtggtggaagt agcggcggtagcgacaagaagtacagcatcggcctggacatcggcaccaactctgtgggctgggccgtgatca ccgacgagtacaaggtgcccagcaagaaattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaaga acctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaaacagccgaggccacccggctgaagagaaccgccagaa gaagatacaccagacggaagaaccggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggac gacagcttcttccacagactggaagagtccttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatcttc ggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaccccaccatctaccacctgagaaagaaactggtgg acagcaccgacaaggccgacctgcggctgatctatctggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttcc tgatcgagggcgacctgaaccccgacaacagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaac cagctgttcgaggaaaaccccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgagca agagcagacggctggaaaatctgatcgcccagctgccccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgatt gccctgagcctgggcctgaccccaacttcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgag caaggacacctacgacgacgacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctgg ccgccaagaacctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggcccc cctgagcgcctctatgatcaagagatacgacgagcaccaccaggacctgaccctgctgaaagctctcgtgcggc agcagctgcctgagaagtacaaagagattttcttcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattgacggc ggagccagccaggaagagttctacaagttcatcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgct cgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccaccagatc cacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcaggaagatttttacccattcctgaaggacaaccgggaaaa gatcgagaagatcctgaccttccgcatcccctactacgtgggccctctggccaggggaaacagcagattcgcctg gatgaccagaaagagcgaggaaaccatcaccccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcc cagagcttcatcgagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcacagcct	152

10

20

30

40

50

【表９－４８】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	gctgtacgagtacttcaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaaatacgtgaccgagggaatgagaaagcccg ccttcctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaag cagctgaaagaggactacttcaagaaaatcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttca acgcctccctgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggacaatgaggaaaacg aggacattctggaagatatcgtgctgaccctgacactgtttgaggacagagagatgatcgaggaacggctgaaaa cctatgcccacctgttcgacgacaaagtgatgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggct gagccggaagctgatcaacggcatccgggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacg gcttcgccaacagaaacttcatgcagctgatccacgacgacagcctgaccttaaagaggacatccagaaagccc aggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgccaatctggccggcagccccgccattaagaaggg catcctgcagacagtgaaggtggtggacgagctcgtgaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtg atcgaaatggccagagagaaccagaccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggat cgaagagggcatcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgcagaa cgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcgggatatgtacgtggaccaggaactggacatcaaccggct gtccgactacgatgtggacgctatcgtgcctcagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgacc agaagcgacaagaaccggggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactac tggcggcagctgctgaacgccaagctgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagagaggcg gcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaagagacagctggtggaaacccggcagatcacaaagcacgt ggcacagatcctggactcccggatgaacactaagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtga tcaccctgaagtccaagctggtgtccgatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactac caccacgcccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaa gcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcgg caaggctaccgccaagtacttcttctacagcaacatcatgaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcg agatccggaagcggcctctgatcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggatttt tgccaccgtgcggaaagtgctgagcatgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggc ttcagcaaagagtctatcctgccccaagaggaacagcgataagctgatcgccagaaagaaggactgggaccctaa gaagtacggcggcttcgacagccccaccgtggcctattctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagt ccaagaaactgaagagtgtgaaagagctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatccc atcgactttctggaagccaagggctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgt tcgagctggaaaacggccggaagagaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaaacgaactggccc tgccctccaaatatgtgaacttcctgtacctggccagccactatgagaagctgaagggctccccgaggataatga gcagaaacagctgtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaa gagagtgatcctggccgacgctaatctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatca gagagcaggccgagaatatcatccacctgtttaccctgaccaatctgggagccccctgccgccttcaagtactttga caccaccatcgaccggaagaggtacaccagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatc accggcctgtacgagacacggatcgacctgtctcagctgggaggtgacaaacggacagccgacggaagcgag ttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtctaa	

【表９－４９】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
hLIG4(1-620)-nCas9	ATGGCAGCTTCTCAGACCTCTCAAACAGTAGCCTCTCATGTACCGTT CGCTGACTTGTGTTCTACGCTCGAACGCATCCAGAAATCAAAGGGGC GCGCCGAGAAAATCCGGCACTTCAGAGAATTCTTGGATTCCTGGAGG AAGTTTCATGATGCTCTCCACAAAAATCACAAAGATGTAACGGATAG TTTCTACCCTGCTATGAGACTTATACTGCCGCAGCTTGAGAGGGAAC GCATGGCGTATGGTATAAAGGAGACAATGTTGGCGAAATTGTATATT GAGCTGCTGAACTTGCCAAGAGATGGAAAGGACGCGCTCAAACTGC TGAACTATAGAACACCCACGGGTACCCATGGTGACGCCGGTGACTTT GCCATGATCGCCTATTTCGTACTGAAACCTCGATGTCTTCAAAAAGG TTCTCTTACAATTCAGCAAGTCAACGACCTGCTGGATTCAATTGCGA GTAACAACAGCGCTAAGCGAAAGGATCTCATTAAGAAAAGCCTCCT GCAGCTGATAACTCAGTCCTCTGCACTCGAACAAAAATGGCTGATTC GGATGATTATCAAGGATTTGAAGTTGGGGGTATCTCAGCAAACTATT TTCAGCGTGTTTCACAATGATGCAGCAGAATTGCATAATGTCACAAC AGATCTTGAGAAAGTCTGCCGACAGTTGCACGACCCCTCTGTAGGCT TGAGTGACATATCTATAACACTTTTTTCTGCGTTCAAACCCATGTTGG CTGCTATTGCGGACATAGAACACATCGAGAAAGACATGAAACATCA GTCATTCTATATAGAGACTAAATTGGACGGCGAGAGGATGCAAATG CACAAAGATGGTGATGTGTATAAATATTTTTCCCGCAACGGCTACAA CTACACTGATCAATTCGGAGCGTCCCCAACTGAAGGGTCCCTCACTC CTTTCATACACAATGCGTTTAAGGCCGATATTCAGATATGTATCCTC GACGGCGAAATGATGGCGTACAATCCCAATACCCAGACCTTCATGC AAAAGGGAACGAAGTTCGATATTAAACGGATGGTTGAAGATTCCGA CCTCCAAACATGTTACTGTGTGTTTGATGTCCTGATGGTGAATAACA AAAAACTCGGCCATGAAACCCTTCGAAAGCGATACGAAATACTCAG CAGTATATTTACTCCAATACCAGGCCGAATCGAGATCGTACAGAAAA CACAAGCCCATACTAAGAATGAAGTTATTGATGCACTGAACGAAGC CATAGACAAGAGGGAAGAAGGCATAATGGTCAAGCAGCCTCTGAGT ATATATAAACCTGACAAAAGGGGGGGAAGGATGGCTGAAGATAAAGC CAGAATACGTGTCTGGTCTTATGGACGAATTGGACATTCTCATCGTC GGAGGATATTGGGGTAAGGGTTCCAGGGGGGGGATGATGTCCCACT TTCTGTGTGCGGTTGCCGAGAAACCGCCCCCAGGGGAAAAACCATC AGTGTTCCATACGTTGTCACGCGTCGGCTCAGGTTGTACGATGAAGG AACTTTACGATCTGGGGGTTGAAACTCGCCAAATATTGGAAGCCATTC CATCGGAAAGCACCGCCCTCTAGTATCTTGTGTGGGACGGAGAAGCC AGAAGTTTATATAGAGCCATGTAACTCAGTAATTGTTCAAATCAAAG CCGCAGAGATCGTCCCGTCAGACATGTACAAGACTGGATGCACCCTT	153

【表９－５０】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	AGATTTCCTCGCATCGAAAAAATAAGAGATGATAAAGAGTGGCATG AGTGCATGACTCTTGACGACCTTGAACAGCTCCGCGGGAAGGCCAG CGGTAAACTGGCTAGTAAGCACCTCTACATCGGGGGGTGACTCCGGTG GCTCCTCAGGGGGATCTAAACGCACGGCCGATGGGTCCGAGTTTGA GTCTCCCAAGAAGAAAAGGAAAGTGAGTGGTGGAAGTAGCGGCGGT AGCgacaagaagtacagcatcggcctggacatcggcaccaactctgtgggctgggccgtgatcaccgacga gtacaaggtgcccagcaagaaattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatc ggagccctgctgttcgacagcggcgaaacagccgaggccacccggctgaagagaaccgccagaagaagatac accagacggaagaaccggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagctt cttccacagactggaagagtccttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatcttcggcaacat cgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaccccaccatctaccacctgagaaagaaactggtggacagcacc gacaaggccgacctgcggctgatctatctggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgag ggcgacctgaaccccgacaacagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgtt cgaggaaaaccccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaagagcag acggctggaaaatctgatcgcccagctgccccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctga gcctgggcctgaccccccaacttcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaagga cacctacgacgacgacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgcca agaacctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggcccccctgagc gcctctatgatcaagagatacgacgagcaccaccaggacctgaccctgctgaaagctctcgtgcggcagcagct gcctgagaagtacaaagagattttcttcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagcca gccaggaagagttctacaagttcatcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaag ctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggacctttcgacaacggcagcatccccccaccagatccacctgg gagagctgcacgccattctgcggcggcaggaagatttttacccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgag aagatcctgaccttccgcatccccctactacgtgggccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgacc agaaagagcgaggaaaccatcaccccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagct tcatcgagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcacagcctgctgtac gagtacttcaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaaatacgtgaccgagggaatgagaaagccccgccttcctg agcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctga aagaggactacttcaagaaaatcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctc cctgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggacaatgaggaaaacgaggacat tctggaagatatcgtgctgaccctgacactgtttgaggacagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgc ccacctgttcgacgacaaagtgatgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccg gaagctgatcaacggcatccgggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacggcttcg ccaacagaaacttcatgcagctgatccacgacgacagcctgaccttaaagaggacatccagaaagcccaggtgt ccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcct gcagacagtgaaggtggtggacgagctcgtgaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaa atggccagagagaaccagaccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaag	

【表９－５１】

名称	融合タンパク質ポリペプチド配列または核酸配列	配列番号
	agggcatcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgcagaacgaga agctgtacctgtactacctgcagaatgggcgggatatgtacgtggaccaggaactggacatcaaccggctgtccg actacgatgtggacgctatcgtgcctcagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaa gcgacaagaaccggggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggc ggcagctgctgaacgccaagctgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagagaggcggcct gagcgaactggataaggccggcttcatcaagagacagctggtggaaacccggcagatcacaaagcacgtggca cagatcctggactcccggatgaacactaagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcac cctgaagtccaagctggtgtccgatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccacc acgcccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcga gttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaag gctaccgccaagtacttcttctacagcaacatcatgaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagat ccggaagcggcctctgatcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggattttgcc accgtgcggaaagtgctgagcatgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggcttca gcaaagagtctatcctgcccaagaggaacagcgataagctgatcgccagaaagaaggactgggaccctaagaa gtacggcggcttcgacagccccaccgtggcctattctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtcca agaaactgaagagtgtgaaagagctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatc gactttctggaagccaagggctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttcg agctggaaaacggccggaagagaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaaacgaactggccctgc cctccaaatatgtgaacttcctgtacctggccagccactatgagaagctgaagggctccccgaggataatgagca gaaacagctgtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaagag agtgatcctggccgacgctaatctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatcagag agcaggccgagaatatcatccacctgtttaccctgaccaatctgggagccccctgccgccttcaagtactttgacacc accatcgaccggaagaggtacaccagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccg gcctgtacgagacacggatcgacctgtctcagctgggaggtgacaaacggacagccgacggaagcgagttcga gtcaccaaagaagaagcggaaagtctaa	

【０１２２】

本明細書に開示されるのは、リガーゼに結合したＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含むタンパク質複合体である。エンドヌクレアーゼ及びリガーゼは、ヘテロ二量体化ドメインを介して一緒に結合され得る。ヘテロ二量体化ドメインは、ロイシンジッパー、ＰＤＺドメイン、ストレプトアビジン及びストレプトアビジン結合タンパク質、フォールドンドメイン、疎水性ポリペプチド、Ｃａｓニッカーゼに結合する抗体、またはリガーゼに結合する抗体のうちの１つ以上、またはそれらの１つ以上の結合断片を含み得る。

【０１２３】

いくつかの態様では、システムは、少なくとも１つのドナー鎖を含む。いくつかの態様では、ドナー鎖は、少なくとも１つのガイド核酸によって標的化されたゲノム遺伝子座に少なくとも部分的に相同である核酸配列を含む。いくつかの態様では、ドナー鎖は、少なくとも１つのガイド核酸によって標的化されたゲノム遺伝子座に相同ではない核酸配列を含む。いくつかの態様では、ドナー鎖は、一本鎖または二本鎖核酸である。いくつかの態様では、二本鎖核酸を含むドナー鎖は、少なくとも１つのオーバーハングを含む。いくつかの態様では、オーバーハングは、ガイド核酸に少なくとも部分的に相補的なガイド結合部位を含む。いくつかの態様では、オーバーハングは、ゲノム遺伝子座において、または遺伝子座に隣接するゲノムフラップに少なくとも部分的に同一であるか、または相補的であるゲノムフラップ結合部位を含む。いくつかの態様では、ドナー鎖は、２つのオーバーハングを含み、第１のオーバーハングは、第１のガイド核酸に少なくとも部分的に相補的

な第１のガイド結合部位、またはゲノム遺伝子座における、もしくはそれに隣接する第１のゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的な第１のゲノムフラップ結合部位を含み、第２のオーバーハングは、第２のガイド核酸に少なくとも部分的に相補的な第２のガイド結合部位、またはゲノム遺伝子座における、もしくはそれに隣接する第２のゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的な第２のゲノムフラップ結合部位を含む。いくつかの態様では、ドナー鎖は、少なくとも１つの遺伝子座における少なくとも１つの遺伝子変異を修正する。いくつかの態様では、ドナー鎖は、コード配列を含む。いくつかの態様では、コード配列は、全長タンパク質またはその断片をコードする。いくつかの態様では、ドナー鎖は、非コード配列を含む。いくつかの態様では、非コード配列は、内因性遺伝子をノックアウトする。いくつかの態様では、非コード配列は、制御要素を含む。

【０１２４】

いくつかの態様では、システムは、ヌクレアーゼを含む。ヌクレアーゼは、異種であってもよい。いくつかの態様では、ヌクレアーゼは、ゲノムフラップを消化するためのエキソヌクレアーゼを含む。いくつかの態様では、エキソヌクレアーゼは、５’エキソヌクレアーゼである。エキソヌクレアーゼの非限定的な例には、ヒトフラップエンドヌクレアーゼ１（ｈＦＥＮ１）、ヒトエキソヌクレアーゼ５（ｈＥＸＯ５）、Ｔ５エキソヌクレアーゼ、Ｔ７エキソヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼＶＩＩＩ、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＰｏｌＩのフラップエンドヌクレアーゼドメイン、ＲｅｃＪＦ、ラムダエキソヌクレアーゼ、Ｘｎｉ（ＥｘｏＩＸＩ）、ＳａＦＥＮ（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　ＦＥＮ）、ヌクレアーゼＢＡＬ－３１、またはそれらの断片が含まれ得る。いくつかの態様では、エキソヌクレアーゼは、表１０のエキソヌクレアーゼを含む。いくつかの態様では、エキソヌクレアーゼは、表１０のエキソヌクレアーゼのうちのいずれか１つのポリペプチド配列と、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９９％、またはそれ以上同一であるポリペプチド配列を含む。

【表１０－１】

表１０．エキソヌクレアーゼポリペプチド配列の非限定的な例

名称	エキソヌクレアーゼポリペプチド配列	配列番号
hFEN1	MGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSIYQFLI AVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMMENGIKPVYVF DGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQAQAAGAEQEVEKFT KRLVKVTKQHNDECKHLLSLMGIPYLDAPSEAEASCAALVKA GKVYAAATEDMDCLTFGSPVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLSRI LQELGLNQEQFVDLCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHKSIE EIVRRLDPNKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPESVELKWSE PNEEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRLDDFF KVTGSLSSAKRKEPEPKGSTKKKAKTGAAGKFKRGK	212
hFen1(1-333)	MGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSIYQFLI AVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMMENGIKPVYVF DGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQAQAAGAEQEVEKFT KRLVKVTKQHNDECKHLLSLMGIPYLDAPSEAEASCAALVKA GKVYAAATEDMDCLTFGSPVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLSRI LQELGLNQEQFVDLCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHKSIE EIVRRLDPNKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPESVELKWSE PNEEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQ	213
hEXO5	MAETREEETVSAEASGFSDLSDSEFLEFLDLEDAQESKALVNM PGPSSESLGKDDKPISLQNWKRGLDILSPMERFHLKYLYVTDL ATQNWCELQTAYGKELPGFLAPEKAAVLDTGASIHLARELEL HDLVTVPVTTKEDAWAIKFLNILLLIPTLQSEGHIREFPVFGEGE GVLLVGVIDELHYTAKGELELAELKTRRRPMLPLEAQKKKDC FQVSLYKYIFDAMVQGKVTPASLIHHTKLCLEKPLGPSVLRHA QQGGFSVKSLGDLMELVFLSLTLSDLPVIDILKIEYIHQETATVL GTEIVAFKEKEVRAKVQHYMAYWMGHREPQGVDVEEAWKC RTCTYADICEWRKGSGVLSSTLAPQVKKAK	214
T5 EXO	MSKSWGKFIEEEEAEMASRRNLMIVDGTNLGFRFKHNNSKKP FASSYVSTIQSLAKSYSARTTIVLGDKGKSVFRLEHLPEYKGNR DEKYAQRTEEEKALDEQFFEYLKDAFELCKTTFPTFTIRGVEA DDMAAYIVKLIGHLYDHVWLISTDGDWDTLLTDKVSRFSFTT RREYHLRDMYEHHNVDDVEQFISLKAIMGDLGDNIRGVEGIG AKRGYNIIREFGNVLDIIDQLPLPGKQKYIQNLNASEELLFRNLI LVDLPTYCVDAIAAVGQDVLDKFTKDILEIAEQ	215

【表１０－２】

名称	エキソヌクレアーゼポリペプチド配列	配列番号
T7 EXO	MALLDLKQFYELREGCDDKGILVMDGDWLVFQAMSAAEFDA SWEEEIWHRCCDHAKARQILEDSIKSYETRKKAWAGAPIVLAF TDSVNWRKELVDPNYKANRKAVKKPVGYFEFLDALFEREEFY CIREPMLEGDDVMGVIASNPSAFGARKAVIISCDKDFKTIPNCD FLWCTTGNILTQTEESADWWHLFQTIKGDITDGYSGIAGWGD TAEDFLNNPFITEPKTSVLKSGKNKGQEVTKWVKRDPEPHETL WDCIKSIGAKAGMTEEDIIKQGQMARILRFNEYNFIDKEIYLW RP	216
EXO VIII(RecE)	MSTKPLFLLRKAKKSSGEPDVVLWASNDFESTCATLDYLIVKS GKKLSSYFKAVATNFPVVNDLPAEGEIDFTWSERYQLSKDSM TWELKPGAAPDNAHYQGNTNVNGEDMTEIEENMLLPISGQEL PIRWLAQHGSEKPVTHVSRDGLQALHIARAEELPAVTALAVSH KTSLLDPLEIRELHKLVRDTDKVFPNPGNSNLGLITAFFEAYLN ADYTDRGLLTKEWMKGNRVSHITRTASGANAGGGNLTDRGE GFVHDLTSLARDVATGVLARSMDLDIYNLHPAHAKRIEEIIAE NKPPFSVFRDKFITMPGGLDYSRAIVVASVKEAPIGIEVIPAHVT EYLNKVLTETDHANPDPEIVDIACGRSSAPMPQRVTEEGKQDD EEKPQPSGTTAVEQGEAETMEPDATEHHQDTQPLDAQSQVNS VDAKYQELRAELHEARKNIPSKNPVDDDKLLAASRGEFVDGIS DPNDPKWVKGIQTRDCVYQNQPETEKTSPDMNQPEPVVQQEP EIACNACGQTGGDNCPDCGAVMGDATYQETFDEESQVEAKE NDPEEMEGAEHPHNENAGSDPHRDCSDETGEVADPVIVEDIEP GIYYGISNENYHAGPGISKSQLDDIADTPALYLWRKNAPVDTT KTKTLDLGTAFHCRVLEPEEFSNRFIVAPEFNRRTNAGKEEEK AFLMECASTGKTVITAEEGRKIELMYQSVMALPLGQWLVESA GHAESSIYWEDPETGILCRCRPDKIIPEFHWIMDVKTTADIQRF KTAYYDYRYHVQDAFYSDGYEAQFGVQPTFVFLVASTTIECG RYPVEIFMMGEEAKLAGQQEYHRNLRTLSDCLNTDEWPAIKT LSLPRWAKEYAND	217
EXO VIII、切り詰められた	EHPHNENAGSDPHRDCSDETGEVADPVIVEDIEPGIYYGISNEN YHAGPGISKSQLDDIADTPALYLWRKNAPVDTTKTKTLDLGT AFHCRVLEPEEFSNRFIVAPEFNRRTNAGKEEEKAFLMECAST GKTVITAEEGRKIELMYQSVMALPLGQWLVESAGHAESSIYW EDPETGILCRCRPDKIIPEFHWIMDVKTTADIQRFKTAYYDYRY HVQDAFYSDGYEAQFGVQPTFVFLVASTTIECGRYPVEIFMMG EEAKLAGQQEYHRNLRTLSDCLNTDEWPAIKTLSLPRWAKEY AND	218

【表１０－３】

名称	エキソヌクレアーゼポリペプチド配列	配列番号
E coli PolI のフラップエンドドメイン	VQIPQNPLILVDGSSYLYRAYHAFPPLTNSAGEPTGAMYGVLN MLRSLIMQYKPTHAAVVFDAKGKTFRDELFEHYKSHRPPMPD DLRAQIEPLHAMVKAMGLPLLAVSGVEADDVIGTLAREAEKA GRPVLISTGDKDMAQLVTPNITLINTMTNTILGPEEVVNKYGV PPELIIDFLALMGDSSDNIPGVPGVGEKTAQALLQGLGGLDTLY AEPEKIAGLSFRGAKTMAAKLEQNKEVAYLSYQLATIKTDVEL ELTCEQLEVQQPAAEELLGLFKKYEFKRWTADVEAGKWLQA KGAKPAAKPQETSVADEAPEVTATVI	219
RecJ	MKQQIQLRRREVDETADLPAELPPLLRRLYASRGVRSAQELER SVKGMLPWQQLSGVEKAVEILYNAFREGTRIIVVGDFDADGA TSTALSVLAMRSLGCSNIDYLVPNRFEDGYGLSPEVVDQAHAR GAQLIVTVDNGISSHAGVEHARSLGIPVIVTDHHLPGDTLPAAE AIINPNLRDCNFPSKSLAGVGVAFYLMLALRTFLRDQGWFDER NIAIPNLAELLDLVALGTVADVVPLDANNRILTWQGMSRIRAG KCRPGIKALLEVANRDAQKLAASDLGFALGPRLNAAGRLDDM SVGVALLLCDNIGEARVLANELDALNQTRKEIEQGMQIEALTL CEKLERSRDTLPGGLAMYHPEWHQGVVGILASRIKERFHRPVI AFAPAGDGTLKGSGRSIQGLHMRDALERLDTLYPGMMLKFGG HAMAAGLSLEEDKFKLFQQRFGELVTEWLDPSLLQGEVVSDG PLSPAEMTMEVAQLLRDAGPWGQMFPEPLFDGHFRLLQQRLV GERHLKVMVEPVGGGPLLDGIAFNVDTALWPDNGVREVQLA YKLDINEFRGNRSLQIIIDNIWPI	220
ラムダエキソ	MTPDIILQRTGIDVRAVEQGDDAWHKLRLGVITASEVHNVIAK PRSGKKWPDMKMSYFHTLLAEVCTGVAPEVNAKALAWGKQ YENDARTLFEFTSGVNVTESPIIYRDESMRTACSPDGLCSDGNG LELKCPFTSRDFMKFRLGGFEAIKSAYMAQVQYSMWVTRKN AWYFANYDPRMKREGLHYVVIERDEKYMASFDEIVPEFIEKM DEALAEIGFVFGEQWR	154
E coli由来のXni(ExoIXI)	MAVHLLIVDALNLIRRIHAVQGSPCVETCQHALDQLIMHSQPT HAVAVFDDENRSSGWRHQRLPDYKAGRPPMPEELHDEMPAL RAAFEQRGVPCWSTSGNEADDLAATLAVKVTQAGHQATIVST DKGYCQLLSPTLRIRDYFQKRWLDAPFIDKEFGVQPQQLPDY WGLAGISSSKVPGVAGIGPKSATQLLVEFQSLEGIYENLDAVA EKWRKKLETHKEMAFLCRDIARLQTDLHIDGNLQQLRLVR	155
SaFEN(Staph aureus)	MPNKILLVDGMALLFRHFYATSLHKQFMYNSQGVPTNGIQGF VRHIFSAIHEIRPTHVAVCWDMGQSTFRNDMFDGYKQNRSAP PEELIPQFDYVKEISEQFGFVNIGVKNYEADDVIGTLAQQYSTD NDVYIITGDKDLLQCINDNVEVWLIKKGFNIYNRYTLHRFNEE YALEPQQLIDIKAFMGDTADGYAGVKGIGEKTAIKLIQQYQSV ENVVENIDALSAGQRNKINDNLDELYLSKRLAEIHTQVPIDSEA LFEKMSFATTLNHILSICNEHELHVSGKYISSHF	156

【０１２５】

いくつかの態様では、システムは、本明細書に記載の少なくとも１つのプログラム可能なエンドヌクレアーゼとは異なる少なくとも１つの追加のエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの態様では、少なくとも１つの追加のエンドヌクレアーゼは、ゲノムフラップを消化することができる。

【０１２６】

いくつかの態様において、本システムは、特にＭＭＲ経路を過剰発現する細胞において、ゲノム編集能力を改善するための優性陰性ＭＭＲペプチドを含む。いくつかの態様では、優性陰性ＭＭＲペプチドは、融合物として（例えば、本明細書に記載されるシステムの

任意の構成要素と融合されて）送達され得るか、動員され得るか、または別個のペプチドとして送達され得る。表１１は、ＭＭＲペプチド配列の非限定的な例を列挙する。

【表１１－１】

表１１．ＭＭＲポリペプチド配列の非限定的な例

名称	MMRペプチド配列	配列番号
MLH1	MSFVAGVIRRLDETVVNRIAAGEVIQRPANAIKEMIENCLDAKSTSIQVIVK EGGLKLIQIQDNGTGIRKEDLDIVCERFTTSKLQSFEDLASISTYGFRGEALA SISHVAHVTITTKTADGKCAYRASYSDGKLKAPPKPCAGNQGTQITVEDLF YNIATRRKALKNPSEEYGKILEVVGRYSVHNAGISFSVKKQGETVADVRTL PNASTVDNIRSIFGNAVSRELIEIGCEDKTLAFKMNGYISNANYSVKKCIFLL FINHRLVESTSLRKAIETVYAAYLPKNTHPFLYLSLEISPQNVDVNVHPTKH EVHFLHEESILERVQQHIESKLLGSNSSRMYFTQTLLPGLAGPSGEMVKSTT SLTSSSTSGSSDKVYAHQMVRTDSREQKLDAFLQPLSKPLSSQPQAIVTED KTDISSGRARQQDEEMLELPAPAEVAAKNQSLEGDTTKGTSEMSEKRGPTS SNPRKRHREDSDVEMVEDDSRKEMTAACTPRRRIINLTSVLSLQEEINEQG HEVLREMLHNHSFVGCVNPQWALAQHQTKLYLLNTTKLSEELFYQILIYD FANFGVLRLSEPAPLFDLAMLALDSPESGWTEEDGPKEGLAEYIVEFLKKK AEMLADYFSLEIDEEGNLIGLPLLIDNYVPPLEGLPIFILRLATEVNWDEEKE CFESLSKECAMFYSIRKQYISEESTLSGQQSEVPGSIPNSWKWTVEHIVYKA LRSHILPPKHFTEDGNILQLANLPDLYKVFERC	157
MLH1 E34A	MSFVAGVIRRLDETVVNRIAAGEVIQRPANAIKAMIENCLDAKSTSIQVIVK EGGLKLIQIQDNGTGIRKEDLDIVCERFTTSKLQSFEDLASISTYGFRGEALA SISHVAHVTITTKTADGKCAYRASYSDGKLKAPPKPCAGNQGTQITVEDLF YNIATRRKALKNPSEEYGKILEVVGRYSVHNAGISFSVKKQGETVADVRTL PNASTVDNIRSIFGNAVSRELIEIGCEDKTLAFKMNGYISNANYSVKKCIFLL FINHRLVESTSLRKAIETVYAAYLPKNTHPFLYLSLEISPQNVDVNVHPTKH EVHFLHEESILERVQQHIESKLLGSNSSRMYFTQTLLPGLAGPSGEMVKSTT SLTSSSTSGSSDKVYAHQMVRTDSREQKLDAFLQPLSKPLSSQPQAIVTED KTDISSGRARQQDEEMLELPAPAEVAAKNQSLEGDTTKGTSEMSEKRGPTS SNPRKRHREDSDVEMVEDDSRKEMTAACTPRRRIINLTSVLSLQEEINEQG HEVLREMLHNHSFVGCVNPQWALAQHQTKLYLLNTTKLSEELFYQILIYD FANFGVLRLSEPAPLFDLAMLALDSPESGWTEEDGPKEGLAEYIVEFLKKK AEMLADYFSLEIDEEGNLIGLPLLIDNYVPPLEGLPIFILRLATEVNWDEEKE CFESLSKECAMFYSIRKQYISEESTLSGQQSEVPGSIPNSWKWTVEHIVYKA LRSHILPPKHFTEDGNILQLANLPDLYKVFERC	158

【表１１－２】

名称	MMRペプチド配列	配列番号
MLH1 del754-756	MSFVAGVIRRLDETVVNRIAAGEVIQRPANAIKEMIENCLDAKSTSIQVIVK EGGLKLIQIQDNGTGIRKEDLDIVCERFTTSKLQSFEDLASISTYGFRGEALA SISHVAHVTITTKTADGKCAYRASYSDGKLKAPPKPCAGNQGTQITVEDLF YNIATRRKALKNPSEEYGKILEVVGRYSVHNAGISFSVKKQGETVADVRTL PNASTVDNIRSIFGNAVSRELIEIGCEDKTLAFKMNGYISNANYSVKKCIFLL FINHRLVESTSLRKAIETVYAAYLPKNTHPFLYLSLEISPQNVDVNVHPTKH EVHFLHEESILERVQQHIESKLLGSNSSRMYFTQTLLPGLAGPSGEMVKSTT SLTSSSTSGSSDKVYAHQMVRTDSREQKLDAFLQPLSKPLSSQPQAIVTED KTDISSGRARQQDEEMLELPAPAEVAAKNQSLEGDTTKGTSEMSEKRGPTS SNPRKRHREDSDVEMVEDDSRKEMTAACTPRRRIINLTSVLSLQEEINEQG HEVLREMLHNHSFVGCVNPQWALAQHQTKLYLLNTTKLSEELFYQILIYD FANFGVLRLSEPAPLFDLAMLALDSPESGWTEEDGPKEGLAEYIVEFLKKK AEMLADYFSLEIDEEGNLIGLPLLIDNYVPPLEGLPIFILRLATEVNWDEEKE CFESLSKECAMFYSIRKQYISEESTLSGQQSEVPGSIPNSWKWTVEHIVYKA LRSHILPPKHFTEDGNILQLANLPDLYKVF	159
MLH1 E34A del 754-756	MSFVAGVIRRLDETVVNRIAAGEVIQRPANAIKAMIENCLDAKSTSIQVIVK EGGLKLIQIQDNGTGIRKEDLDIVCERFTTSKLQSFEDLASISTYGFRGEALA SISHVAHVTITTKTADGKCAYRASYSDGKLKAPPKPCAGNQGTQITVEDLF YNIATRRKALKNPSEEYGKILEVVGRYSVHNAGISFSVKKQGETVADVRTL PNASTVDNIRSIFGNAVSRELIEIGCEDKTLAFKMNGYISNANYSVKKCIFLL FINHRLVESTSLRKAIETVYAAYLPKNTHPFLYLSLEISPQNVDVNVHPTKH EVHFLHEESILERVQQHIESKLLGSNSSRMYFTQTLLPGLAGPSGEMVKSTT SLTSSSTSGSSDKVYAHQMVRTDSREQKLDAFLQPLSKPLSSQPQAIVTED KTDISSGRARQQDEEMLELPAPAEVAAKNQSLEGDTTKGTSEMSEKRGPTS SNPRKRHREDSDVEMVEDDSRKEMTAACTPRRRIINLTSVLSLQEEINEQG HEVLREMLHNHSFVGCVNPQWALAQHQTKLYLLNTTKLSEELFYQILIYD FANFGVLRLSEPAPLFDLAMLALDSPESGWTEEDGPKEGLAEYIVEFLKKK AEMLADYFSLEIDEEGNLIGLPLLIDNYVPPLEGLPIFILRLATEVNWDEEKE CFESLSKECAMFYSIRKQYISEESTLSGQQSEVPGSIPNSWKWTVEHIVYKA LRSHILPPKHFTEDGNILQLANLPDLYKVF	160
MLH1 1-335	MSFVAGVIRRLDETVVNRIAAGEVIQRPANAIKEMIENCLDAKSTSIQVIVK EGGLKLIQIQDNGTGIRKEDLDIVCERFTTSKLQSFEDLASISTYGFRGEALA SISHVAHVTITTKTADGKCAYRASYSDGKLKAPPKPCAGNQGTQITVEDLF YNIATRRKALKNPSEEYGKILEVVGRYSVHNAGISFSVKKQGETVADVRTL PNASTVDNIRSIFGNAVSRELIEIGCEDKTLAFKMNGYISNANYSVKKCIFLL FINHRLVESTSLRKAIETVYAAYLPKNTHPFLYLSLEISPQNVDVNVHPTKH EVHFLHEESILERVQQHIESKLL	161

【表１１－３】

名称	MMRペプチド配列	配列番号
MLH1 1-335 E34A	MSFVAGVIRRLDETVVNRIAAGEVIQRPANAIKAMIENCLDAKSTSIQVIVK EGGLKLIQIQDNGTGIRKEDLDIVCERFTTSKLQSFEDLASISTYGFRGEALA SISHVAHVTITTKTADGKCAYRASYSDGKLKAPPKPCAGNQGTQITVEDLF YNIATRRKALKNPSEEYGKILEVVGRYSVHNAGISFSVKKQGETVADVRTL PNASTVDNIRSIFGNAVSRELIEIGCEDKTLAFKMNGYISNANYSVKKCIFLL FINHRLVESTSLRKAIETVYAAYLPKNTHPFLYLSLEISPQNVDVNVHPTKH EVHFLHEESILERVQQHIESKLL	162
MSH2	MAVQPKETLQLESAAEVGFVRFFQGMPEKPTTTVRLFDRGDFYTAHGEDA LLAAREVFKTQGVIKYMGPAGAKNLQSVVLSKMNFESFVKDLLLVRQYR VEVYKNRAGNKASKENDWYLAYKASPGNLSQFEDILFGNNDMSASIGVV GVKMSAVDGQRQVGVGYVDSIQRKLGLCEFPDNDQFSNLEALLIQIGPKE CVLPGGETAGDMGKLRQIIQRGGILITERKKADFSTKDIYQDLNRLLKGKK GEQMNSAVLPEMENQVAVSSLSAVIKFLELLSDDSNFGQFELTTFDFSQYM KLDIAAVRALNLFQGSVEDTTGSQSLAALLNKCKTPQGQRLVNQWIKQPL MDKNRIEERLNLVEAFVEDAELRQTLQEDLLRRFPDLNRLAKKFQRQAAN LQDCYRLYQGINQLPNVIQALEKHEGKHQKLLLAVFVTPLTDLRSDFSKFQ EMIETTLDMDQVENHEFLVKPSFDPNLSELREIMNDLEKKMQSTLISAARD LGLDPGKQIKLDSSAQFGYYFRVTCKEEKVLRNNKNFSTVDIQKNGVKFT NSKLTSLNEEYTKNKTEYEEAQDAIVKEIVNISSGYVEPMQTLNDVLAQLD AVVSFAHVSNGAPVPYVRPAILEKGQGRIILKASRHACVEVQDEIAFIPNDV YFEKDKQMFHIITGPNMGGKSTYIRQTGVIVLMAQIGCFVPCESAEVSIVDC ILARVGAGDSQLKGVSTFMAEMLETASILRSATKDSLIIIDELGRGTSTYDG FGLAWAISEYIATKIGAFCMFATHFHELTALANQIPTVNNLHVTALTTEETL TMLYQVKKGVCDQSFGIHVAELANFPKHVIECAKQKALELEEFQYIGESQ GYDIMEPAAKKCYLEREQGEKIIQEFLSKVKQMPFTEMSEENITIKLKQLKA EVIAKNNSFVNEIISRIKVTT	163

【表１１－４】

名称	MMRペプチド配列	配列番号
MSH2 G674 A	MAVQPKETLQLESAAEVGFVRFFQGMPEKPTTTVRLFDRGDFYTAHGEDA LLAAREVFKTQGVIKYMGPAGAKNLQSVVLSKMNFESFVKDLLLVRQYR VEVYKNRAGNKASKENDWYLAYKASPGNLSQFEDILFGNNDMSASIGVV GVKMSAVDGQRQVGVGYVDSIQRKLGLCEFPDNDQFSNLEALLIQIGPKE CVLPGGETAGDMGKLRQIIQRGGILITERKKADFSTKDIYQDLNRLLKGKK GEQMNSAVLPEMENQVAVSSLSAVIKFLELLSDDSNFGQFELTTFDFSQYM KLDIAAVRALNLFQGSVEDTTGSQSLAALLNKCKTPQGQRLVNQWIKQPL MDKNRIEERLNLVEAFVEDAELRQTLQEDLLRRFPDLNRLAKKFQRQAAN LQDCYRLYQGINQLPNVIQALEKHEGKHQKLLLAVFVTPLTDLRSDFSKFQ EMIETTLDMDQVENHEFLVKPSFDPNLSELREIMNDLEKKMQSTLISAARD LGLDPGKQIKLDSSAQFGYYFRVTCKEEKVLRNNKNFSTVDIQKNGVKFT NSKLTSLNEEYTKNKTEYEEAQDAIVKEIVNISSGYVEPMQTLNDVLAQLD AVVSFAHVSNGAPVPYVRPAILEKGQGRIILKASRHACVEVQDEIAFIPNDV YFEKDKQMFHIITGPNMGAKSTYIRQTGVIVLMAQIGCFVPCESAEVSIVDC ILARVGAGDSQLKGVSTFMAEMLETASILRSATKDSLIIIDELGRGTSTYDG FGLAWAISEYIATKIGAFCMFATHFHELTALANQIPTVNNLHVTALTTEETL TMLYQVKKGVCDQSFGIHVAELANFPKHVIECAKQKALELEEFQYIGESQ GYDIMEPAAKKCYLEREQGEKIIQEFLSKVKQMPFTEMSEENITIKLKQLKA EVIAKNNSFVNEIISRIKVTT	164

【表１１－５】

名称	MMRペプチド配列	配列番号
MSH2 N671I	MAVQPKETLQLESAAEVGFVRFFQGMPEKPTTTVRLFDRGDFYTAHGEDA LLAAREVFKTQGVIKYMGPAGAKNLQSVVLSKMNFESFVKDLLLVRQYR VEVYKNRAGNKASKENDWYLAYKASPGNLSQFEDILFGNNDMSASIGVV GVKMSAVDGQRQVGVGYVDSIQRKLGLCEFPDNDQFSNLEALLIQIGPKE CVLPGGETAGDMGKLRQIIQRGGILITERKKADFSTKDIYQDLNRLLKGKK GEQMNSAVLPEMENQVAVSSLSAVIKFLELLSDDSNFGQFELTTFDFSQYM KLDIAAVRALNLFQGSVEDTTGSQSLAALLNKCKTPQGQRLVNQWIKQPL MDKNRIEERLNLVEAFVEDAELRQTLQEDLLRRFPDLNRLAKKFQRQAAN LQDCYRLYQGINQLPNVIQALEKHEGKHQKLLLAVFVTPLTDLRSDFSKFQ EMIETTLDMDQVENHEFLVKPSFDPNLSELREIMNDLEKKMQSTLISAARD LGLDPGKQIKLDSSAQFGYYFRVTCKEEKVLRNNKNFSTVDIQKNGVKFT NSKLTSLNEEYTKNKTEYEEAQDAIVKEIVNISSGYVEPMQTLNDVLAQLD AVVSFAHVSNGAPVPYVRPAILEKGQGRIILKASRHACVEVQDEIAFIPNDV YFEKDKQMFHIITGPIMGGKSTYIRQTGVIVLMAQIGCFVPCESAEVSIVDCI LARVGAGDSQLKGVSTFMAEMLETASILRSATKDSLIIIDELGRGTSTYDGF GLAWAISEYIATKIGAFCMFATHFHELTALANQIPTVNNLHVTALTTEETLT MLYQVKKGVCDQSFGIHVAELANFPKHVIECAKQKALELEEFQYIGESQG YDIMEPAAKKCYLEREQGEKIIQEFLSKVKQMPFTEMSEENITIKLKQLKAE VIAKNNSFVNEIISRIKVTT	165

【０１２７】
システムは、片側リプレーサー１に関する場合がある。いくつかの態様は、（ａ）少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと、（ｂ）（ｉ）細胞内のゲノム遺伝子座に相補的なスペーサー、（ｉｉ）少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと複合体化するための足場、（ｉｉｉ）組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択のドナー結合部位、（ｉｖ）ゲノム遺伝子座における、またはそれに隣接するゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的であるフラップ結合部位を含む、少なくとも１つのガイド核酸と、（ｃ）少なくとも１つのＤＮＡリガーゼと、（ｄ）組み込み核酸と、を含むシステムを含み、任意選択的に、少なくとも１つのガイド核酸に少なくとも部分的に相補的であるガイド結合部位を含み、少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは、ゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断し、少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、組み込み核酸の末端をゲノムフラップ部位にライゲーションし、それによって、遺伝子座の領域を細胞内の組み込み核酸と置き換える。組み込み核酸は、一本鎖ＤＮＡを含み得る。

【０１２８】
システムは、両側リプレーサー１に関する場合がある。いくつかの態様は、（ａ）第１のＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ及び任意選択の第２のＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含む少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと、（ｂ）第１のガイド核酸及び第２のガイド核酸を含む少なくとも１つのガイド核酸であって、第１のガイド核酸が、（ｉ）細胞内のゲノム遺伝子座の第１の領域に相補的な第１のスペーサー、（ｉｉ）第１のＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと複合体化するための第１の足場、及び（ｉｉｉ）組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的な任意選択の第１のドナー結合部位、（ｉｖ）ゲノム遺伝子座における、またはそれに隣接する第１のゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的である第１のフラップ結合部位とを含み、第２のガイド核酸が、（ｉ）細胞内のゲノム遺伝子座の第２の領域に相補的な第２のスペーサー、（ｉｉ）第１または第２のＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと複合体化するための第２の足場、（ｉｉｉ）組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択の第２のドナー結合部位、（ｉｖ）ゲノム遺伝子座における、またはそれに隣接する第２のゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的である第２のフラップ結合部位を含む、少なくとも１つのガイド核酸と、（ｃ）第１のＤＮＡリガーゼ及び任意選択の第２のＤＮＡリガーゼを含む少なくとも１つのＤＮＡリガーゼと、（ｄ）第１の鎖及び第２の鎖を含む少なくとも１つの組み込み核酸であって、（ｉ）第１の鎖が、第１のガイド核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択の第１のガイド結合部位を含み、（ｉｉ）第２の鎖が、第２のガイド核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択の第２のガイド結合部位を含む、少なくとも１つの組み込み核酸と、を含む、システムを含み、第１のＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ及び／または第２のＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼが各々、細胞内のゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断し、第１のＤＮＡリガーゼが、組み込み核酸の第１の鎖の末端を第１のゲノムフラップにライゲーションし、第１または第２のＤＮＡリガーゼが、組み込み核酸の第２の鎖の末端を第２のゲノムフラップにライゲーションし、それによりゲノム遺伝子座の領域を細胞内の組み込み核酸と置き換える。組み込み核酸は、二本鎖ＤＮＡ二重鎖領域を含み得る。組み込み核酸は、任意選択的に、第１のガイド結合部位を含む５’オーバーハングを含み得る。組み込み核酸は、任意選択的に、第２のガイド結合部位を含む５’オーバーハングを含み得る。

【０１２９】
システムは、片側リプレーサー２に関する場合がある。いくつかの態様は、（ａ）少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと、（ｂ）（ｉ）細胞内のゲノム遺伝子座に相補的なスペーサー、（ｉｉ）少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと複合体化するための足場、及び（ｉｉｉ）組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択のドナー結合部位を含む少なくとも１つのガイド核酸と、（ｃ）少なくとも１つのＤＮＡリガーゼと、（ｄ）（ｉ）少なくとも１つのガイド核酸に少なくとも部分的に相

補的な任意選択のガイド結合部位を含み、（ｉｉ）ゲノム遺伝子座における、またはそれに隣接するゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的なフラップ結合部位を含む組み込み核酸と、を含むシステムを含み、少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼが、ゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断し、少なくとも１つのＤＮＡリガーゼが、組み込み核酸の末端をゲノムフラップにライゲーションし、それによって、ゲノム遺伝子座の領域を細胞内の組み込み核酸と置き換える。組み込み核酸は、３’オーバーハングを含むＤＮＡを含み得る。３’オーバーハングは、ガイド結合部位を含み得る。３’オーバーハングは、フラップ結合部位を含み得る。少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、組み込み核酸の鎖をゲノム核酸配列にライゲーションし得る。

【０１３０】

システムは、両側リプレーサー２に関する場合がある。いくつかの態様は、（ａ）第１のＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ及び任意選択の第２のＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含む少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと、（ｂ）第１のガイド核酸及び第２のガイド核酸を含む少なくとも１つのガイド核酸であって、第１のガイド核酸が、（ｉ）細胞内のゲノム遺伝子座の第１の領域に相補的な第１のスペーサー、（ｉｉ）第１のＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと複合体化するための第１の足場、及び（ｉｉｉ）組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的な任意選択の第１のドナー結合部位を含み、第２のガイド核酸が、（ｉ）細胞内のゲノム遺伝子座の第２の領域に相補的な第２のスペーサー、（ｉｉ）第１または第２のＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと複合体化するための第２の足場、及び（ｉｉｉ）組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的な任意選択の第２のドナー結合部位を含む、少なくとも１つのガイド核酸と、第１のＤＮＡリガーゼ及び任意選択の第２のＤＮＡリガーゼを含む少なくとも１つのＤＮＡリガーゼと、第１の鎖及び第２の鎖を含む組み込み核酸であって、第１の鎖は、第１のガイド核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択の第１のガイド結合部位を含み、第２の鎖は、第２のガイド核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択の第２のガイド結合部位を含み、第１の鎖は、ゲノム遺伝子座における、またはゲノム遺伝子座に隣接している第１のゲノムフラップと少なくとも部分的に同一または相補的である第１のフラップ結合部位を含み、第２の鎖は、ゲノム遺伝子座における、またはゲノム遺伝子座に隣接する第２のゲノムフラップと少なくとも部分的に同一または相補的である第２のフラップ結合部位を含む、組み込み核酸と、を含むシステムを含み、第１のＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ及び／または第２のＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは各々、細胞内のゲノム遺伝子座の少なくとも１つの鎖を切断し、第１のＤＮＡリガーゼは、組み込み核酸の第１の鎖の末端を第１のゲノムフラップにライゲーションし、第１または第２のＤＮＡリガーゼは、組み込み核酸の第２の鎖の末端を第２のゲノムフラップにライゲーションし、それによってゲノム遺伝子座の領域を細胞内の組み込み核酸と置き換える。組み込み核酸は、二本鎖ＤＮＡ二重鎖領域を含み得る。二本鎖ＤＮＡは、任意選択で、第１のガイド結合部位を含み、第１のフラップ結合部位を含む、３’オーバーハングを含み得る。二本鎖ＤＮＡは、任意選択で、第２のガイド結合部位を含み、第２のフラップ結合部位を含む、３’オーバーハングを含み得る。

【０１３１】

システムでは、少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは、Ｃａｓタンパク質またはその機能的断片を含み得る。Ｃａｓタンパク質またはその機能的断片は、ニッカーゼ活性を含み得る。少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは、Ｃａｓ９ニッカーゼまたはその機能的断片を含み得る。少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、ＤＮＡに結合した核酸をライゲーションし得る。少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、ＲＮＡに結合した核酸をライゲーションし得る。少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、ＰＢＣＶ－１　ＤＮＡリガーゼを含み得る。少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼに作動可能にカップリングされ得る。少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、融合ポリペプチドとして少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼに融合され得る。少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ及び少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、ヘテロ二量体ドメインを含み得る。少なくとも１つのＲＮＡ

誘導型エンドヌクレアーゼ及び少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、ヘテロ二量体ドメインを介してヘテロ二量体を形成し得る。少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは、リンカーを含み得る。リンカーは、Ｃａｓタンパク質またはその機能的断片をヘテロ二量体ドメインに接続し得る。少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは、局在化シグナル配列を含み得る。少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、局在化シグナル配列を含み得る。局在化シグナル配列は、核局在化配列（ＮＬＳ）を含み得る。少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼまたは少なくとも１つのＤＮＡリガーゼは、ＮＬＳによって細胞の核に誘導され得る。少なくとも１つの組み込み核酸は、少なくとも１つの遺伝子座における少なくとも１つの遺伝子変異を修正し得る。少なくとも１つの組み込み核酸は、コード配列を挿入し得る。コード配列は、完全長タンパク質をコードし得る。少なくとも１つの組み込み核酸は、非コード配列を挿入し得る。非コード配列は、内因性遺伝子をノックアウトし得る。非コード配列は、調節エレメントを含み得る。システムは、ヌクレアーゼを更に含み得る。ヌクレアーゼは、ゲノムフラップを消化するためのエキソヌクレアーゼを含み得る。ヌクレアーゼは、ヒトフラップエンドヌクレアーゼ１（ｈＦＥＮ１）、ヒトエキソヌクレアーゼ５（ｈＥＸＯ５）、Ｔ５エキソヌクレアーゼ、Ｔ７エキソヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼＶＩＩＩ、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＰｏｌＩのフラップエンドヌクレアーゼドメイン、ＲｅｃＪＦ、ラムダエキソヌクレアーゼ、Ｘｎｉ（ＥｘｏＩＸＩ）、ＳａＦＥＮ（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　ＦＥＮ）、ヌクレアーゼＢＡＬ－３１、またはそれらの断片を含み得る。異種ヌクレアーゼは、ゲノムフラップを消化するためのエンドヌクレアーゼを含み得、エンドヌクレアーゼは、少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼとは異なる場合がある。少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは、少なくとも１つの追加の機能ドメインを含み得る。少なくとも１つの追加の機能ドメインは、クロマチン修飾ドメインを含み得る。少なくとも１つの追加の機能ドメインは、細胞透過性ペプチドを含み得る。少なくとも１つのガイド核酸は、少なくとも１つの核酸修飾を含み得る。少なくとも１つの核酸修飾は、骨格、糖、塩基、またはそれらの組み合わせに対する修飾を含み得る。少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼは、少なくとも１つのガイド核酸と複合体化され得る。少なくとも１つのガイド核酸は、組み込み核酸と複合体化され得る。少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ、少なくとも１つのガイド核酸、少なくとも１つの少なくとも１つのＤＮＡリガーゼ、組み込み核酸、またはそれらの組み合わせは、ポリヌクレオチドによってコードされ得る。ポリヌクレオチドは、ｍＲＮＡを含み得る。ポリヌクレオチドは、ベクターを含み得る。ベクターは、ウイルスベクターを含み得る。少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ、少なくとも１つのガイド核酸、少なくとも１つの少なくとも１つのＤＮＡリガーゼ、組み込み核酸、またはそれらの組み合わせは、少なくとも１つの脂質ナノ粒子によって封入され得る。細胞は、細菌細胞または原核細胞を含み得る。細胞は、原核細胞を含み得る。原核細胞は、細菌細胞を含み得る。編集は、細菌細胞の細胞質内で行うことができる。細胞は、真核細胞を含み得る。真核細胞は、動物細胞または植物細胞を含み得る。真核細胞は、植物細胞を含み得る。真核細胞は、動物細胞を含み得る。真核細胞は、哺乳動物細胞を含み得る。編集は、真核細胞の細胞質内で行うことができる。編集は、真核細胞の核内で行うことができる。システムまたはシステムの任意の態様は、組成物に含まれ得るか、または細胞株などの細胞に含まれ得る。

【０１３２】

いくつかの態様は、核酸を含むシステムに関する。システムは、ガイド核酸、組み込み核酸、またはそれらの組み合わせを含み得る。いくつかの態様は、核酸のシステムに関する。システムは、ガイド核酸のシステムを含み得る。このシステムは、組み込み核酸のシステムを含み得る。核酸のシステムは、追加の核酸または非核酸成分などの他の態様を更に含み得る。

【０１３３】

核酸のシステムは、ガイド核酸を含み得る。ガイド核酸は、スペーサーを含み得る。スペーサーは、ゲノム鎖などの標的核酸の遺伝子座（例えば、ゲノム遺伝子座）の領域に相

補的であり得る。標的核酸は、細胞内にあり得る。ゲノム鎖は、細胞内にあり得る。標的核酸は、インビトロであり得る。ガイド核酸は、足場を含み得る。足場は、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼと複合体化し得る。ガイド核酸は、フラップ結合部位を含み得る。フラップ結合部位は、ゲノムフラップなどのフラップに相補的であり得るか、または少なくとも部分的に相補的であり得る。フラップ結合部位は、ゲノムフラップなどのフラップと同一であり得るか、または少なくとも部分的に同一であり得る。フラップは、遺伝子座にあり得る。フラップは、遺伝子座に隣接し得る。ガイド核酸は、ドナー結合部位を含み得る。ドナー結合部位は、組み込み核酸に相補的であり得る。ドナー結合部位は、組み込み核酸に部分的に相補的であり得る。ドナー結合部位は、スプリント核酸に相補的であり得る。ドナー結合部位は、スプリント核酸に部分的に相補的であり得る。ガイド核酸の構成要素は、１つのガイド核酸に含まれ得る。２つ以上のガイド核酸が使用され得る。ガイド核酸の構成要素は、複数のガイド核酸の中にまとめて含まれ得る。ガイド核酸の構成要素は、複数のガイド核酸間で分割され得る。

【０１３４】

核酸のシステムは、組み込み核酸を含み得る。組み込み核酸は、ライゲーションされる５’末端を含み得る。５’末端は、ライゲーションされ得る。５’末端は、３’末端にライゲーションされ得る。３’末端は、標的核酸鎖（例えば、ゲノム鎖）のものであり得る。３’末端は、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼによって生成され得る。組み込み核酸は、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼによって生成されたゲノム鎖の３’末端にライゲーションされる５’末端を含み得る。組み込み核酸の構成要素は、１つまたは２つの相補鎖に含まれ得る。組み込み核酸の構成要素は、１つの組み込み核酸に含まれ得る。複数の組み込み核酸が使用され得る。組み込み核酸の構成要素は、複数の組み込み核酸の中にまとめて含まれ得る。組み込み核酸の構成要素は、複数の組み込み核酸間で分割され得る。

【０１３５】

核酸のシステムは、スプリント核酸（「スプリント鎖」とも称される）を含み得る。スプリント鎖は、ライゲーションされる末端を含む２つの核酸にハイブリダイズし得る。スプリント核酸は、フラップ結合部位を含み得る。フラップ結合部位は、フラップに相補的であり得る。フラップ結合部位は、フラップに部分的に相補的であり得る。フラップ結合部位は、フラップと同一であり得る。フラップ結合部位は、フラップと部分的に同一であり得る。フラップは、標的核酸の遺伝子座にあり得る。フラップは、標的核酸の遺伝子座に隣接し得る。フラップは、ゲノムフラップであり得る。遺伝子座は、ゲノム遺伝子座であり得る。フラップ結合部位は、ゲノム遺伝子座における、またはゲノム遺伝子座に隣接するゲノムフラップと少なくとも部分的に同一であるか、または相補的であり得る。スプリント核酸は、ガイド結合部位を含み得る。ガイド結合部位は、ガイド核酸に相補的であり得る。ガイド結合部位は、ガイド核酸に部分的に相補的であり得る。スプリント核酸の構成要素は、１つのスプリント核酸に含まれ得る。２つ以上のスプリント核酸が使用され得る。スプリント核酸は、ドナー結合部位を含み得る。ドナー結合部位は、組み込み核酸に相補的であり得る。ドナー結合部位は、組み込み核酸に部分的に相補的であり得る。

【０１３６】

スプリント鎖は、ＤＮＡであり得るか、またはＤＮＡを含み得る。スプリント鎖は、ＲＮＡであり得るか、またはＲＮＡを含み得る。スプリント核酸は、組み込み核酸の一部として含まれ得る。スプリント核酸は、二本鎖組み込み核酸の鎖として含まれ得る。スプリント核酸は、組み込み核酸の一部として含まれ得る。

【０１３７】

核酸のシステムは、（ａ）ガイド核酸であって、（ｉ）ゲノム鎖のゲノム遺伝子座の領域に相補的なスペーサー、（ｉｉ）ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼと複合体化するための足場、（ｉｉｉ）組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択のドナー結合部位、及び（ｉｖ）ゲノム遺伝子座における、またはそれに隣接するゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的であるフラップ結合部位を含む、ガイド核酸と、（

ｂ）ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼによって生成されたゲノム鎖の３’末端にライゲーションされる５’末端を含む組み込み核酸と、を含み得る。（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）、または（ｉｖ）の構成要素は、単一のガイド核酸に含まれ得るか、または複数のガイド核酸の間で分割され得るか、もしくは複数のガイド核酸の中にまとめて含まれ得る。

【０１３８】

核酸のシステムは、（ａ）（ｉ）ゲノム鎖のゲノム遺伝子座の領域に相補的なスペーサー、（ｉｉ）ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ、及び（ｉｉｉ）スプリント核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択のドナー結合部位を含む、ガイド核酸と、（ｂ）ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼによって生成されたゲノム鎖の３’末端にライゲーションされる５’末端を含む組み込み核酸と、（ｃ）ゲノム遺伝子座における、またはそれに隣接するゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的であるフラップ結合部位を含み、かつガイド核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択のガイド結合部位を含むスプリント核酸と、を含み得る。（ｉ）、（ｉｉ）、または（ｉｉｉ）の構成要素は、単一のガイド核酸に含まれ得るか、または複数のガイド核酸の間で分割され得るか、もしくは複数のガイド核酸の中にまとめて含まれ得る。

【０１３９】

いくつかの態様では、本明細書に記載のシステムは、細胞内に送達され得、システムの構成要素のうちの１つ以上は、一緒に細胞内に送達され得る。いくつかの態様では、システムの各構成要素は、細胞に別々に送達され得る。いくつかの態様では、システムは、異種ポリヌクレオチドなどのポリヌクレオチドによってコードされ得、ポリヌクレオチドは、細胞内に送達され、ポリヌクレオチドは、細胞によって発現されて、細胞の構成要素を生成する。いくつかの態様では、本システムは、ｍＲＮＡを含むポリヌクレオチドを介してコードされ、細胞内に送達され得る。いくつかの態様では、本システムは、ベクターを含むポリヌクレオチドを介してコードされ、細胞内に送達され得る。いくつかの態様では、ベクターは、ウイルスベクターを含む。システムは、脂質もしくはナノ粒子、または複数の脂質もしくはナノ粒子に封入され得る。いくつかの態様では、システムは、少なくとも１つの脂質ナノ粒子に封入され得る。いくつかの態様では、本システムは、リボヌクレオタンパク質（ＲＮＰ）を含む。例えば、本明細書に記載の少なくとも１つのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）は、送達のために、本明細書に記載の少なくとも１つのガイド核酸と複合体化され得る（例えば、ＣＲＩＳＰＲリボ核酸タンパク質を形成する）。いくつかの態様では、システムは、少なくとも１つの第１のガイド核酸と複合体化された、または少なくとも１つの第２のガイド核酸と複合体化されたＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを含む少なくとも１つのＲＮＰを含む。いくつかの態様では、システムは、少なくとも１つのＲＮＰ及び少なくとも１つの組み込み核酸（例えば、本明細書に記載される一本鎖または二本鎖の組み込み核酸）を含む。いくつかの態様では、システムは、少なくとも１つのＲＮＰ及び少なくとも１つの組み込み核酸を含む。いくつかの態様では、システムは、少なくとも１つのＲＮＰ及び少なくとも１つの第１の組み込み核酸または少なくとも１つの第２の組み込み核酸を含む。

【０１４０】

いくつかの態様では、本明細書に記載のシステムは、細胞内のゲノム遺伝子座または遺伝子を修飾することができる。いくつかの態様では、細胞は、細菌細胞、真核生物細胞、または植物細胞を含む。いくつかの態様では、本明細書に記載のシステムは、組成物、薬学的組成物、キット、またはそれらの組み合わせに製剤化することができる。いくつかの態様では、本明細書に記載のシステムは、細胞株において送達及び増殖させることができる。

【０１４１】

いくつかの態様は、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ、ガイド核酸、及び組み込み核酸を含む編集システムを含む。いくつかの態様は、標的核酸を編集システム及びＤＮＡリガーゼと接触させることを含む、編集方法を含む。

【０１４２】

薬学的組成物

本明細書に記載されるのは、いくつかの態様では、本明細書に記載のシステムまたは組成物を含む、薬学的組成物である。薬学的組成物は、薬学的に許容される賦形剤、担体、または希釈剤を含み得る。薬学的組成物は、担体を含み得る。薬学的組成物は、賦形剤を含み得る。薬学的組成物は、対象に送達され得る。薬学的組成物は、細胞に送達され得る。薬学的組成物は、本明細書に開示される方法において使用され得る。

【０１４３】

本明細書に記載の薬学的組成物は、システム、組成物、またはシステムと接触するか、または組成物と接触する細胞を含む。薬学的組成物は、本明細書に開示されるタンパク質または核酸などの組成物を含み得る。薬学的組成物は、本明細書に開示される組成物またはシステムを含む細胞を含み得る。

【０１４４】

薬学的組成物は、薬学的組成物と、担体、賦形剤、結合剤、充填剤、懸濁剤、香味剤、甘味剤、崩壊剤、分散剤、界面活性剤、潤滑剤、着色剤、希釈剤、可溶化剤、加湿剤、可塑剤、安定剤、貫通促進剤、湿潤剤、消泡剤、抗酸化剤、防腐剤、またはそれらの１つ以上の組み合わせなどの他の化学成分（すなわち、薬学的に許容される不活性成分）との混合物を含んでもよい。本明細書に提供される治療または使用の方法を実施する際に、本明細書に記載される薬学的組成物の治療有効量は、治療される疾患、障害、または状態を有する哺乳動物に投与される。いくつかの態様では、哺乳動物は、ヒトである。治療有効量は、疾患の重症度、対象の年齢及び相対的な健康状態、使用される薬学的組成物の効力、ならびに他の因子に応じて広く変動し得る。薬学的組成物は、単独で、または１つ以上の薬学的組成物と組み合わせて、混合物の構成要素として使用することができる。

【０１４５】

薬学的組成物は、髄腔内、眼内、硝子体内、網膜、静脈内、筋肉内、脳室内、大脳内、小脳内、側脳室内、脳実質内、皮下、腫瘍内、肺内、気管内、腹腔内、膀胱内、膣内、直腸内、経口、舌下、経皮、吸入による、吸入された噴霧形態による、管腔内ＧＩ経路による、またはそれらの組み合わせによって、それを必要とする対象に投与するために製剤化され得る。

【０１４６】

本明細書に記載の薬学的製剤は、静脈内、動脈内、経口、非経口、頬側、局所、経皮、直腸、筋肉内、皮下、骨内、経粘膜、吸入、または腹腔内投与経路を含むがこれらに限定されない適切な投与経路によって対象に投与される。本明細書に記載の薬学的製剤には、限定するものではないが、水性液体分散液、自己乳化分散液、固体溶液、リポソーム分散液、エアロゾル、固体剤形、粉末、即時放出製剤、制御放出製剤、高速溶解製剤、錠剤、カプセル剤、丸剤、遅延放出製剤、徐放性製剤、脈動放出製剤、多粒子製剤、ならびに混合即時放出製剤及び制御放出製剤が含まれる。薬学的組成物を含む薬学的組成物は、単なる例として、従来の混合、溶解、造粒、糖剤製造、微粒化、乳化、カプセル化、封入または圧縮プロセスなどの従来の様式で製造される。

【０１４７】

薬学的組成物は、遊離酸もしくは遊離塩基形態、または薬学的に許容される塩形態の活性成分として、少なくとも薬学的組成物を含み得る。更に、本明細書に記載の方法及び薬学的組成物は、Ｎ－オキシド（適切な場合）、結晶形、非晶質相、ならびに同じ種類の活性を有するこれらの化合物の活性代謝物の使用を含む。いくつかの態様では、薬学的組成物は、非溶媒和形態で、または水、エタノールなどの薬学的に許容される溶媒との溶媒和形態で存在する。薬学的組成物の溶媒和形態もまた、本明細書に開示されると考えられる。

【０１４８】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、互変異性体として存在する。全ての互変異性体は、本明細書に提示される薬剤の範囲内に含まれる。したがって、薬学的組成物またはその塩は、２つの原子の間で水素原子を交換することによって容易に相互変換することがで

き、それがいずれかに共有結合を形成する２つの化合物が、互変異性の現象を示し得ることを理解されたい。互変異性化合物は、互いに移動平衡で存在するため、それらは、同じ化合物の異なる異性形態とみなすことができる。

【０１４９】

いくつかの態様では、薬学的組成物は、鏡像異性体、ジアステレオマー、または他の立体異性形態として存在する。本明細書に開示される薬剤には、全ての鏡像異性体、ジアステレオマー、及びエピマー形態、ならびにそれらの混合物が含まれる。

【０１５０】

いくつかの態様では、本明細書に記載の薬学的組成物は、プロドラッグとして調製することができる。「プロドラッグ」とは、インビボで親薬物に変換される薬剤を指す。いくつかの状況では、プロドラッグは、親薬物よりも投与が容易であり得るため、プロドラッグはしばしば有用である。それらは、例えば、親がそうでない一方で、経口投与によって生物学的に利用可能であり得る。プロドラッグはまた、親薬物よりも薬学的組成物中の改善された溶解性を有し得る。ある特定の実施形態では、インビボで投与されると、プロドラッグは、薬学的組成物の生物学的に、薬学的に、または治療的に活性な形態に化学的に変換される。ある特定の実施形態では、プロドラッグは、１つ以上のステップまたはプロセスによって、薬学的組成物の生物学的、薬学的、または治療的に活性な形態に酵素的に代謝される。

【０１５１】

キット

本明細書に記載されるのは、いくつかの態様では、本明細書に記載のシステム、組成物、または薬学的組成物を使用するためのキットである。いくつかの態様では、本明細書に開示されるキットは、対象における疾患または状態を治療するために使用され得る。いくつかの態様では、キットは、システム、組成物、または薬学的組成物とは別の材料または構成要素のアセンブリを含む。いくつかの態様では、キットは、疾患または状態を治療するための好適なガイド核酸またはドナー鎖をアッセイし、選択するための構成要素を含む。いくつかの態様では、キットは、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、単一分子アレイ（Ｓｉｍｏａ）、ＰＣＲ、またはｑＰＣＲなどのアッセイを行うための構成要素を含む。キットに構成されている構成要素の正確な性質は、その意図された目的によって異なる。例えば、いくつかの実施形態は、対象において本明細書に開示される疾患または状態を治療する目的のために構成される。いくつかの態様では、キットは、特に、哺乳動物対象を治療する目的で構成される。いくつかの態様では、キットは、特に、ヒト対象を治療する目的で構成される。

【０１５２】

使用説明書がキットに含まれ得る。いくつかの態様では、キットは、組成物を、それを必要とする対象に投与するための説明書を含む。いくつかの態様では、キットは、本明細書に記載されるシステムを更に操作するための説明書を含む。いくつかの態様では、キットは、保管または輸送中に凍結保存または凍結乾燥され得る、システムの少なくとも１つの構成要素を解凍するか、またはそうでなければその生物学的活性を回復させるための説明書を含む。いくつかの態様では、キットは、その意図された目的のための有効性（例えば、対象を治療するために使用される場合の治療有効性）を測定するための説明書を含む。

【０１５３】

キットは、本明細書に開示されるシステムまたは組成物、及び容器を含み得る。本組成物は薬学的組成物であり得る。

【０１５４】

方法

本明細書に記載されるのは、標的核酸を修飾する方法などの方法である。本明細書に記載されるのは、遺伝子編集または遺伝子置き換えの方法などの方法である。本方法は、エンドヌクレアーゼ、リガーゼ、ガイド核酸、組み込み核酸、システム、キット、または薬

学的組成物などの本明細書に記載される組成物の任意の態様の使用を含み得る。

【０１５５】

遺伝子編集または置き換え

本明細書に開示されるのは、遺伝子編集方法または核酸編集方法などの編集方法である。本明細書に開示される編集ツール及び方法は、遺伝子増強、遺伝子修正、疾患の治療、研究ツールの開発、または疾患診断に有用であり得る。本方法は、治療目的、農業目的、工業目的、及び研究目的のために行われ得る。編集方法は、標的核酸を編集システム及びリガーゼと接触させることを含み得る。標的核酸は、二本鎖であり得る。標的核酸は、宿主または細胞ゲノムを含み得る。標的核酸は、宿主中に病原体ゲノムを含み得る。標的核酸は、遺伝子の一部であり得るか、または非遺伝子もしくは遺伝子間配列を含み得る。標的核酸は、細胞の核に存在し得る。標的核酸は、クロマチン、ユークロマチン、またはヘテロクロマチンを含み得る。標的核酸は、ＤＮＡを含み得る。本明細書で遺伝子編集方法またはゲノム編集方法と称される方法は、必ずしもある特定の遺伝子の編集に限定されることなく、核酸編集に有用であり得る。方法は、標的核酸配列を、組み込み核酸の配列で置き換えることを含み得る。方法は、インビトロで行われ得る。方法は、インビボで行われ得る。方法は、細胞内で行われ得る。編集は、相同組換えなしで行われ得る。編集は、宿主ゲノムへの事前挿入なしで行われ得る。

【０１５６】

いくつかの態様では、本明細書に開示されるのは、編集方法である。方法は、核酸を編集することを含み得る。核酸は、細胞内にあり得る。編集は、ＤＮＡリガーゼを使用して行われ得る。編集は、ＣＲＩＳＰＲタンパク質を使用して行われ得る。編集は、内因性因子との任意の著しい化学的相互作用なしに、ＣＲＩＳＰＲタンパク質またはＤＮＡリガーゼを使用して行われ得る。編集は、ＤＮＡポリメラーゼなどのポリメラーゼとの任意の著しい化学的相互作用なしに、ＣＲＩＳＰＲタンパク質またはＤＮＡリガーゼを使用して行われ得る。いくつかの態様では、編集は、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓエンドヌクレアーゼ）またはＤＮＡリガーゼを使用して行われ得、エンドヌクレアーゼ及びＤＮＡリガーゼは、カップリングされる。例えば、エンドヌクレアーゼ及びＤＮＡリガーゼは、編集を行うための融合タンパク質として共有結合的にカップリングされ得る。方法は、細胞における核酸を編集することを含み得、編集は、内因性因子またはポリメラーゼとの任意の著しい化学的相互作用なしにＣａｓエンドヌクレアーゼを使用して行われる。方法は、細胞における核酸を編集することを含み得、編集は、ＮＨＥＪまたはＨＤＲの内因性細胞構成要素との任意の著しい化学的相互作用なしにＣａｓエンドヌクレアーゼを使用して行われる。編集方法は、核酸の重合または細胞内合成を除外し得る。例えば、方法は、ガイド核酸上のテンプレートから細胞内合成を除外し得る。

【０１５７】

編集は、いくつかの態様では、細胞に外因性の因子によってのみ行われ得る。外因性因子は、細胞に添加され得るか、または細胞に添加された核酸によってコードされ得る。いくつかの態様では、外因性因子が細胞に付加される。いくつかの態様では、外因性因子は、細胞に付加された核酸によってコードされる。因子としては、Ｃａｓエンドヌクレアーゼ及びＤＮＡリガーゼが挙げられ得る。Ｃａｓエンドヌクレアーゼは、ＤＮＡ結合タンパク質であり得るか、またはそれを含み得る。

【０１５８】

編集は、標的核酸内のヌクレオチドまたはヌクレオチド配列を置き換えることを含み得る。編集は、ヌクレオチドを置き換えることを含み得る。編集は、ヌクレオチド配列を置き換えることを含み得る。ヌクレオチドまたはヌクレオチド配列は、組み込み核酸で置き換えられ得る。編集は、核酸のヌクレオチドまたはヌクレオチド配列を組み込み核酸で置き換えることを含み得る。いくつかの態様では、ヌクレオチドを置き換えることは、核酸のホスホジエステル結合を破壊し、組み込み核酸との新しいホスホジエステル結合を形成することを含む。いくつかの態様では、置き換えは、置き換え部位における核酸内に残りのニックまたは鎖切断を残すことなく、核酸内の置き換え部位で行われる。いくつかの態

様では、編集は、編集された核酸の未編集領域にホスホジエステル結合に隣接する編集された領域を含む編集された核酸を生成する。

【０１５９】

本明細書に記載されるのは、いくつかの態様では、細胞における遺伝子を修正するか、または遺伝子発現を修飾するための方法である。いくつかの態様では、方法は、細胞を、本明細書に記載されるシステムまたは組成物と接触させることを含む。いくつかの態様では、方法は、異種ポリヌクレオチドを細胞内に送達することを含み、異種ポリヌクレオチドは、システムの少なくとも１つの構成要素をコードする。いくつかの態様では、本明細書に記載されるシステムは、ドナー鎖をゲノム遺伝子座に導入することができる。いくつかの態様では、システムは、細胞の内因性機構を必要とせずにドナー鎖を導入することができる。いくつかの態様では、システムは、細胞周期を同期させる必要なしに、ドナー鎖を導入することができる。いくつかの態様では、システムは、非分裂細胞または遅い分裂細胞にドナー鎖を導入することができる。そのような技術的態様は、疾患または状態を治療するための非分裂細胞または遅い分裂細胞における遺伝子変異を修正するために特に有用であり得る。

【０１６０】

方法は、細胞の核酸を編集することを含み得る。いくつかの実施形態では、細胞は、静止または老化細胞である。細胞は、静止していてもよい。細胞は、老化していてもよい。いくつかの態様では、細胞は、能動的に分裂していない。細胞は、他の細胞または細胞型と比較して低いｄＮＴＰ濃度を有し得る。細胞のいくつかの例は、ニューロン、筋細胞、心筋細胞、または骨細胞を含み得る。細胞は、ニューロンを含み得る。細胞は、筋細胞を含み得る。細胞は、心筋細胞を含み得る。細胞は、骨細胞を含み得る。細胞は、眼細胞を含み得る。

【０１６１】

細胞は、胚性幹細胞などの幹細胞、または成体幹細胞などを含み得る。細胞は、血液細胞などの循環細胞であり得る。細胞は、骨髄細胞を含み得る。細胞は、免疫細胞であり得る。細胞は、先天性免疫細胞であり得る。

【０１６２】

細胞は、気道細胞であり得る。細胞は、肺細胞であり得る。細胞は、気管支細胞であり得る。細胞は、内皮細胞であり得る。

【０１６３】

本明細書に記載されるのは、いくつかの態様では、細胞における核酸を編集することを含む、編集方法であり、編集が、内因性因子またはポリメラーゼとの任意の著しい化学的相互作用を伴わずに、ＣＲＩＳＰＲタンパク質（例えば、ＣａｓエンドヌクレアーゼなどのＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ）を使用して行われる。いくつかの実施形態では、編集は、細胞に外因性の因子によってのみ行われる。いくつかの実施形態では、外因性因子は、細胞に付加されるか、または細胞に付加される核酸によってコードされる。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、編集は、ＤＮＡリガーゼを使用して行われる。いくつかの実施形態において、編集は、核酸のヌクレオチドまたはヌクレオチド配列を組み込み核酸と置き換えることを含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドを置き換えることは、核酸のホスホジエステル結合を破壊し、組み込み核酸との新しいホスホジエステル結合を形成することを含む。いくつかの実施形態では、置き換えは、置き換え部位における核酸内に残りのニックまたは鎖切断を残すことなく、核酸内の置き換え部位で行われる。いくつかの実施形態では、編集は、編集された核酸の未編集領域にホスホジエステル結合に隣接する編集された領域を含む編集された核酸を生成する。

【０１６５】

いくつかの態様は、細胞を、本明細書に開示される薬学的組成物などのシステムまたは組成物と接触させることを含む、細胞を修飾するための方法を含む。いくつかの態様では、細胞は、分裂セルではない。組み込み核酸は、内因性非相同末端接合（ＮＨＥＪ）とは

無関係であり、内因性相同指向修復（ＨＤＲ）とは無関係である細胞のゲノム遺伝子座に挿入され得る。

【０１６６】

いくつかの態様では、本明細書に記載されるのは、細胞を本明細書に記載のシステムまたは組成物と接触させることによって細胞内のヌクレオチドまたはヌクレオチド配列を修飾または置き換えるための方法であり、システムまたは組成物は、ゲノム鎖のゲノム遺伝子座の領域に相補的なスペーサー、エンドヌクレアーゼと複合体化するための足場、組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的な任意選択のドナー結合部位、及びゲノム遺伝子座における、またはそれに隣接するゲノムフラップに少なくとも部分的に同一または相補的であるフラップ結合部位を含むガイド核酸を含む。いくつかの実施形態では、ガイド核酸は、ドナー結合部位が、組み込み核酸と複合体化されていることを含む。ガイド核酸と組み込み核酸との間の複合体化は、インビボまたはインビトロで生じ得る。いくつかの実施形態では、フラップ結合部位は、ゲノム鎖を切断するエンドヌクレアーゼによって生成されるゲノムフラップと複合体化され得る。フラップ結合部位とゲノムフラップとの間の複合体化は、組み込み核酸を切断されたゲノム鎖に近接させることができる。ドナー核と切断されたゲノム鎖との間の近接性の低下は、編集効率を高め、オフターゲット効果を低下させるか、またはインデルなどの望ましくない変異の導入を低下させることができる。そのような場合、組み込み核酸は、切断されたゲノム鎖の１つの鎖を置き換えることができ、したがって、切断されたゲノム鎖を編集または修正することができる。図１Ａ～図１Ｃは、ガイド核酸と、本明細書に記載の組み込み核酸との間の複合体化を示し、ガイド核酸と組み込み核酸との間の複合体化は、組み込み核酸を、切断されたゲノム鎖に近接させる。いくつかの実施形態では、組み込み核酸は、ゲノム鎖を切断するエンドヌクレアーゼによって生成されたゲノム鎖の３’末端にライゲーションされる５’末端を含む。いくつかの実施形態では、組み込み核酸は、ゲノム鎖を切断するエンドヌクレアーゼによって生成されたゲノム鎖の５’末端にライゲーションされる３’末端を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載の融合タンパク質であり得る。例えば、エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載のＤＮＡリガーゼと融合することができ、エンドヌクレアーゼ及びＤＮＡリガーゼ融合は、ゲノム鎖を切断し、組み込み核酸を切断されたゲノム鎖に効率的にライゲーションすることができる。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、組み込み核酸は、二本鎖または部分的に二本鎖であり、組み込み核酸は、切断されたゲノム鎖の両方の鎖を置き換えることができる。そのような場合、組み込み核酸は、ドナー結合部位を含むガイド核酸と複合体化される一本鎖ガイド結合部位を含むことができる。ガイド結合部位は、組み込み核酸の５’末端に位置することができる。ガイド結合部位は、組み込み核酸の３’末端に位置することができる。ガイド結合部位は、組み込み核酸の５’末端及び３’末端の両方に位置することができる。図２Ａ～図２Ｃは、組み込み核酸の５’末端及び３’末端の両方にガイド結合部位を含む二本鎖組み込み核酸を示し、組み込み核酸は、切断されたゲノム鎖を編集及び置き換えることができる。

【０１６８】

いくつかの実施形態では、組み込み核酸は、二本鎖または部分的に二本鎖であり、組み込み核酸は、フラップ結合部位及びガイド結合部位を含む。そのような場合、ガイド結合部位は、ガイド核酸のドナー結合部位と複合体化することができる。図３Ａは、（ガイド核酸ではなく）組み込み核酸をゲノムフラップと複合体化して、組み込み核酸を切断されたゲノム鎖に近接させることができるような配置を示す。いくつかの実施形態では、ドナー核酸は、２つの異なるゲノムフラップと複合体化される２つのフラップ結合部位を含む。図４Ａは、（ガイド核酸ではなく）組み込み核酸を２つのゲノムフラップと複合体化して、組み込み核酸を２つの切断されたゲノム鎖に近接させることができるような配置を示す。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、組み込み核酸は、ガイド結合部位を含み、ガイド結合部位は、ガイド核酸のドナー結合部位と複合体化することができる。ガイド核酸は、切断されたゲノム鎖においてゲノムフラップと複合体化されるフラップ結合部位を含み得る。図５Ａに示されるように、ガイド核酸は、切断されたゲノム鎖を編集し、切断されたゲノム鎖を組み込み核酸と置き換えるために、組み込み核酸を切断されたゲノム鎖に近接させる。いくつかの実施形態では、組み込み核酸は、二本鎖であり得、２つの異なるガイド核酸と複合体化される２つのガイド結合部位を含む。図６Ａは、２つのガイド核酸が組み込み核酸を２つの切断されたゲノム鎖に近接させるような配置を示す。

【０１７０】

いくつかの態様では、本明細書に記載されるのは、細胞を本明細書に記載のシステムまたは組成物と接触させることによって細胞内のヌクレオチドまたはヌクレオチド配列を修飾または置き換えるための方法であり、システムまたは組成物は、ゲノム鎖のゲノム遺伝子座の領域に相補的なスペーサーを含むガイド核酸と、エンドヌクレアーゼと複合体化するための足場と、スプリント核酸に少なくとも部分的に相補的な任意選択のドナー結合部位と、を含む。いくつかの実施形態では、システムまたは組成物は、組み込み核酸を含み、組み込み核酸は、切断されたまたはニックされたゲノム鎖にライゲーションされ得る。いくつかの実施形態では、組み込み核酸は、エンドヌクレアーゼによって生成されたゲノム鎖の３’末端にライゲーションされる５’末端を含む。いくつかの実施形態では、組み込み核酸は、エンドヌクレアーゼによって生成されたゲノム鎖の５’末端にライゲーションされる３’末端を含む。いくつかの実施形態では、システムまたは組成物は、ゲノム遺伝子座における、またはそれに隣接するゲノムフラップと少なくとも部分的に同一または相補的であるフラップ結合部位を含み、かつガイド核酸と少なくとも部分的に相補的な任意選択のガイド結合部位を含むスプリント核酸を含む。いくつかの実施形態では、スプリント核酸は、ガイド結合部位を含み得る。ガイド結合部位は、ガイド核酸に相補的であり得る。ガイド結合部位は、ガイド核酸に部分的に相補的であり得る。スプリント核酸は、ドナー結合部位を含み得る。ドナー結合部位は、組み込み核酸に相補的であり得る。ドナー結合部位は、組み込み核酸に部分的に相補的であり得る。スプリント鎖は、ＤＮＡであり得るか、またはＤＮＡを含み得る。スプリント鎖は、ＲＮＡであり得るか、またはＲＮＡを含み得る。スプリント核酸は、組み込み核酸の一部として含まれ得る。スプリント核酸は、二本鎖組み込み核酸の鎖として含まれ得る。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、組み込み核酸と切断部位またはニック部位との間の近接性を減少させる。いくつかの実施形態では、組み込み核酸と切断部位またはニック部位との間の減少した近接性は、本明細書に記載の組成物またはリプレーサーを使用しない遺伝子編集速度と比較して、遺伝子編集速度を少なくとも０．１倍、０．２倍、０．５倍、１．０倍、２．０倍、５．０倍、１０．０倍、またはそれ以上増加させる。いくつかの実施形態では、組み込み核酸と切断部位またはニック部位との間の減少した近接性は、本明細書に記載の組成物またはリプレーサーを使用しない不要な変異の導入と比較して、インデルなどの不要な変異の導入を少なくとも０．１倍、０．２倍、０．５倍、１．０倍、２．０倍、５．０倍、１０．０倍、またはそれ以上減少させる。いくつかの実施形態では、組み込み核酸と切断部位またはニック部位との間の減少した近接性は、本明細書に記載の組成物またはリプレーサーを使用しないオフターゲット編集と比較して、オフターゲット編集を少なくとも０．１倍、０．２倍、０．５倍、１．０倍、２．０倍、５．０倍、１０．０倍、またはそれ以上減少させる。

【０１７２】

いくつかの態様では、方法は、遺伝子を編集する。いくつかの態様では、方法は、遺伝子を置き換える。いくつかの態様では、方法は、遺伝子を除去する。いくつかの態様では、方法は、メチル化ヌクレオチドを標的核酸に導入する。いくつかの態様では、方法は、非メチル化ヌクレオチドを標的核酸に導入する。

【０１７３】

方法は、植物細胞内の核酸を編集するために使用され得る。いくつかの態様は、植物を増強することを含む。植物増強のいくつかの例には、疾患感受性遺伝子の編集または除草剤耐性遺伝子の導入が含まれ得る。疾患感受性遺伝子の例には、米における細菌葉縞疾患感受性遺伝子ＯｓＳＵＬＴＲ３；６が含まれ得る。除草剤耐性遺伝子を導入する例は、除草剤耐性のためにジャガイモ中のアセト乳酸合成酵素を編集することを含み得る。

【０１７４】

治療

遺伝子編集方法などの方法は、疾患または障害の治療に有用であり得る。疾患または障害は、遺伝的であり得る。治療は、罹患した細胞または損傷した細胞のものであり得る。疾患は、遺伝的疾患、がん、または感染症を含み得る。治療は、それを必要とする対象に本明細書に開示される組成物の投与を含み得る。必要とする対象は、疾患または障害を有すると特定された対象を含み得る。

【０１７５】

本明細書に記載される方法は、遺伝的疾患を治療するために有用であり得る。遺伝的疾患は、通常の非疾患ＤＮＡと比較して、点変異、欠失、挿入、重複、または反復などのＤＮＡ変異によって引き起こされ得る。治療は、変異を修正し得る。遺伝的疾患のいくつかの例としては、アンジェルマン症候群、カナヴァン病、シャルコー・マリー・トゥース病、色盲、クリ・デュ・チャット症候群、嚢胞性線維症、ディジョルジュ症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、家族性高コレステロール血症、１型血色素症、血友病、神経線維腫症、フェニルケトン尿症、多嚢胞性腎疾患、プラダー・ウィリー症候群、鎌状赤血球症、脊髄性筋萎縮症、またはテイ・サックス病が挙げられる。本明細書の方法を使用して治療され得る疾患のいくつかの例としては、鎌状赤血球症、βサラセミア、家族性高コレステロール血症（例えば、ＰＣＳＫ９破壊）、α　Ｉ抗トリプシン欠損症、フェニルケトン尿症、嚢胞性線維症、チロシン血症、アルギナーゼＩ欠損症、ウィルソン病、反復増殖性障害、血友病（例えば、肝細胞のＡＬＢにおける第ＩＸ因子の挿入）、デュシェンヌ型筋ジストロフィーが挙げられる。ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症／前頭側頭型認知症、フリードライヒ運動失調症、脆性Ｘ症候群などのリピート伸長病のいくつかの例。この方法は、Ｔ細胞工学またはがん治療などの免疫腫瘍学に含まれてもよい。

【０１７６】

ゆっくりと分裂する細胞及び分裂しない細胞の効率的かつ正確な編集が治療的遺伝子療法に有益な遺伝的疾患の２つの非限定的な例は、鎌状赤血球貧血（ＳＣＡ）及びα－１抗トリプシン欠乏症（ＡＡＴＤ）である。鎌状赤血球貧血は、変異体β－グロビンタンパク質の凝集及び赤血球の「鎌状化」をもたらすＨＢＢ遺伝子のＥ６Ｖミスセンス変異によって引き起こされる。修正されたＨＢＢ対立遺伝子を有する造血幹細胞を使用する自己遺伝子療法は、ＳＣＡの治癒治療として提案されている。エクスビボＨＳＣ培養物の拡張は、サイトカインカクテルを使用して誘導することができるが、ヒト体内のＨＳＣは、典型的には、骨髄内のニッチに存在し、それらは、静止状態またはゆっくりと分裂する状態で存在する。ＡＡＴＤは、最も一般的に、肝細胞によって分泌されるセリンプロテアーゼ阻害剤であるα－１抗トリプシンをコードするＳＥＲＰＩＮＡ１遺伝子におけるＥ３６６Ｋミスセンス変異によって引き起こされる。変異体ＡＡＴは、ミスフォールドされ、分泌されるのではなく、肝細胞の小胞体に凝集体を形成し、最終的に肝疾患を引き起こす。肝細胞は、肝臓損傷に応答して急速に増殖する能力を有するが、それらのライフサイクルは、典型的には、静止状態で経過する。したがって、これら２つの障害の高効率インビボ編集は、分裂しないか、またはゆっくりと分裂する細胞において正確な編集を効果的に行うことができる新規の遺伝子治療プラットフォームを必要とする。

【０１７７】

いくつかの態様は、それを必要とする対象において疾患または状態を治療するための方法を含み、（ａ）対象の細胞を、本明細書に開示される薬学的組成物などのシステムまたは組成物と接触させることと、（ｂ）細胞中のゲノム遺伝子座を組み込み核酸で置き換え、それによって対象における疾患または状態を治療することと、を含む。いくつかの態様

では、細胞は、分裂細胞ではない。いくつかの態様では、組み込み核酸は、内因性非相同末端結合（ＮＨＥＪ）とは無関係であり、内因性相同指向性修復（ＨＤＲ）とは無関係である細胞のゲノム遺伝子座に挿入される。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、組み込み核酸と切断部位またはニック部位との間の近接性を減少させ、組み込み核酸と切断部位またはニック部位との間の減少した近接性は、本明細書に記載の組成物またはリプレーサーを使用しない遺伝子編集速度と比較して、遺伝子編集速度を少なくとも０．１倍、０．２倍、０．５倍、１．０倍、２．０倍、５．０倍、１０．０倍、またはそれ以上増加させる。いくつかの実施形態では、組み込み核酸と切断部位またはニック部位との間の減少した近接性は、本明細書に記載の組成物またはリプレーサーを使用しない治療有効性と比較して、治療有効性を（遺伝子編集速度を増加させることによって）少なくとも０．１倍、０．２倍、０．５倍、１．０倍、２．０倍、５．０倍、１０．０倍、またはそれ以上増加させる。

【０１７９】

送達

本明細書に記載されるのは、いくつかの態様では、本明細書に記載されるシステムを細胞に送達する方法である。いくつかの態様では、方法は、システムの少なくとも１つの構成要素を細胞に直接的または間接的に送達することを含む。いくつかの態様では、方法は、少なくとも１つの異種ポリヌクレオチドを有する細胞を送達することを含み、細胞は、次いで、システムの少なくとも１つの構成要素を発現することができる。いくつかの態様では、少なくとも１つの異種ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるトランスフェクション方法のうちのいずれかを介して細胞に送達され得る。いくつかの態様では、少なくとも１つの異種ポリヌクレオチドは、ウイルスベクターなどの発現ベクターの使用を介して細胞に送達され得る。発現ベクターの文脈において、ベクターは、当該技術分野における任意の方法によって、本明細書に記載の細胞に容易に導入され得る。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的、または生物学的手段によって細胞に移入され得る。

【０１８０】

細胞にオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドをコードするベクターを導入するための物理的方法としては、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝突、マイクロインジェクション、遺伝子銃、エレクトロポレーションなどが挙げられる。ベクター及び／または外因性核酸を含む細胞を生成するための方法は、本明細書の方法に好適である。オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドをコードするベクターを宿主細胞に導入するための１つの方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションである。

【０１８１】

オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドをコードするベクターを細胞に導入するための化学的手段には、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフィア、ビーズ、及び脂質ベースのシステム（水中油乳剤、ミセル、混合ミセル、球状核酸（ＳＮＡ）、リポソーム、または脂質ナノ粒子を含む）などのコロイド分散系が含まれ得る。インビトロ及びインビボで送達ビヒクルとして使用するための例示的なコロイド系は、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。標的化ナノ粒子または他の好適なサブミクロンサイズの送達システムを有するオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドをコードするベクターの送達などの、核酸の最先端の標的化送達の他の方法が利用可能である。

【０１８２】

非ウイルス送達システムが利用される場合では、例示的な送達ビヒクルは、リポソームである。脂質製剤の使用は、（インビトロ、エクスビボ、またはインビボでの）細胞へのオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドをコードするベクターの導入のために企図される。別の態様では、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドをコードするベクターは、脂質と関連し得る。脂質に関連するオリゴヌクレオチドをコードするオリゴヌクレオチドまたはベクターは、いくつかの態様では、リポソームの水性内部に封入され、リポソームの脂質二重層内に分散され、リポソーム及びオリゴヌクレオチドの両方に関連す

る連結分子を介してリポソームに付着され、リポソームに捕捉され、リポソームと複合体化され、脂質を含有する溶液中に分散され、脂質と混合され、脂質と組み合わされ、脂質中に懸濁液として含有され、ミセルに含有されるか、もしくはそれと複合体化され、または他の方法で脂質と会合する。脂質、脂質／ＤＮＡ、または脂質／発現ベクター関連組成物は、溶液中で任意の特定の構造に限定されない。例えば、いくつかの態様では、それらは、ミセルとして二層構造に存在するか、または「崩壊」構造を有する。代替として、これらは溶液中に単純に分散されてもよく、サイズまたは形状が均一ではない凝集体を形成する可能性がある。脂質は、いくつかの態様では、天然に存在する脂質または合成脂質である、脂肪物質である。例えば、脂質としては、細胞質内で天然に存在する脂肪滴、ならびに長鎖脂肪族炭化水素及びそれらの誘導体、例えば、脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、及びアルデヒドを含む化合物のクラスが挙げられる。

【０１８３】

使用に好適な脂質は、商業的供給源から入手される。クロロホルムまたはクロロホルム／メタノール中の脂質のストック溶液は、多くの場合、約－２０℃で貯蔵される。クロロホルムは、メタノールよりも容易に蒸発するため、唯一の溶媒として使用される。「リポソーム」は、封入された脂質二重層または凝集体の生成によって形成された様々な単層及び多層脂質ビヒクルを包含する一般的な用語である。リポソームは、リン脂質二重層膜及び内部水性媒体を有する小胞構造を有するとしてしばしば特徴付けられる。多層状リポソームは、水性媒体によって分離された複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰な水溶液に懸濁されるときに自発的に形成される。脂質成分は、閉じた構造を形成する前に自己再構成され、水及び溶解した溶質を脂質二重層の間に閉じ込める。しかしながら、通常の小胞構造とは異なる構造を有する組成物も包含される。例えば、脂質は、いくつかの態様では、ミセル構造を想定するか、または単に脂質分子の不均一な凝集体として存在する。また、リポフェクタミン－核酸複合体も企図される。

【０１８４】

場合によっては、非ウイルス送達方法は、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティック、ビロソーム、リポソーム、免疫リポソーム、エクソソーム、ポリカチオンまたは脂質：カーゴコンジュゲート（または凝集体）、裸のポリペプチド（例えば、組換えポリペプチド）、裸のＤＮＡ、人工ビリオン、及びポリペプチドまたはＤＮＡの薬剤強化された取り込みを含む。いくつかの態様では、送達方法は、本明細書に記載の組成物またはオリゴヌクレオチドを、天然ポリマーまたは合成材料などの少なくとも１つのポリマーとコンジュゲートまたは封入することを含む。ポリマーは、生体適合性または生分解性であり得る。好適な生体適合性の生体分解性合成ポリマーの非限定的な例としては、脂肪族ポリエステル、ポリ（アミノ酸）、コポリ（エーテル－エステル）、ポリアルキレンオキサレート、ポリアミド、ポリ（イミノカーボネート）、ポリオルトエステル、ポリオキサエステル、ポリアミドエステル、アミン基を含有するポリオキサエステル、及びポリ（無水物）が挙げられる。そのような合成ポリマーは、複数の異なるモノマー、例えば、乳酸、ラクチド、グリコール酸、グリコリド、ε－カプロラクトン、炭酸トリメチレン、ｐ－ジオキサノン等のうちの２つ以上のホモポリマーまたはコポリマー（例えば、ランダム、ブロック、セグメント化、グラフト）であり得る。一例では、足場は、グリコール酸及び乳酸を含むポリマー、例えば、９０／１０または５／９５のグリコール酸対乳酸の比を有するポリマーで構成され得る。天然に存在する生体適合性、生分解性ポリマーの非限定的な例としては、糖タンパク質、プロテオグリカン、多糖、グリコサミノグリカン（ＧＡＧ）、及びこれらの構成要素に由来する断片（複数可）、エラスチン、ラミニン、デクロリン、フィブリノーゲン／フィブリン、フィブロネクチン、オステオポンチン、テナシン、ヒアルロン酸、コラーゲン、硫酸コンドロイチン、ヘパリン、硫酸ヘパラン、ＯＲＣ、カルボキシメチルセルロース、及びキチンが挙げられる。

【０１８５】

場合によっては、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドをコードするオリゴヌクレオチ

ドまたはベクターをパッケージ化し、細胞外小胞を介して細胞に送達することができる。細胞外小胞は、任意の膜結合粒子であり得る。いくつかの態様では、細胞外小胞は、少なくとも１つの細胞によって分泌される任意の膜結合粒子であり得る。いくつかの例では、細胞外小胞は、インビトロで合成された任意の膜結合粒子であり得る。いくつかの例では、細胞外小胞は、細胞なしで合成された任意の膜結合粒子であり得る。場合によっては、細胞外小胞は、エクソソーム、マイクロベシクル、レトロウイルス様粒子、アポトーシス体、アポトソーム、オンコソーム、エクソファー、エンベロープウイルス、エクソマー、または他の非常に大きな細胞外小胞であり得る。

【０１８６】

態様では、本明細書に記載のシステムまたは本明細書に記載のシステムをコードする少なくとも１つの異種ポリヌクレオチドは、ウイルスベクターなどのベクターとして細胞内に送達され得る。ウイルスベクター、及び特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えば、ヒト細胞に遺伝子を挿入するための最も広く使用される方法となっている。いくつかの実施形態では、他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスＩ、アデノウイルス及びアデノ関連ウイルスなどに由来する。例示的なウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター（ＡＡＶ）、ｐｏｘベクター、パルボウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、麻疹ウイルスベクター、または単純ヘルペスウイルスベクター（ＨＳＶ）が挙げられる。いくつかの例では、レトロウイルスベクターとしては、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭｏＭＬＶ、ＭＭＬＶ、ＭｕＬＶ、もしくはＭＬＶ）またはマウス幹細胞ウイルス（ＭＳＣＶ）ゲノムに由来するベクターなどのγ－レトロウイルスベクターが挙げられる。いくつかの例では、レトロウイルスベクターはまた、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）ゲノムに由来するものなどのレンチウイルスベクターを含む。いくつかの例では、ＡＡＶベクターとしては、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、またはＡＡＶ９血清型が挙げられる。いくつかの例では、ウイルスベクターは、２つ以上のウイルス由来のウイルス部分を含む、キメラウイルスベクターである。更なる例では、ウイルスベクターは、組換えウイルスベクターである。

【０１８７】

場合によっては、本明細書に記載のシステムをコードする少なくとも１つの異種ポリヌクレオチドは、少なくとも１つの異種ポリヌクレオチドを最初に同種または自己細胞に導入することによって生成されたトランスジェニック細胞の使用を介して、それを必要とする対象に投与することができる。場合によっては、細胞は、単離され得る。いくつかの態様では、細胞は、対象から単離され得る。

【０１８８】

対象及び細胞

本明細書に記載される方法は、細胞を伴い得る。例えば、組成物は、細胞内の核酸を編集するために細胞に送達され得る。細胞に送達される態様は、細胞とは異種であり得る。「異種」は、その自然状態で細胞内に存在しないものを含み得る。

【０１８９】

任意の細胞または細胞タイプが使用され得る。細胞または細胞タイプの例としては、幹細胞、赤血球、白血球、血小板、神経細胞、神経グリア細胞、筋細胞、軟骨細胞、骨細胞、皮膚細胞、内皮細胞、上皮細胞、脂肪細胞、または性細胞が挙げられ得る。細胞は、幹細胞を含み得る。細胞は、骨細胞を含み得る。細胞は、血液細胞を含み得る。細胞は、精子細胞を含み得る。細胞は、卵細胞を含み得る。細胞は、脂肪細胞を含み得る。細胞は、神経細胞を含み得る。細胞は、筋肉細胞を含み得る。細胞は、内分泌細胞を含み得る。細胞は、内皮細胞を含み得る。細胞は、膵臓細胞を含み得る。

【０１９０】

細胞は、真核性であり得る。細胞は、植物細胞であり得る。細胞は、動物細胞であり得る。細胞は、原生動物であり得る。細胞は、真菌細胞であり得る。細胞は、原核性であり得る。細胞は、細菌細胞であり得る。細胞は、古細菌細胞であり得る。細胞は、細胞株由

来であり得る。細胞は、対象の一部であり得る。細胞は、対象から分離され得る。細胞は、対象の自己細胞であり得る。細胞は、対象の同種異系細胞であり得る。

【０１９１】

細胞は、罹患した細胞を含み得る。細胞は、がん細胞を含み得る。細胞は、感染している可能性がある。細胞は、損傷している可能性がある。細胞は、真菌病原体などの病原体であり得る。

【０１９２】

本明細書に記載される方法は、対象を伴い得る。例えば、組成物は、対象に送達され得る。本明細書に記載される方法のいくつかの態様は、対象の治療を含む。対象の非限定的な例としては、脊椎動物、動物、哺乳類、イヌ、ネコ、ウシ、げっ歯類、マウス、ラット、霊長類、サル、及びヒトが挙げられる。対象は、無脊椎動物であり得る。対象は、節足動物であり得る。対象は、脊椎動物であり得る。対象は、動物であり得る。対象は、魚であり得る。対象は、爬虫類であり得る。対象は、哺乳動物であり得る。対象は、イヌであり得る。対象は、ネコであり得る。対象は、ウシであり得る。対象は、げっ歯類であり得る。対象は、マウスであり得る。対象は、ラットであり得る。対象は、霊長類であり得る。対象は、非ヒト霊長類であり得る。対象は、サルであり得る。対象は、動物、哺乳類、イヌ、ネコ、ウシ、げっ歯類、マウス、ラット、霊長類、またはサルであり得る。対象は、ヒトであり得る。

【０１９３】

対象は、非動物対象であり得る。例えば、対象は、植物を含み得る。植物の例には、木、花、低木、または草が含まれ得る。対象は、作物を含み得る。作物の例としては、アーモンド、アプリコット、リンゴ、アーティチョーク、バナナ、大麦、ビート、ブラックベリー、ブルーベリー、ブロッコリー、ブリュッセルスプラウト、キャベツ、大麻、トウガラシ、ニンジン、セロリ、チャード、チェリー、柑橘類、トウモロコシ、ウリ科、デーツ、イチジク、ニンニク、ブドウ、ハーブ、スパイス、ケール、レタス、オイルパーム、オリーブ、タマネギ、エンドウ豆、ナシ、モモ、ピーナッツ、パパイヤ、パースニップ、ピーカン、柿、プラム、ザクロ、ジャガイモ、マルメロ、ラディッシュ、ラズベリー、バラ、米、スロー、ソルガム、ダイズ、ほうれん草、イチゴ、サツマイモ、タバコ、トマト、カブ野菜、クルミ、または小麦を挙げることができる。

【０１９４】

定義

絶対的または連続的な用語、例えば、「するであろう（ｗｉｌｌ）」、「しないであろう（ｗｉｌｌ　ｎｏｔ）」、「すべきである（ｓｈａｌｌ）」、「すべきでない（ｓｈａｌｌ　ｎｏｔ）」、「しなければならない（ｍｕｓｔ）」、「してはならない（ｍｕｓｔ　ｎｏｔ）」、「最初の（ｆｉｒｓｔ）」、「最初に（ｉｎｉｔｉａｌｌｙ）」、「次の（ｎｅｘｔ）」、「その後に（ｓｕｂｓｅｑｕｅｎｔｌｙ）」、「前（ｂｅｆｏｒｅ）」、「後（ａｆｔｅｒ）」、「最後に（ｌａｓｔｌｙ）」、及び「最後に（ｆｉｎａｌｌｙ）」の使用は、本明細書に開示される本実施形態の範囲を限定することを意図するものではなく、例示的なものである。

【０１９５】

本明細書で使用されるように、単数形の「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」は、文脈が別段に明確に示さない限り、複数形も含むことが意図されている。更に、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」、「有する（ｈａｓ）」、「有する（ｗｉｔｈ）」、またはそれらの変形が詳細な説明及び／または特許請求の範囲のいずれかにおいて使用される限り、そのような用語は、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語と同様に、包括的であることが意図されている。

【０１９６】

本明細書で使用される場合、「少なくとも１つの」、「１つ以上の」、及び「及び／または」という句は、動作において連結的及び選言的の両方であるオープンエンド表現である。例えば、「Ａ、Ｂ、及びＣのうちの少なくとも１つ」、「Ａ、Ｂ、またはＣのうちの

少なくとも１つ」、「Ａ、Ｂ、及びＣのうちの１つ以上」、「Ａ、Ｂ、またはＣのうちの１つ以上」、ならびに「Ａ、Ｂ、及び／またはＣ」という表現の各々は、Ａ単独、Ｂ単独、Ｃ単独、Ａ及びＢを一緒に、Ａ及びＣを一緒に、Ｂ及びＣを一緒に、またはＡ、Ｂ及びＣを一緒にを意味する。

【０１９７】

本明細書で使用される場合、「または」は、「及び」、「または」、または「及び／または」を指してもよく、排他的にも包含的にも使用され得る。例えば、「ＡまたはＢ」という用語は、「ＡまたはＢ」、「Ａであるが、Ｂではない」、「Ｂであるが、Ａではない」、及び「Ａ及びＢ」を指し得る。場合によっては、文脈は、特定の意味を指示し得る。

【０１９８】

本明細書に記載される任意のシステム、方法、ソフトウェア、及びプラットフォームは、モジュラーである。したがって、「第１の」及び「第２の」などの用語は、必ずしも優先順位、重要性の順序、または行為の順序を意味するわけではない。

【０１９９】

数値または数値範囲に言及する場合、「約」という用語は、言及される数値または数値範囲が、実験的変動内（もしくは統計的実験誤差内）の近似値であり、数値または数値範囲が、例えば、記載された数値または数値範囲の１％から１５％まで変化し得ることを意味する。例では、「約」という用語は、記載された数または値の±１０％を指す。

【０２００】

「増加した（ｉｎｃｒｅａｓｅｄ）」、「増加すること（ｉｎｃｒｅａｓｉｎｇ）」、または「増加する（ｉｎｃｒｅａｓｅ）」という用語は、概して、統計学的に有意な量の増加を意味するように本明細書で使用される。いくつかの態様では、「増加した（ｉｎｃｒｅａｓｅｄ）」または「増加する（ｉｎｃｒｅａｓｅ）」という用語は、参照レベルと比較して少なくとも１０％の増加、例えば、参照レベル、標準、または対照と比較して少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、または少なくとも約３０％、または少なくとも約４０％、または少なくとも約５０％、または少なくとも約６０％、または少なくとも約７０％、または少なくとも約８０％、または少なくとも約９０％、または１００％の増加、または１０～１００％の間の任意の増加を含む増加を意味する。「増加（ｉｎｃｒｅａｓｅ）」の他の例としては、参照レベルと比較して、少なくとも２倍、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも５０倍、少なくとも１００倍、少なくとも１０００培、またはそれ以上の増加が挙げられる。

【０２０１】

「減少した（ｄｅｃｒｅａｓｅｄ）」、「減少すること（ｄｅｃｒｅａｓｉｎｇ）」、または「減少する（ｄｅｃｒｅａｓｅ）」という用語は、概して、統計的に有意な量による減少を意味するために、本明細書で使用される。いくつかの態様では、「減少した（ｄｅｃｒｅａｓｅｄ）」または「減少する（ｄｅｃｒｅａｓｅ）」とは、参照レベルと比較して少なくとも１０％の低減、例えば、参照レベルと比較して少なくとも約２０％、または少なくとも約３０％、または少なくとも約４０％、または少なくとも約５０％、または少なくとも約６０％、または少なくとも約７０％、または少なくとも約８０％、または少なくとも約９０％、または最大で１００％の減少（例えば、参照レベルと比較して欠如レベルもしくは検出不可能レベル）、または参照レベルと比較して１０～１００％の間の任意の減少を意味する。マーカーまたは症状の関連において、これらの用語は、そのようなレベルの統計的に有意な減少を意味する。減少は、例えば、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、またはそれ以上であり得、好ましくは、所与の疾患を有しない個体について正常の範囲内で許容されるレベルまで低下する。

【０２０２】

配列が提供される場合、ヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を含有する核酸は、アスタリスク（＊）で表される。２’－Ｏ－メチルヌクレオチドは、ヌクレオチドの前に小文字「ｍ」で表される（例えば、Ｃの代わりにｍＣ）。ヌクレオチド配列の前のコード「／５Ｐｈｏｓ／」は、配列が５’末端でリン酸化されていることを示す。２’酸素と４’

炭素とを接続するメチレン架橋を含むロックド核酸（ＬＮＡ）ヌクレオチドは、ヌクレオチドの前に「＋」で示される（例えば、Ｃの代わりに＋Ｃ）。

【０２０３】

実施形態

いくつかの態様は、以下に提供される実施形態またはその構成要素を含む。

【０２０４】

実施形態１．本明細書に記載されるのは、いくつかの態様では、ＤＮＡリガーゼにカップリングされたＤＮＡ結合タンパク質を含む、組成物である。

【０２０５】

実施形態２．前記カップリングが、共有結合である、実施形態１に記載の組成物。

【０２０６】

実施形態３．前記ＤＮＡ結合タンパク質及び前記ＤＮＡリガーゼを含む融合タンパク質を含む、実施形態２に記載の組成物。

【０２０７】

実施形態４．前記ＤＮＡ結合タンパク質が、前記融合タンパク質内の前記ＤＮＡリガーゼに対してアミノ（Ｎ）末端である、実施形態３に記載の組成物。

【０２０８】

実施形態５．前記ＤＮＡ結合タンパク質が、前記融合タンパク質内の前記ＤＮＡリガーゼに対してカルボキシ（Ｃ）末端である、実施形態３に記載の組成物。

【０２０９】

実施形態６．接続が、１～１００個のアミノ酸を含むリンカーを含む、実施形態２～５のいずれか１つに記載の組成物。

【０２１０】

実施形態７．前記カップリングが、非共有結合である、実施形態１に記載の組成物。

【０２１１】

実施形態８．前記組成物が、前記ＤＮＡ結合タンパク質の少なくとも一部を含む第１のポリペプチドと、前記ＤＮＡリガーゼの少なくとも一部を含む第２のポリペプチドと、を含み、前記第１及び前記第２のポリペプチドが、非共有結合的にカップリングされている、実施形態７に記載の組成物。

【０２１２】

実施形態９．前記第１のポリペプチドが、第２のヘテロ二量体化ドメインに結合する第１のヘテロ二量体化ドメインを含み、前記第２のポリペプチドが、前記第２のヘテロ二量体化ドメインを含む、実施形態８に記載の組成物。

【０２１３】

実施形態１０．前記ヘテロ二量体ドメインが、ロイシンジッパー、ＰＤＺドメイン、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン結合タンパク質、フォールドンドメイン、疎水性部分、またはその機能的結合断片を含む、実施形態９に記載の組成物。

【０２１４】

実施形態１１．前記第１のポリペプチドが、第２のインテインに結合する第１のインテインを含み、前記第２のポリペプチドが、前記第２のインテインを含む、実施形態８に記載の組成物。

【０２１５】

実施形態１２．前記リガーゼが、ヘアピン結合モチーフを含み、前記ＤＮＡ結合タンパク質及び前記ＤＮＡリガーゼが、前記ＤＮＡ結合タンパク質に結合する足場及びヘアピン結合モチーフに結合するヘアピンを含む核酸とカップリングされている、実施形態１に記載の組成物。

【０２１６】

実施形態１３．前記ヘアピン結合モチーフが、ＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）ペプチドを含み、前記ヘアピンが、ＭＳ２ヘアピンを含む、実施形態１２に記載の組成物。

【０２１７】

実施形態１４．前記ＤＮＡ結合タンパク質及び前記ＤＮＡリガーゼが、エンドヌクレアーゼ結合ドメイン及びＤＮＡリガーゼ結合ドメインを含むヘテロ二官能性分子とカップリングされている、実施形態１に記載の組成物。

【０２１８】

実施形態１５．前記ヘテロ二官能性分子が、小分子を含む、実施形態１４に記載の組成物。

【０２１９】

実施形態１６．本明細書に記載されるのは、いくつかの態様では、ＤＮＡ結合タンパク質及びＤＮＡリガーゼを含有する細胞を含む組成物であり、これらは両方とも、細胞とは異種である。

【０２２０】

実施形態１７．前記ＤＮＡ結合タンパク質が、クラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼを含む、実施形態１～１６のいずれか１つに記載の組成物。

【０２２１】

実施形態１８．前記ＤＮＡ結合タンパク質が、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを含む、実施形態１～１７のいずれか１つに記載の組成物。

【０２２２】

実施形態１９．前記ＤＮＡ結合タンパク質が、ニッカーゼを含む、実施形態１～１８のいずれか１つに記載の組成物。

【０２２３】

実施形態２０．前記ＤＮＡ結合タンパク質が、配列番号１～１３のうちのいずれか１つのアミノ酸配列と少なくとも８０％同一のアミノ酸配列、またはその機能的断片を含む、実施形態１～１９のいずれか１つに記載の組成物。

【０２２４】

実施形態２１．前記ＤＮＡリガーゼが、ＤＮＡスプリントに対合したＤＮＡ鎖塩基をライゲーションする、実施形態１～２０のいずれか１つに記載の組成物。

【０２２５】

実施形態２２．前記ＤＮＡリガーゼが、ＲＮＡスプリントに対合したＤＮＡ鎖塩基をライゲーションする、実施形態１～２０のいずれか１つに記載の組成物。

【０２２６】

実施形態２３．前記ＤＮＡリガーゼが、配列番号５５～９６のうちのいずれか１つのアミノ酸配列と少なくとも８０％同一のアミノ酸配列、またはその機能的断片を含む、実施形態１～２２のいずれか１つに記載の組成物。

【０２２７】

実施形態２４．前記ＤＮＡ結合タンパク質または前記ＤＮＡリガーゼが、核局在化シグナル、クロマチン修飾ドメイン、細胞透過性ペプチド、またはタグポリペプチドを含む、実施形態１～２３のいずれか１つに記載の組成物。

【０２２８】

実施形態２５．ガイドＲＮＡ及び組み込み核酸を更に含む、実施形態１～２４のいずれか１つに記載の組成物。

【０２２９】

実施形態２６．実施形態１～２５のいずれか１つに記載の組成物をコードする、１つ以上の核酸。

【０２３０】

実施形態２７．実施形態１～２５のいずれか１つに記載の組成物を含むか、または実施形態２６の１つ以上の核酸を含む、細胞。

【０２３１】

実施形態２８．核酸のシステムであって、

ａ．ガイド核酸であって、

ｉ．ゲノム鎖のゲノム遺伝子座の領域に相補的なスペーサー、

ｉｉ．ＤＮＡ結合タンパク質と複合体化するための足場、
ｉｉｉ．組み込み核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択のドナー結合部位、及び
ｉｖ．前記ゲノム遺伝子座における、または前記ゲノム遺伝子座に隣接するゲノムフラップと少なくとも部分的に同一または相補的であるフラップ結合部位を含む、前記ガイド核酸と、
ｂ．ＤＮＡ結合タンパク質によって生成された前記ゲノム鎖の３’末端にライゲーションされる５’末端を含む、組み込み核酸と、を含む、前記核酸のシステム。

【０２３２】

実施形態２９．核酸のシステムであって、
ａ．ガイド核酸であって、
ｉ．ゲノム鎖のゲノム遺伝子座の領域に相補的なスペーサー、
ｉｉ．ＤＮＡ結合タンパク質と複合体化するための足場、及び
ｉｉｉ．スプリント核酸に少なくとも部分的に相補的である任意選択のドナー結合部位を含む、前記ガイド核酸と、
ｂ．ＤＮＡ結合タンパク質によって生成された前記ゲノム鎖の３’末端にライゲーションされる５’末端を含む、組み込み核酸と、
ｃ．前記ゲノム遺伝子座における、または前記ゲノム遺伝子座に隣接するゲノムフラップと少なくとも部分的に同一または相補的であるフラップ結合部位を含み、かつガイド核酸と少なくとも部分的に相補的である任意選択のガイド結合部位を含むフラップ結合部位を含むスプリント核酸と、を含む、前記核酸のシステム。

【０２３３】

実施形態３０．前記ゲノム鎖が、細胞内にある、実施形態２８または２９に記載のシステム。

【０２３４】

実施形態３１．前記スプリント核酸が、前記組み込み核酸の一部と少なくとも部分的に同一または相補的であるドナー結合部位を更に含む、実施形態２８～３０のいずれか１つに記載のシステム。

【０２３５】

実施形態３２．前記ガイド核酸が、前記足場と前記ドナー結合部位との間の連結核酸の配列を含む、実施形態２８～３１のいずれか１つに記載のシステム。

【０２３６】

実施形態３３．前記ガイド核酸、前記組み込み核酸、または前記スプリント核酸が、修飾ヌクレオシド間結合を含む、実施形態２８～３２のいずれか１つに記載のシステム。

【０２３７】

実施形態３４．前記修飾ヌクレオシド間結合が、ホスホロチオエート結合を含む、実施形態３３に記載のシステム。

【０２３８】

実施形態３５．前記修飾ヌクレオシド間結合が、前記ガイド核酸または前記組み込み核酸の５’末端または３’末端における４つの末端ヌクレオシドのうちのいずれかの間である、実施形態３３または３４に記載のシステム。

【０２３９】

実施形態３６．前記ガイド核酸、前記組み込み核酸、または前記スプリント核酸が、修飾ヌクレオシドを含む、実施形態２８～３５のいずれか１つに記載のシステム。

【０２４０】

実施形態３７．前記修飾ヌクレオシドが、ロックド核酸（ＬＮＡ）、２’フルオロ、２’Ｏ－アルキル、またはそれらの組み合わせを含む、実施形態３６に記載のシステム。

【０２４１】

実施形態３８．前記修飾ヌクレオシドが、前記ガイド核酸または前記組み込み核酸の５’末端または３’末端における３つの末端ヌクレオシドのうちのいずれかである、実施形態

３６または３７に記載のシステム。

【実施例】

【０２４２】

実施例１．リプレーサー１によってＢＦＰからＧＦＰに変換するための編集

ＨＥＫ２９３細胞に安定的に組み込まれた青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）遺伝子を編集するために使用される構成要素は、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）トランスフェクションによって同時送達される。構成要素には、化学的に合成されたガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、一本鎖ＤＮＡドナー、及びニッキングＣａｓ９（ｎＣａｓ９）、ＳｐｌｉｎｔＲリガーゼ及び核局在化配列（ＮＬＳ）を含むリプレーサー１編集用のｍＲＮＡコードタンパク質エフェクターが含まれる。ｇＲＮＡはＡｇｉｌｅｎｔによって合成され、ＤＮＡドナーはＩＤＴによって合成され、ｍＲＮＡは、ＴｒｉＬｉｎｋまたはＲｉｂｏＰｒｏによって合成される。ｇＲＮＡ、ＤＮＡドナー、及びｍＲＮＡを混合し、９６ウェルプレートで接着細胞に送達する前に、脂質ナノ粒子に配合される。４８時間後、細胞をトリプシン化によってプレートから分離し、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）蛍光をＡｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーターを使用して測定して、ＢＦＰ－ＧＦＰ編集に対するパーセンテージを評価する。リプレーサー１編集フォーマットに続いて、ｇＲＮＡは、スペーサー、足場、ドナー結合部位（ＤＢＳ）、及びフラップ結合部位（ＦＢＳ）を含有する。ｇＲＮＡは、個別に（片側リプレーサー１）、またはゲノム遺伝子座の反対の鎖を標的とするスペーサー（両側リプレーサー１）と対として送達される。ＤＢＳのうちのいくつかは、スペーサー領域またはプロトスペーサー隣接モチーフ領域（ＳｐＰＡＭｍｕｔ）に変異を含有する。ｇＲＮＡは、最初の３つ及び最後の３つの位置に２’－Ｏ－メチル３’－ホスホロチオエートヌクレオチドを含む。ＤＮＡドナーは、個別に送達されるか（片側リプレーサー１）、または対で送達される（両側リプレーサー１）。いくつかのドナーは、スペーサーまたはプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）領域（ＳｐＰＡＭｍｕｔ）に変異を有する。いくつかのドナーは、最初の３つと最後の３つの位置にホスホロチオエート結合を有する。いくつかのドナーは、ヌクレオチド配列を変化させるがアミノ酸配列を保持するサイレント変異で再コードされる。ＤＮＡドナーは、５’末端でリン酸化される。いくつかの条件では、ｇＲＮＡ及びドナーＤＮＡは、ＬＮＰ製剤化の前にサーマルサイクラーアニーリング反応によってアニールされる。プラスミドは、ｍＲＮＡの代わりに使用され得る。表１２は、この実験を詳述する。表中の名前に対応する配列が、本明細書に見出され得る。

【表１２－１】

表１２

条件	フォワードガイド	リバースガイド	上位ドナー	下位ドナー	リガーゼ	両側をアニールするか?
1	Rep1.BFP.FwdGuide		Rep1.BFP2GFP.TopDonor.5P		NLS-nCas9-リンカー-SplintR-bpNLS	利用不可
2		Rep1.BFP.RevGuide		Rep1.BFP2GFP.BotDonor.5P	NLS-nCas9-リンカー-SplintR-bpNLS	利用不可
3	Rep1.BFP.FwdGuide	Rep1.BFP.RevGuide	Rep1.BFP2GFP.TopDonor.5P	Rep1.BFP2GFP.BotDonor.5P	NLS-nCas9-リンカー-SplintR-bpNLS	はい
4	Rep1.BFP.FwdGuide	Rep1.BFP.RevGuide	Rep1.BFP2GFP.TopDonor.5P	Rep1.BFP2GFP.BotDonor.5P	NLS-nCas9-リンカー-SplintR-bpNLS	いいえ
5	Rep1.BFP.FwdGuide	Rep1.BFP.RevGuide	Rep1.BFP2GFP.TopDonor.Recoded.5P	Rep1.BFP2GFP.BotDonor.Recoded.5P	NLS-nCas9-リンカー-SplintR-bpNLS	はい
6	Rep1.BFP.FwdGuide.SpPAMmut	Rep1.BFP.RevGuide.SpPAMmut	Rep1.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.Recoded.5P	Rep1.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.Recoded.5P	NLS-nCas9-リンカー-SplintR-bpNLS	はい
7	Rep1.BFP.FwdGuide	Rep1.BFP.RevGuide	Rep1.BFP2GFP.TopDonor.Recoded.5P.endPhos	Rep1.BFP2GFP.BotDonor.Recoded.5P.endPhos	NLS-nCas9-リンカー-SplintR-bpNLS	はい

【０２４３】

実施例２．リプレーサー２によるＢＦＰからＧＦＰに変換するための編集

実験は、実施例１と同様に行うことができるが、リプレーサー２のフォーマットに適合するように調整することができる。本明細書で使用されるリガーゼは、Ｔ４リガーゼ、ｈＬＩＧ１（２３３－９１９）、及びｈＬＩＧ１（１１９－９１９）である。リプレーサー２　ｇＲＮＡは、スペーサー、足場、及びＤＢＳを含有する。ｇＲＮＡは、個別に（片側リプレーサー２）または対で送達され（両側リプレーサー２）、ｇＲＮＡは、最初の３つ及び最後の３つの位置に２’－Ｏ－メチル３’－ホスホロチオエートヌクレオチドを含有する。ＤＮＡドナーは、ＦＢＳと、ＤＢＳにハイブリダイゼーションすることができるガイ

ド結合部位（ＧＢＳ）と、を含む。いくつかのＤＮＡドナーは、ＳｐＰＡＭ変異を含み、いくつかのＤＮＡドナーは、最初の３つと最後の３つの位置にホスホロチオエート結合を有する。いくつかのＤＮＡドナーは、再コードされる。ＤＮＡドナーは、５’末端でリン酸化される。ＤＮＡドナーは、リプレーサー２フォーマットで対として送達される。ｇＲＮＡ及びドナーＤＮＡのうちのいくつかは、ＬＮＰ製剤化の前にアニーリングされる。表１３は、この実験を詳述する。表中の名前に対応する配列が、本明細書に見出され得る。

【表１３－１】

表１３

条件	フォワードガイド	リバースガイド	上位ドナー	下位ドナー	リガーゼ	両側をアニールするか?
1	Rep2.BFP.Fwd Guide		Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(233-919)-bpNLS	はい
2		Rep2.BFP.RevGuide	Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(233-919)-bpNLS	はい
3	Rep2.BFP.Fwd Guide	Rep2.BFP.RevGuide	Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(233-919)-bpNLS	はい
4	Rep2.BFP.Fwd Guide	Rep2.BFP.RevGuide	Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(233-919)-bpNLS	いいえ
5	Rep2.BFP.Fwd Guide	Rep2.BFP.RevGuide	Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.Recoded.5P	Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.Recoded.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(233-919)-bpNLS	はい
6	Rep2.BFP.Fwd Guide	Rep2.BFP.RevGuide	Rep2.BFP2GFP.TopDonor.5P	Rep2.BFP2GFP.BotDonor.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(233-919)-bpNLS	はい
7	Rep2.BFP.Fwd Guide	Rep2.BFP.RevGuide	Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.Recoded.5P.endPhos	Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.Recoded.5P.endPhos	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(233-919)-bpNLS	はい
8	Rep2.BFP.Fwd Guide		Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-T4LIG-bpNLS	はい
9		Rep2.BFP.RevGuide	Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-T4LIG-bpNLS	はい

【表１３－２】

条件	フォワードガイド	リバースガイド	上位ドナー	下位ドナー	リガーゼ	両側をアニールするか?
10	Rep2.BFP.FwdGuide	Rep2.BFP.RevGuide	Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.Recoded.5P	Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.Recoded.5P	NLS-nCas9-リンカー-T4LIG-bpNLS	はい
11	Rep2.BFP.FwdGuide		Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(119-919)-bpNLS	はい
12		Rep2.BFP.RevGuide	Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(119-919)-bpNLS	はい
13	Rep2.BFP.FwdGuide	Rep2.BFP.RevGuide	Rep2.BFP2GFP.TopDonor.SpPAMmut.Recoded.5P	Rep2.BFP2GFP.BotDonor.SpPAMmut.Recoded.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(119-919)-bpNLS	はい

【０２４４】

実施例３．リプレーサー２によってＣＢＸ１の前にｍＧＬを挿入するための編集

緑色蛍光を示す融合タンパク質が形成されるように、ＣＢＸ１遺伝子の前にＨＥＫ２９３Ｔ細胞のゲノムに単量体グリーンランタン（ｍＧＬ）を挿入するための編集実験を行うことができる。この蛍光は、実施例１及び２と同様に、フローサイトメトリーによって検出することができる。実験は、ｇＲＮＡ及びＤＮＡドナーの配列が異なっており、青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）を緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）に変化させる配列の挿入ではなく、ｍＧＬのゲノムへの挿入を可能にすることを除いて、実施例２と同様の方法で実施される。実施例３のＤＮＡドナーは、実施例２よりも長く、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔによって合成される。ＤＮＡドナーは、５’末端でリン酸化される。表１４は、この実験を詳述する。表中の名前に対応する配列が、本明細書に見出され得る。

【表１４－１】

表１４

条件	フォワードガイド	リバースガイド	上位ドナー	下位ドナー	リガーゼ	両側をアニールするか?
1	Rep2.CBX1.FwdGuide		Rep2.mGL-CBX1.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.mGL-CBX1.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(233-919)-bpNLS	はい
2		Rep2.CBX1.RevGuide	Rep2.mGL-CBX1.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.mGL-CBX1.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(233-919)-bpNLS	はい
3	Rep2.CBX1.FwdGuide	Rep2.CBX1.RevGuide	Rep2.mGL-CBX1.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.mGL-CBX1.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(233-919)-bpNLS	はい
4	Rep2.CBX1.FwdGuide		Rep2.mGL-CBX1.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.mGL-CBX1.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-T4LIG-bpNLS	はい
5		Rep2.CBX1.RevGuide	Rep2.mGL-CBX1.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.mGL-CBX1.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-T4LIG-bpNLS	はい

【表１４－２】

条件	フォワードガイド	リバースガイド	上位ドナー	下位ドナー	リガーゼ	両側をアニールするか?
6	Rep2.CBX1.FwdGuide	Rep2.CBX1.RevGuide	Rep2.mGL-CBX1.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.mGL-CBX1.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-T4LIG-bpNLS	はい
7	Rep2.CBX1.FwdGuide		Rep2.mGL-CBX1.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.mGL-CBX1.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(119-919)-bpNLS	はい
8		Rep2.CBX1.RevGuide	Rep2.mGL-CBX1.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.mGL-CBX1.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(119-919)-bpNLS	はい
9	Rep2.CBX1.FwdGuide	Rep2.CBX1.RevGuide	Rep2.mGL-CBX1.TopDonor.SpPAMmut.5P	Rep2.mGL-CBX1.BotDonor.SpPAMmut.5P	NLS-nCas9-リンカー-hLIG1(119-919)-bpNLS	はい

【０２４５】

実施例４．患者における遺伝的疾患の治療

鎌状赤血球症を有するヒト患者は、治療のために医師を訪れる。患者は、ヘモグロビン遺伝子変異を有するとして特定される。造血幹細胞及び前駆細胞は、患者の末梢血から収集される。細胞は、細胞のゲノムを、ｎＣａｓ９－ＤＮＡリガーゼ融合タンパク質、ｇＲＮＡ、及び修正されたヘモグロビン遺伝子を含むドナーＤＮＡと接触させることによって編集される。ｇＲＮＡは、融合タンパク質を遺伝子変異に動員し、ｎＣａｓ９は、変異に隣接する片側で患者のＤＮＡをニックする。ｇＲＮＡは、ニックによって生成されたゲノムフラップ、及びドナーＤＮＡに結合し、リガーゼがゲノムフラップをドナーＤＮＡにライゲーションするためのＲＮＡスプリントを形成する。別の融合タンパク質は、変異の反対側の第２のｇＲＮＡを使用して変異ヘモグロビン遺伝子の反対側の鎖をニックし、ドナーＤＮＡの反対側をライゲーションする。したがって、変異したＤＮＡをドナーＤＮＡに置き換え、ドナーＤＮＡを有する細胞を患者に戻し、したがって、患者の遺伝的疾患を治

療する。

【０２４６】

実施例５．作物を増強する

ダイズ植物において、生殖細胞に、ｎＣａｓ９－ＤＮＡリガーゼ融合タンパク質をコードする発現ベクターと、ｇＲＮＡと、除草剤耐性遺伝子をコードするドナーＤＮＡとをマイクロインジェクションする。ｇＲＮＡは、融合タンパク質を、遺伝子をまだ含まないダイズゲノム内の好適なスポットに動員する。ｎＣａｓ９は、スポットに隣接する片側にダイズのＤＮＡをニックする。ｇＲＮＡはまた、ニックによって作成されたゲノムフラップに結合するためにドナーＤＮＡを動員し、リガーゼは、ドナーＤＮＡ自体をスプリントとして使用してニックを密封する。別の融合タンパク質は、スポットに隣接する反対側のダイズのＤＮＡの反対側の鎖をニックし、ドナーＤＮＡの反対側をライゲーションし、したがって、除草剤耐性遺伝子を生殖細胞に組み込む。生殖細胞は、最終的に種子を生成し、種子は、除草剤耐性ダイズを成長させるために収穫される。

【０２４７】

実施例６．Ｔ４リガーゼを使用したインビトロ片側リプレーサー２

核酸を編集するための本明細書に記載の構成要素及び方法の有用性を実証するために、インビトロ実験を行った。この実施例における実験は、具体的には、片側リプレーサー２の実行可能性を評価した。実験では、青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）標的領域に対応する１００ｂｐ、５’－Ｃｙ５標識二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）基質（ＩＤＴ）を使用し（実施例１及び２を参照）、ニッキング部位は、塩基対５０の中央に位置する。可変ＧＢＳ、１３ｎｔフラップ結合部位（ＦＢＳ）、及びプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）変異を含有する５’－リン酸化ｄｓＤＮＡドナー（ＩＤＴ）を、対応する可変ＤＢＳを含有するｇＲＮＡ（Ａｇｉｌｅｎｔ）と併せて使用した。５’－Ｃｙ５標識ｄｓＤＮＡ基質及び５’－リン酸化ｄｓＤＮＡドナーを、９５Ｃまで５分間加熱した後、室温までゆっくりと冷却することによって、相補的オリゴヌクレオチドを使用して別個にアニーリングした。

【０２４８】

インビトロ片側リプレーサー２反応は、まず、ｇＲＮＡ（３０ｎＭ最終）及びｄｓＤＮＡドナー（３０ｎＭ最終）を、Ｃａｓ９（Ｃａｓ９ｎ；ＩＤＴ；３０ｎＭ最終）をニッキングする組換えＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓとともに室温で１０分間インキュベートした後、Ｔ４リガーゼ（ＮＥＢ；２００Ｕ最終）、ＡＴＰ（１ｍＭ最終）、及び５’－Ｃｙ５標識ｄｓＤＮＡ基質（３ｎＭ最終）を添加することによって行った。反応を、ＮＥＢ緩衝液３．１の存在下で（１０ｕｌの最終体積）、３７Ｃで１時間実行した。反応を、０．５％　ＳＤＳ及び１００ｕｇ／ｍｌのプロテイナーゼＫの添加によって終了し、３７Ｃで３０分間インキュベートした。次いで、反応生成物を、２×ホルムアミドゲルローディング緩衝液（９０％ホルムアミド；１０％グリセロール；０．０１％ブロモフェノールブルー）と組み合わせ、９５℃で１０分間変性させ、尿素ＰＡＧＥゲル（１５％　ＴＢＥ－尿素、５５℃、２００Ｖ）を変性させることによって分離した。ＤＮＡ生成物を、ＬＩ－ＣＯＲ　Ｏｄｙｓｓｅｙ　ＣＬｘイメージャーを使用してＣｙ５蛍光シグナルによって視覚化した。

【０２４９】

インタクトな１００ｂｐ　５’－Ｃｙ５標識ｄｓＤＮＡ基質に加えて、ニックされた５’－Ｃｙ５標識ｄｓＤＮＡ基質及び最終ライゲーション生成物をサイズ対照として含めた。ニックされた５’－Ｃｙ５標識ｄｓＤＮＡ対照を、１００ｂｐ　５’－Ｃｙ５標識ｄｓＤＮＡ基質（５’－Ｃｙ５標識５０ｍｅｒ及び５’－リン酸化５０ｍｅｒ）の上部鎖オリゴに対応する２つの５０ｍｅｒと、その相補的な１００ｍｅｒ下部鎖オリゴとを使用してアニーリングした。最終的なライゲーション生成物対照をアニーリングし、１５０ｎｔの上部鎖ドナーオリゴとともに、ニック対照からの５’－Ｃｙ５標識５０ｍｅｒ及び下部１００ｍｅｒを使用してライゲーションした。

【０２５０】

図８Ａは、組み込み核酸の例示的なニッキング及びライゲーションパターンを示す。図

８Ｂは、３０ｎｔのＧＢＳ／ＤＢＳ及び熱安定性Ｔ４リガーゼを使用した、インビトロでの片側リプレーサー２に関連付けられたパターンを示す例示的な核酸ゲルを示す。３０ｎｔ　ＧＢＳ／ＤＢＳの組み合わせ、ＰＡＭ変異を含有するドナー、及び熱安定性Ｔ４リガーゼ（Ｈｉ－Ｔ４、ＮＥＢ）を使用して、我々の対照生成物（レーン１）のサイズに対応する最終リプレーサー生成物（レーン３）を生成することができた。ニッキングＣａｓ９（Ｃａｓ９ｎ）（レーン２）の不在下、またはスプリントとして機能する底部ドナーの不在下（レーン４及び５）では、リプレーサー生成物は検出されなかった。図８Ｃは、可変長ＧＢＳ／ＤＢＳの組み合わせ及びＴ４リガーゼを使用したインビトロ片側リプレーサー２に関連付けられたパターンを示す例示的な核酸ゲルを示す。通常のＴ４リガーゼ（ＮＥＢ）を使用して、ＧＢＳ／ＤＢＳなし、２０ｎｔ　ＧＢＳ／ＤＢＳ、及び３０ｎｔ　ＧＢＳ／ＤＢＳを含む複数のＧＢＳ／ＤＢＳの組み合わせを使用した場合、対照のサイズに対応する最終リプレーサー生成物を生成することとした。更に、この実験では、ＰＡＭ変異を含有する再コードされたｄｓＤＮＡドナーは、再コードされなかったＰＡＭ変異体ｄｓＤＮＡドナーと比較して、最終リプレーサー生成物の生成においてより効率的であった。結果は、ＤＮＡリガーゼが、標的核酸を編集するためにＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼとともに使用され得ることを示す。

【０２５１】

実施例７．哺乳動物細胞における様々なカップリングアーキテクチャにおけるニッキングＣａｓ９及び複数のＤＮＡリガーゼを有する片側リプレーサー２の使用

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に安定的に組み込まれた青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ）遺伝子を編集するために使用される構成要素を、リポフェクタミン２０００トランスフェクションによって共送達した。構成要素は、５’及び３’末端に２’－Ｏ－メチル及びホスホロチオエートの化学修飾を有する化学的に合成されたガイドＲＮＡ（配列番号１６６、ｍＧ＊ｍＣ＊ｍＵ＊ＧＡＡＧＣＡＣＵＧＣＡＣＧＣＣＡＵＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＧＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＣＧＧＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＣＣＡＧＣＵＧＣＧＧＵＡＵＵＧＵＧＧｍＣ＊ｍＧ＊ｍＵ）、５’ホスフェート末端修飾を伴う組み込み核酸（配列番号１６７、／５Ｐｈｏｓ／ｃｇｔａＴｇｔｃａｇｇｇｔｇｇｔｃａｃＧＡＧｇｇ）、ロックド核酸及びホスホロチオエート修飾を伴う分裂核酸（配列番号１６９、＋ｃ＊ｃ＊＋ＣＴ＋ＣＧ＋ＴＧ＋ＡＣ＋ＣＡ＋ＣＣ＋ＣＴ＋ＧＡ＋ＣＡ＋ＴＡ＋ＣＧＧＣＧＴＧＣＡｇｔｇｃｔｔＡＣＧＣＣＡ＋ＣＡ＋ＡＴ＋ＡＣ＋ＣＧ＋ＣＡ＋Ｇ＊Ｃ＊＋Ｔ）、及びリガーゼに融合されたニッキングＣａｓ９をコードする単一ｍＲＮＡまたはニッキングＣａｓ９及びリガーゼをコードするｍＲＮＡの対のいずれかを含んでいた。

【０２５２】

組み込み核酸及びスプリント核酸を、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（ＩＤＴ）によって合成した。Ｃａｓ９ｎ（Ｈ８４０Ａ）及び全てのリガーゼに対応する全てのｍＲＮＡは、ＨｉＳｃｒｉｂｅ　Ｔ７高収率ＲＮＡ合成キット（ＮＥＢ）を使用して、インビトロ転写（ＩＶＴ）反応を介して生成される。コード配列は、１５２ｎｔポリＡテールに加えて、５’ＵＴＲの単一のコピー及びヒトβグロビン遺伝子からの３’ＵＴＲの２つのコピーを含むＩＶＴベクターにクローニングされる。コード配列を含有するプラスミドＤＮＡを、ポリＡテールのすぐ下流に位置するＸｂａＩ制限酵素部位を使用して線形化する。次いで、線形化プラスミドを、フェノール：クロロホルム抽出、続いてエタノール沈殿を介して精製する。ｍＲＮＡは、ウリジン－トリホスフェートの代わりにＮ１－メチルプソイドウリジン－５’－トリホスフェート（ＴｒｉＬｉｎｋ　ＢｉｏＴｅｃｈ）を含有するＩＶＴ反応を介して生成され、ＣｌｅａｎＣａｐ試薬ＡＧ（３’ＯＭｅ）（ＴｒｉＬｉｎｋ　ＢｉｏＴｅｃｈ）とともに共転写的にキャップされる。ＩＶＴ反応を３７℃で２時間インキュベートし、続いてテンプレートＤＮＡのＤＮＡｓｅ　Ｉ消化を行う。最後に、ＬｉＣｌ沈殿を使用してｍＲＮＡ生成物を精製し、定量化し（Ｑｕｂｉｔ　Ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ　Ｑｕａｎｔｉｆｉｃａｔｉｏｎ；ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、ゲル電気泳動を変性させることによって完全性をチェックする。「トランス

でのリガーゼ」は、そのＣ末端でロイシンジッパーに融合したＴ４リガーゼと組み合わせたＣａｓ９　Ｈ８４０Ａニッカーゼ（Ｔ４－ＬＺ、配列番号１４５）を指す。「ＬＺ；Ｃ末端リガーゼ」は、Ｔ４（ＬＺ－Ｔ４、配列番号１４２）、ＳｐｌｉｎｔＲ（ＬＺ－ＳｐｌｉｎｔＲ、配列番号１４１）、またはｈＬＩＧ４（１－６２０）（ＬＺ－ｈＬＩＧ４（１－６２０）、配列番号１４６）のＮ末端のロイシンジッパーに融合したリガーゼと組み合わせた、Ｃ末端のロイシンジッパー（ｎＣａｓ９－ＬＺ、配列番号１３３）に融合したＣａｓ９　Ｈ８４０Ａニッカーゼを指す。「ＬＺ；Ｎ末端リガーゼ」は、Ｔ４（Ｔ４－ＬＺ、配列番号１４５）、ＳｐｌｉｎｔＲ（ＳｐｌｉｎｔＲ－ＬＺ、配列番号１４８）、またはｈＬＩＧ４（１－６２０）（ｈＬＩＧ４（１－６２０）－ＬＺ、配列番号１４９）のＣ末端のロイシンジッパーに融合されたリガーゼと組み合わせた、そのＮ末端のロイシンジッパー（ＬＺ－ｎＣａｓ９、配列番号１４７）に融合されたＣａｓ９　Ｈ８４０Ａニッカーゼを指す。「融合；Ｃ末端リガーゼ」は、Ｔ４（ｎＣａｓ９－Ｔ４、配列番号１３１）、ＳｐｌｉｎｔＲ（ｎＣａｓ９－ＳｐｌｉｎｔＲ、配列番号１２９）、またはｈＬＩＧ４（１－６２０）（ｎＣａｓ９－ｈＬＩＧ４（１－６２０）配列番号１５０）のＣ末端にリガーゼを有するリガーゼに融合されたＣａｓ９　Ｈ８４０Ａニッカーゼを指す。「融合；Ｎ末端リガーゼ」は、Ｔ４（Ｔ４－ｎＣａｓ９、配列番号１５１）、ＳｐｌｉｎｔＲ（ＳｐｌｉｎｔＲ－ｎＣａｓ９、配列番号１５２）、またはｈＬＩＧ４（１－６２０）（ｈＬＩＧ４（１－６２０）－ｎＣａｓ９、（配列番号１５３）のＮ末端にリガーゼを有するリガーゼと融合したＣａｓ９　Ｈ８４０Ａニッカーゼを指す。ｇＲＮＡは、スペーサー、足場、及びドナー結合部位を含有した。スプリント組み込み核酸は、ガイド結合部位及びフラップ結合部位を含有した。ライゲーション組み込み核酸及びスプリント核酸は、部分的に相補的であった。

【０２５３】

組み込み核酸及びスプリント核酸を、アニーリング反応を使用してハイブリダイズし、次いでガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡと混合し、９６ウェルプレート中の付着性ＨＥＫ２９３細胞に送達する前に、ＯｐｔｉＭＥＭ中のリポフェクタミン２０００で製剤化した。２４～４８時間後、細胞を０．０５％のトリプシン－ＥＤＴＡで分離し、フローサイトメーターを通して実行して、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現する細胞のパーセンテージを測定し、ＢＦＰからＧＦＰへの遺伝子編集を示した（図９）。遺伝子編集は、ｎＣａｓ９に融合したとき、ロイシンジッパーを介してｎＣａｓ９と相互作用したとき、またはロイシンジッパー相互作用なしでトランスで送達したときに、Ｔ４、ＳｐｌｉｎｔＲ、及びｈＬＩＧ４（１－６２０）リガーゼで観察された。

【０２５４】

ここでの結果は、細胞における標的核酸を編集するためにＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを有するＤＮＡリガーゼを使用する有用性を実証する。この実施例における実験は、哺乳動物細胞における標的核酸を編集するために片側リプレーサー２構成要素を含むことの実現可能性を具体的に実証した。この実施例は、ヘテロ二量体化ドメイン（ここでは、ロイシンジッパー）を介してＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼ（例えば、ニッキングＣａｓ９）にカップリングされたＤＮＡリガーゼを、遺伝子編集などの核酸編集に含めることの有効性を示す。これはまた、ＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼに融合されたＤＮＡリガーゼ（例えば、Ｃａｓ９　Ｈ８４０Ａニッカーゼに融合されたＴ４リガーゼ）を有する哺乳動物細胞において核酸編集が可能であり、核酸編集は、ＤＮＡリガーゼ及びＲＮＡ誘導型エンドヌクレアーゼを別個のカップリングされていない構成要素として送達することによって達成され得ることを示す。

【０２５５】

実施例８．複数のゲノム標的で種々の編集を行うためのニッキングＣａｓ９及びＴ４　ＤＮＡリガーゼを有する片側リプレーサー２の使用

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるゲノム標的を編集するために使用された構成要素を、リポフェクタミン２０００トランスフェクションによって共送達した。構成要素には、５’及び３’末端に２’－Ｏ－メチル及びホスホロチオエートの化学修飾を有する化学的に合成さ

れたガイド、５’ホスフェート末端修飾を有する組み込み核酸、ロックド核酸及びホスホロチオエート修飾を有するスプリント核酸、ニッキングＣａｓ９をコードするｍＲＮＡ（ＬＺ－ｎＣａｓ９、配列番号１４７）、及びリガーゼをコードするｍＲＮＡ（Ｔ４－ＬＺ、配列番号１４５）が含まれた。標的特異的ガイド、スプリント、及び組み込み核酸は、表１５に列挙される。組み込み核酸及びスプリント核酸を、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（ＩＤＴ）によって合成し、両方のｍＲＮＡを、実施例７に記載される方法を使用して、インビトロ転写反応を介して生成した。ｇＲＮＡは、スペーサー、足場、及びドナー結合部位を含有した。スプリント組み込み核酸は、ガイド結合部位及びフラップ結合部位を含有した。ライゲーション組み込み核酸及びスプリント核酸は、部分的に相補的であった。組み込み核酸及びスプリント核酸を、アニーリング反応を使用してハイブリダイズし、次いでガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡと混合し、９６ウェルプレート中の付着性ＨＥＫ２９３細胞に送達する前に、ＯｐｔｉＭＥＭ中のリポフェクタミン２０００で製剤化した。２４～４８時間後、ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔを使用して細胞からゲノムＤＮＡを抽出し、Ｑ５　ＤＮＡポリメラーゼを使用してゲノム標的を増幅させた。ＰＣＲプログラムを９８Ｃで３０秒間、次いで３５サイクルを９８Ｃで５秒間、６７Ｃで２０秒間、及び７２Ｃで２０秒間実行し、次いで最後に７２Ｃで２分間実行した。ＰＣＲプライマーを表１５に列挙する。ＰＣＲ生成物をＥｘｏＣＩＰ処理でクリーンアップし、Ａｍｐｌｉｃｏｎ－ＥＺサービスを使用してＡｚｅｎｔａによって次世代シークエンシング（ＮＧＳ）のために提出した。配列決定リードをマージし、目的の増幅子に整列させ、意図された編集と一致した総リードのパーセンテージを計算した（図１０）。この実施例は、様々なゲノム標的における哺乳動物細胞における片側リプレーサー２による遺伝子編集の有効性を示す。本明細書における編集の種類としては、単一点変異（ＨＥＫ３　Ｆ＋５　ＧからＴ）、一対の点変異（ＶＥＧＦＡ　Ｒ＋５　ＧからＴ及び＋２　ＡからＴ、ＶＥＧＦＡ　Ｆ＋５　ＧからＴ及び＋２　ＧからＣ、ならびにＡＡＶＳ１　Ｒ＋５　ＧからＴ）、または片側リプレーサー２を使用したトリヌクレオチド挿入（ＨＥＫ３　Ｆ　ＣＡＣ挿入及びＡＡＶＳ１　Ｒ　ＣＡＣ挿入）が挙げられる。

【表１５－１】

表１５

条件	ガイド	スプリント	ドナー	PCRプライマー
VEGFA R+5GからT及び+2 AからT	配列番号170 mC*mA*mC*CCCGGCUCUGGCUAAAGGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCGACUUGAAAAAGUCGGACCGAGUCGGUCCAGCUGCGGUAUUGUGGmC*mG*mU	配列番号174 +C*C*+TT+TC+CA+AA+GC+CC+AT+TC+CA+TC+ATtagccagagccggACGCCA+CA+AT+AC+CG+CA+G*C*+T	配列番号180 /5Phos/ATGATGGAATGGGCTTTGGAAAGG	配列番号186 ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCCGCTCACTTTGATGTCT、 配列番号187 GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGGGAGAGGGACACACAGA
VEGFA F+5GからT及び+2 GからC	配列番号171 mG*mA*mU*GUCUGCAGGCCAGAUGAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCGACUUGAAAAAGUCGGACCGAGUCGGUCCGUGGUUCCGGGCUGCAmU*mG*mA	配列番号175 +A*C*+AA+TG+TG+CC+AT+CT+GG+AG+CA+CT+GAtctggcctgcagaTCATGC+AG+CC+CG+GA+AC+C*A*+C	配列番号181 /5Phos/TCAGTGCTCCAGATGGCACATTGT	配列番号223 ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCCGCTCACTTTGATGTCT、 配列番号224 GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGGGAGAGGGACACACAGA

【表１５－２】

条件	ガイド	スプリント	ドナー	PCRプライマー
HEK3 F CAC 挿入	配列番号172 mG*mG*mC*ccagacugagcacgugaGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCGACUUGAAAAAGUCGGACCGAGUCGGUCCGUGGUUCCGGGCUGCAmU*mG*mA	配列番号176 +G*C*+TT+CC+TT+TC+CT+CT+GC+CA+TC+Ac+accgtgctcagtctgTCATGC+AG+CC+CG+GA+AC+C*A*+C	配列番号182 /5Phos/gtgTGATGGCAGAGGAAAGGAAGC	配列番号188 ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTccctggcctgggtcaatcc、配列番号189 GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTctgaagggccaggtccctc
HEK3 F +5 GからT	配列番号221 mG*mG*mC*ccagacugagcacgugaGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCGACUUGAAAAAGUCGGACCGAGUCGGUCCGUGGUUCCGGGCUGCAmU*mG*mA	配列番号177 +A*G*+GG+CT+TC+CT+TT+CC+TC+TG+CA+AT+CAcgtgctcagtctgTCATGC+AG+CC+CG+GA+AC+C*A*+C	配列番号183 /5Phos/TGATTGCAGAGGAAAGGAAGCCCT	配列番号225 ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTccctggcctgggtcaatcc、配列番号226 GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTctgaagggccaggtccctc
AAVS1 R CAC 挿入	配列番号173 mG*mC*mG*acuccuggaaguggccaGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCGACUUGAAAAAGUCGGACCGAGUCGGUCCAGCUGCGGUAUUGUGGmC*mG*mU	配列番号178 +A*T*+TA+GC+AG+AA+GT+GG+CC+CT+TG+Gc+acccacttccaggACGCCA+CA+AT+AC+CG+CA+G*C*+T	配列番号184 /5Phos/gtgCCAAGGGCCACTTCTGCTAAT	配列番号190 ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGCCGGGAACTGCCGCTGGC; 配列番号191 GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGGAGGCCCTCATCTGGCG

【表１５－３】

条件	ガイド	スプリント	ドナー	PCRプライマー
AAVS1 R+5G からT	配列番号222 mG*mC*mG*acuccuggaaguggccaGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCGACUUGAAAAAGUCGGACCGAGUCGGUCCAGCUGCGGUAUUGUGGmC*mG*mU	配列番号179 +T*C*+CA+TT+AG+CA+GA+AG+TG+GC+CA+TT+GGccacttccaggACGCCA+CA+AT+AC+CG+CA+G*C*+T	配列番号185 /5Phos/CCAATGGCCACTTCTGCTAATGGA	配列番号227 ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGCCGGGAACTGCCGCTGGC; 配列番号228 GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGGAGGCCCTCATCTGGCG

【０２５６】

実施例９．複数のゲノム標的で欠失及び配列置き換えを行うためのニッキングＣａｓ９及びＴ４　ＤＮＡリガーゼを有する両側リプレーサー２の使用

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるゲノム標的を編集するために使用された構成要素を、リポフェクタミン２０００トランスフェクションによって共送達した。構成要素には、５’及び３’末端に２’－Ｏ－メチル及びホスホロチオエートの化学修飾を有する２つの化学的に合成されたガイド、５’ホスフェート末端修飾を有する２つの組み込み核酸、ロックド核酸及びホスホロチオエート修飾を有する２つのスプリント核酸、ニッキングＣａｓ９をコードするｍＲＮＡ（ＬＺ－ｎＣａｓ９、配列番号１４７）、及びリガーゼをコードするｍＲＮＡ（Ｔ４－ＬＺ、配列番号１４５）が含まれた。「ａｔｔＢによる１７５ｎｔのＶＥＧＦＡ置き換え」及び「ＶＥＧＦＡ　１７５ｎｔ欠失」の両方について、使用される２つのガイドＲＮＡは、ＶＥＧＦＡ＿Ｒ（配列番号１７０）及びＶＥＧＦＡ＿Ｆ（配列番号１７１）であった。「ａｔｔＢによる１１７ｎｔのＡＡＶＳ１置き換え」及び「ＡＡＶＳ１１１７ｎｔ欠失」の両方について、使用される２つのガイドＲＮＡは、ＡＡＶＳ１＿Ｒ（配列番号１７３）及びＡＡＶＳ１＿Ｆ（配列番号１９２、ｍＧ＊ｍＣ＊ｍＵ＊ｇｇｃｃｃｃｃａｃｃｇｃｃｃｃａＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＧＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＣＧＧＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＣＣＧＵＧＧＵＵＣＣＧＧＧＣＵＧＣＡｍＵ＊ｍＧ＊ｍＡ）であった。「ａｔｔＢによる１７５ｎｔのＶＥＧＦＡ置換」について、使用されるスプリント核酸は、配列番号１９３（＋ｇ＊ｇ＊＋ａｇ＋ａｃ＋ｃｇ＋ｃｃ＋ｇｔ＋ｃｇ＋ｔｃ＋ｇａ＋ｃａ＋ａｇ＋ｃｃｔｃｔｇｇｃｃｔｇｃａｇａＴＣＡＴＧＣ＋Ａ Ｇ＋ＣＣ＋ＣＧ＋ＧＡ＋ＡＣ＋Ｃ＊Ａ＊＋Ｃ）及び配列番号１９４（＋ｇ＊ｇ＊＋ｃｇ＋ｇｔ＋ｃｔ＋ｃｃ＋ｇｔ＋ｃｇ＋ｔｃ＋ａｇ＋ｇａ＋ｔｃ＋ａｔｔａｇｃｃａｇａｇｃｃｇｇＡＣＧＣＣＡ＋ＣＡ＋ＡＴ＋ＡＣ＋ＣＧ＋ＣＡ＋Ｇ＊Ｃ＊＋Ｔ）であり、使用される組み込み核酸は、配列番号１９５（／５Ｐｈｏｓ／ｇｇｃｔｔｇｔｃｇａｃｇａｃｇｇｃｇｇｔｃｔｃｃ）及び配列番号１９６（／５Ｐｈｏｓ／ａｔｇａｔｃｃｔｇａｃｇａｃｇｇａｇａｃｃｇｃｃ）であった。「ＶＥＧＦＡ　１７５ｎｔ欠失」について、使用されるスプリント核酸は、配列番号１９７（＋Ｃ＊Ｃ＊＋ＧＴ＋ＣＴ＋ＧＣ＋ＡＣ＋ＡＣ＋ＣＣ＋ＣＧ＋ＧＣ＋ＴＣ＋ＴＧ＋ＧＣ＋ＴＡｔｃｔｇｇｃｃｔｇｃａｇａＴＣＡＴＧＣ＋Ａ Ｇ＋ＣＣ＋ＣＧ＋ＧＡ＋ＡＣ＋Ｃ＊Ａ＊＋Ｃ）及び配列番号１９８（＋Ｇ＊Ｃ＊＋ＴＣ＋ＡＣ＋ＴＴ＋ＴＧ＋ＡＴ＋ＧＴ＋ＣＴ＋ＧＣ＋ＡＧ＋ＧＣ＋ＣＡ＋ＧＡｔａｇｃｃａｇａｇｃｃｇｇＡＣＧＣＣＡ＋ＣＡ＋

ＡＴ＋ＡＣ＋ＣＧ＋ＣＡ＋Ｇ＊Ｃ＊＋Ｔ）であり、使用される組み込み核酸は、配列番号１９９（／５Ｐｈｏｓ／ＴＡＧＣＣＡＧＡＧＣＣＧＧＧＧＴＧＴＧＣＡＧＡＣＧＧ）及び配列番号２００（／５Ｐｈｏｓ／ＴＣＴＧＧＣＣＴＧＣＡＧＡＣＡＴＣＡＡＡＧＴＧＡＧＣ）であった。「ａｔｔＢによる１１７ｎｔのＡＡＶＳ１置き換え」について、使用されるスプリント核酸は、配列番号２０１（＋ｇ＊ｇ＊＋ａｇ＋ａｃ＋ｃｇ＋ｃｃ＋ｇｔ＋ｃｇ＋ｔｃ＋ｇａ＋ｃａ＋ａｇ＋ｃｃｇｇｃｇｇｔｇｇｇＴＣＡＴＧＣ＋Ａ＋Ｇ＋ＣＣ＋ＣＧ＋ＧＡ＋ＡＣ＋Ｃ＊Ａ＊＋Ｃ）及び配列番号２０２（＋ｇ＊ｇ＊＋ｃｇ＋ｇｔ＋ｃｔ＋ｃｃ＋ｇｔ＋ｃｇ＋ｔｃ＋ａｇ＋ｇａ＋ｔｃ＋ａｔｃｃａｃｔｔｃｃａｇｇＡＣＧＣＣＡ＋ＣＡ＋ＡＴ＋ＡＣ＋ＣＧ＋ＣＡ＋Ｇ＊Ｃ＊＋Ｔ）であり、使用される組み込み核酸は、配列番号１９５及び配列番号１９６であった。「ＡＡＶＳ１　１１７ｎｔ欠失」について、使用されるスプリント核酸は、配列番号２０３（＋Ｃ＊Ｇ＊＋ＧＧ＋ＧＣ＋ＡＣ＋ＡＧ＋ＣＧ＋ＡＣ＋ＴＣ＋ＣＴ＋ＧＧ＋ＡＡ＋ＧＴ＋ＧＧｇｇｃｇｇｔｇｇｇＴＣＡＴＧＣ＋ＡＧ＋ＣＣ＋ＣＧ＋ＧＡ＋ＡＣ＋Ｃ＊Ａ＊＋Ｃ）及び配列番号２０４（＋Ｇ＊Ｇ＊＋ＡＡ＋ＣＴ＋ＧＣ＋ＣＧ＋ＣＴ＋ＧＧ＋ＣＣ＋ＣＣ＋ＣＣ＋ＡＣ＋ＣＧ＋ＣＣｃｃａｃｔｔｃｃａｇｇＡＣＧＣＣＡ＋ＣＡ＋ＡＴ＋ＡＣ＋ＣＧ＋ＣＡ＋Ｇ＊Ｃ＊＋Ｔ）であり、使用される組み込み核酸は、配列番号２０５（／５Ｐｈｏｓ／ＣＣＡＣＴＴＣＣＡＧＧＡＧＴＣＧＣＴＧＴＧＣＣＣＣＧ）及び配列番号２０６（／５Ｐｈｏｓ／ＧＧＣＧＧＴＧＧＧＧＧＧＣＣＡＧＣＧＧＣＡＧＴＴＣＣ）であった。組み込み核酸及びスプリント核酸を、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（ＩＤＴ）によって合成し、両方のｍＲＮＡを、実施例７に記載される方法を使用して、インビトロ転写反応を介して生成した。ｇＲＮＡは、スペーサー、足場、及びドナー結合部位を含有した。スプリント組み込み核酸は、ガイド結合部位及びフラップ結合部位を含有した。組み込み核酸及びスプリント核酸を組み込んでライゲーションする２つの対があり、各対は、互いに部分的に相補的であった。組み込み核酸及びスプリント核酸を、アニーリング反応を使用してハイブリダイズし、次いでガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡと混合し、９６ウェルプレート中の付着性ＨＥＫ２９３細胞に送達する前に、ＯｐｔｉＭＥＭ中のリポフェクタミン２０００で製剤化した。２４～４８時間後、ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔを使用して細胞からゲノムＤＮＡを抽出し、Ｑ５　ＤＮＡポリメラーゼを使用してゲノム標的を増幅させた。ＰＣＲプログラムを９８Ｃで３０秒間、次いで３５サイクルを９８Ｃで５秒間、６７Ｃで２０秒間、及び７２Ｃで２０秒間実行し、次いで最後に７２Ｃで２分間実行した。「ａｔｔＢによる１７５ｎｔのＶＥＧＦＡ置き換え」及び「ＶＥＧＦＡ　１７５ｎｔ欠失」の両方に使用されるＰＣＲプライマーは、配列番号１８６及び配列番号１８７である。「ａｔｔＢによる１１７ｎｔのＡＡＶＳ１置き換え」及び「ＡＡＶＳ１　１１７ｎｔ欠失」の両方に使用されるＰＣＲプライマーは、配列番号１９０及び配列番号１９１である。ＰＣＲ生成物をＥｘｏＣＩＰ処理で洗浄し、次世代配列決定（ＮＧＳ）のために提出した。配列決定リードをマージし、目的の増幅子に整列させ、意図された編集と一致した総リードのパーセンテージを計算した（図１１）。この例は、リプレーサー２がガイドＲＮＡ、スプリント、及びドナーの２つの完全なセットとして送達されるとき、各ガイドＲＮＡのニッキング部位の間のＤＮＡの領域全体を欠失させ、任意選択的にそのＤＮＡの領域を新しいＤＮＡ配列に置き換えることができることを示す。リプレーサーは、ここで互いにハイブリダイゼーションすることができる２つの別個のフラップを作製しているため、この遺伝子編集機構は、ＭＭＲ経路に依存しないであろう。ａｔｔＢ配列がリプレーサーによってゲノムの標的部位に挿入された後、合成遺伝子全体が、Ｂｘｂ１インテグラーゼとともに送達された場合、そのａｔｔＢ部位に挿入され得る。したがって、本明細書に記載のａｔｔＢ配列置き換えは、二本鎖切断またはミスマッチ修復を介した遺伝子編集なしに、ゲノムへの大きな１ｋｂ＋ＤＮＡ断片の標的挿入に使用することができた。

【０２５７】

実施例１０．メチル化ＤＮＡをゲノム標的に組み込むためのニッキングＣａｓ９及びＴ４ＤＮＡリガーゼを有する片側リプレーサー２の使用

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるゲノム標的を編集するために使用された構成要素を、リポ

フェクタミン２０００トランスフェクションによって共送達した。構成要素には、５’及び３’末端に２’－Ｏ－メチル及びホスホロチオエートの化学修飾を有する化学的に合成されたガイド（配列番号１６６）、組み込み核酸、スプリント核酸、ニッキングＣａｓ９をコードするｍＲＮＡ（ＬＺ－ｎＣａｓ９、配列番号１４７）、及びリガーゼをコードするｍＲＮＡ（Ｔ４－ＬＺ、配列番号１４５）が含まれた。「非メチル化ドナー」との条件は、５’ホスフェート末端修飾（配列番号２０７、／５Ｐｈｏｓ／ＣＧＴＡＴＧＴＣＡＧＧＧＴＧＧＴＣＡＣＧ）を有する組み込み核酸を使用した。「全てのシトシンがメチル化されたドナー」との条件は、５’ホスフェート末端修飾を有する組み込み核酸及びメチル化シトシンを使用した（配列番号２０７、５Ｐｈｏｓ／／５Ｍｅ－ｄＣ／ｇｔａＴｇｔ／ｉＭｅ－ｄＣ／ａｇｇｇｔｇｇｔ／ｉＭｅ－ｄＣ／ａ／ｉＭｅ－ｄＣ／Ｇ）。「スプリントはＬＮＡである」の下での条件では、ロックド核酸及びホスホロチオエート修飾を有するスプリント核酸を使用した（配列番号２０８、＋Ｃ＊ｇ＊＋ｔｇ＋ａｃ＋ｃａ＋ｃｃ＋ｃｔ＋ｇａ＋ｃＡ＋ＴＡ＋ＣＧＧＣＧＴＧＣＡｇｔｇｃｔｔＡＣＧＣＣＡ＋ＣＡ＋ＡＴ＋ＡＣ＋ＣＧ＋ＣＡ＋Ｇ＊Ｃ＊＋Ｔ）。「スプリントはＯＭｅである」の下での条件では、ロックド核酸、２’－Ｏ－メチル、及びホスホロチオエート修飾を有するスプリント核酸を使用した（配列番号２０９、ｍＣ＊ｇ＊ｍＵｇｍａｃｍｃａｍｃｃｍｃｔｍｇａｍｃＡｍＵＡｍＣＧＧＣＧＴＧＣＡｇｔｇｃｔｔＡＣＧＣＣＡ＋ＣＡ＋ＡＴ＋ＡＣ＋ＣＧ＋ＣＡ＋Ｇ＊Ｃ＊＋Ｔ）。組み込み核酸及びスプリント核酸を、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（ＩＤＴ）によって合成し、両方のｍＲＮＡを、実施例７に記載される方法を使用して、インビトロ転写反応を介して生成した。ｇＲＮＡは、スペーサー、足場、及びドナー結合部位を含有した。スプリント組み込み核酸は、ガイド結合部位及びフラップ結合部位を含有した。ライゲーション組み込み核酸及びスプリント核酸は、部分的に相補的であった。組み込み核酸及びスプリント核酸を、アニーリング反応を使用してハイブリダイズし、次いでガイドＲＮＡ及びｍＲＮＡと混合し、９６ウェルプレート中の付着性ＨＥＫ２９３細胞に送達する前に、ＯｐｔｉＭＥＭ中のリポフェクタミン２０００で製剤化した。２４～４８時間後、細胞を０．０５％のトリプシン－ＥＤＴＡで分離し、フローサイトメーターを通して実行して、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現する細胞のパーセンテージを測定し、ＢＦＰからＧＦＰへの遺伝子編集を示した（図１２）。この例は、スプリントがＬＮＡ塩基を有する場合、メチル化されたＤＮＡを組み込み核酸に使用することができ、理想的な条件下で編集効率に悪影響を及ぼさないことを示す。スプリントがＬＮＡの代わりにＯＭｅ塩基を有し、したがってドナーへの親和性が低い場合、ドナー内のメチル化ＤＮＡは効率を高め、ＤＮＡメチル化が核酸構成要素を安定させることによってシステムを改善することができることを示す。メチル化ドナーを使用して、プロモーターなどの機能的エピジェネティック部位でゲノムにＤＮＡメチル化を特異的に導入し、遺伝子発現を調節することもできる。フォローアップ実験は、リプレーサーがメチル化ＤＮＡを導入しているゲノム領域で亜硫酸水素塩配列決定を行い、エピジェネティック編集が行われたことを確認することによって実施することができる。リプレーサーがこのゲノム領域にＤＮＡメチル化を正常に導入し、その領域のメチル化状態が遺伝子発現を制御すると考えられる場合、定量的ＰＣＲを実施して、目的の遺伝子が編集後にｍＲＮＡ発現を低減したことを確認することができる。

【０２５８】

本発明の好適な実施形態が本明細書に示され記載されたが、そのような実施形態は、ほんの一例として提供されることが当業者に自明であろう。本発明が、本明細書内に提供される特定の例によって限定されることを意図するものではない。本発明は、前述の明細書に関して説明されてきたが、本明細書における実施形態の説明及び例示は、限定的な意味で解釈されることを意図するものではない。ここで、当業者は、多数の変化形、変更、及び置換を本発明から逸脱することなく想定するであろう。更に、本発明の全ての態様は、様々な条件及び変数に依存する、本明細書に記載される特定の描写、構成、または相対的な割合に限定されないことが理解されるであろう。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する種々の代替手段が、本発明の実施において採用され得ることを理解されたい。

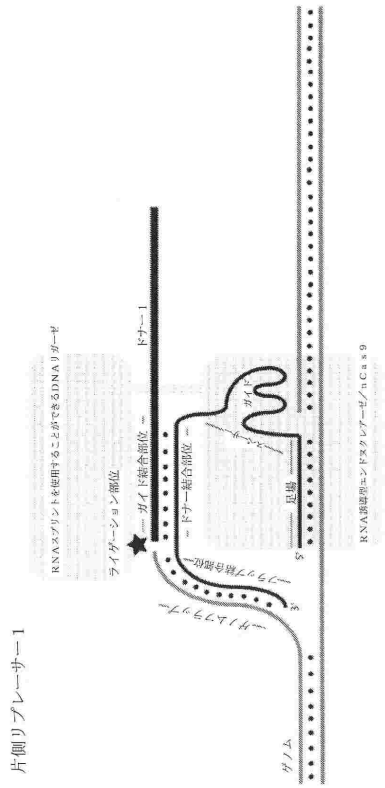
したがって、本発明はまた、任意のそのような代替物、修飾物、変化形、または均等物を網羅することが企図される。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲に含まれる方法及び構造、ならびにそれらの等価物が、それにより包含されることが意図される。

【０２５９】

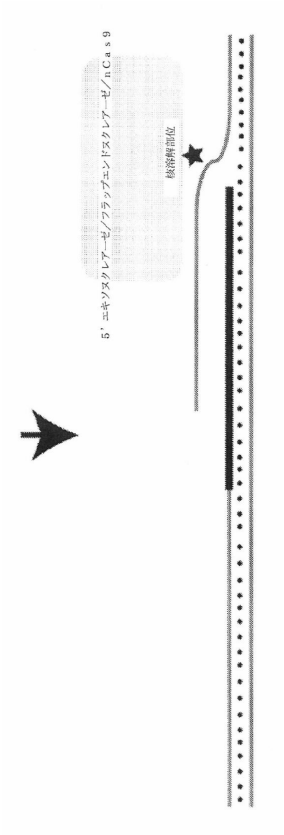
前述の開示は、明瞭さ及び理解を目的としてある程度詳細に記載されているが、本開示の読書から、本開示の真の範囲から逸脱することなく、形態及び詳細における様々な変更を行うことができることが当業者には明らかであろう。例えば、上記の全ての技法及び装置は、様々な組み合わせで使用することができる。本出願で引用される全ての刊行物、特許、特許出願、及び／または他の文書は、あたかも各個々の刊行物、特許、特許出願、及び／または他の文書が、全ての目的のために参照により組み込まれることが個別に示されるのと同じ程度に、全ての目的のために参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【図面】

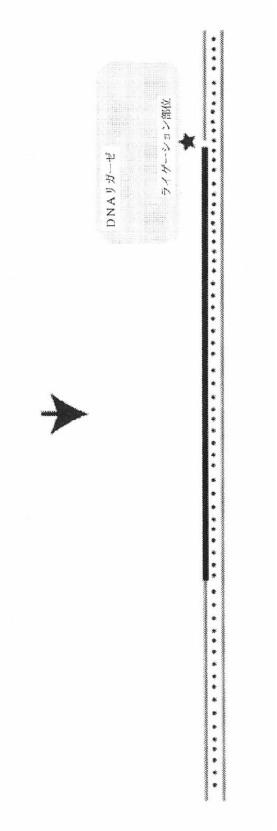
【図１Ａ】



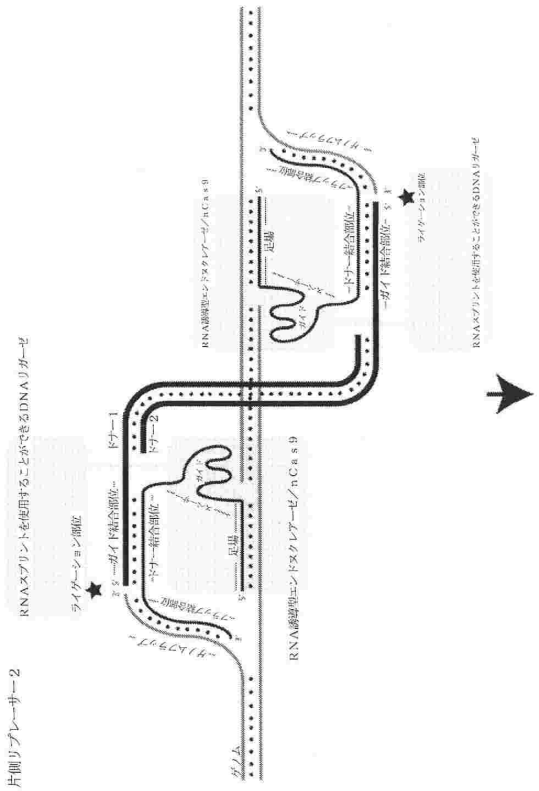
【図１Ｂ】



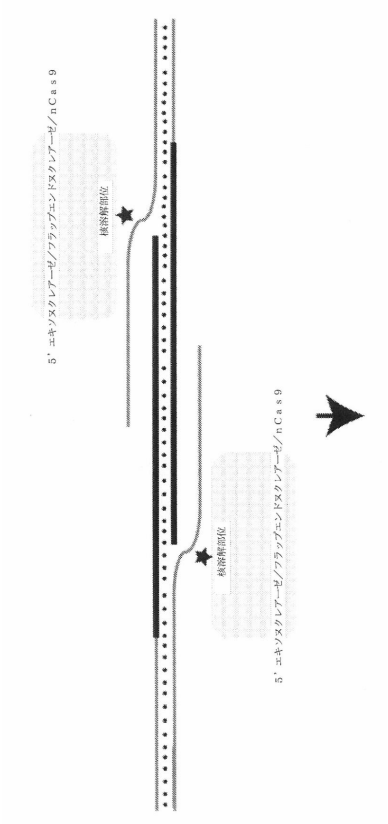
【図１Ｃ】



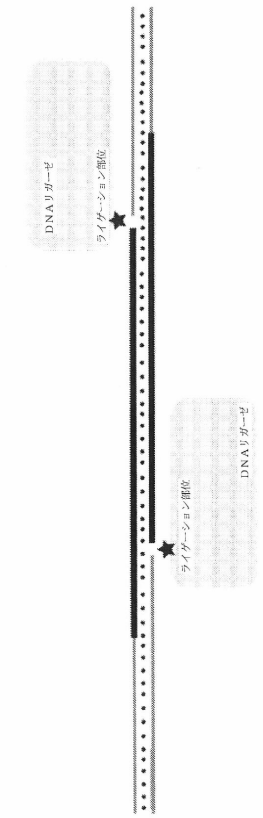
【図２Ａ】



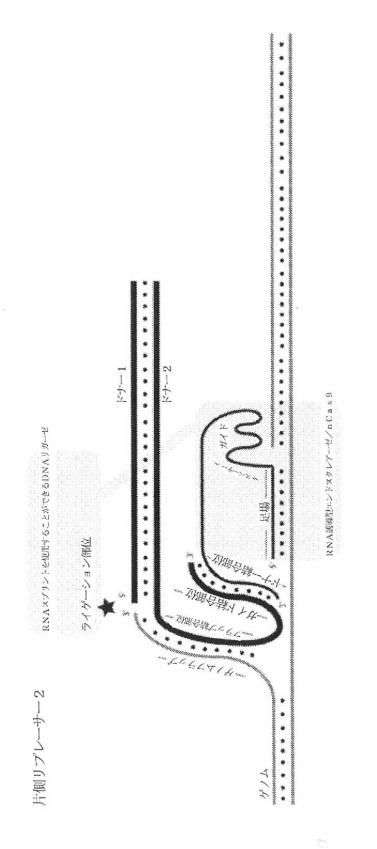
【図２Ｂ】



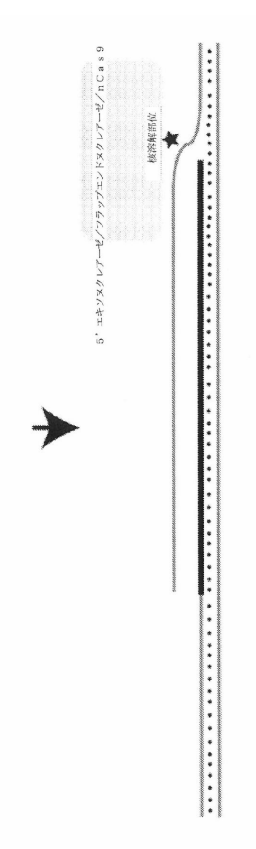
【図２Ｃ】



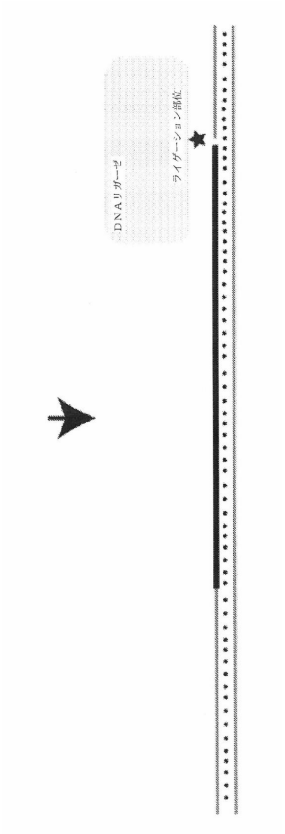
【図３Ａ】



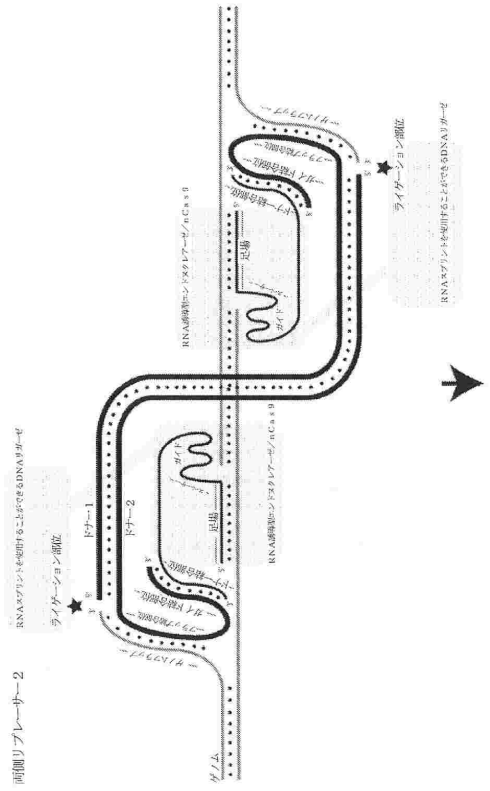
【図３Ｂ】



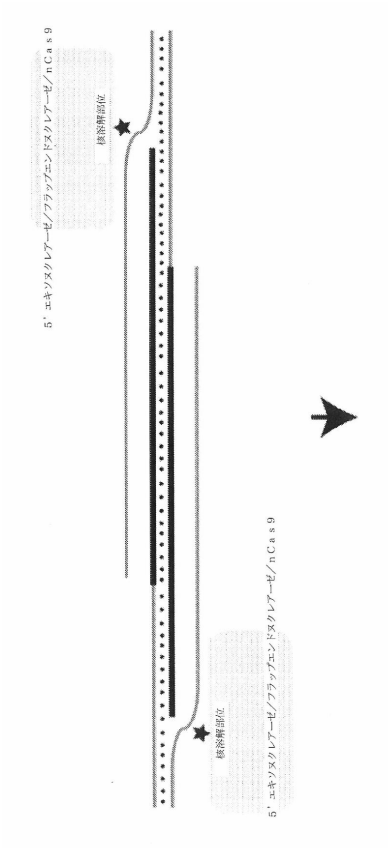
【図３Ｃ】



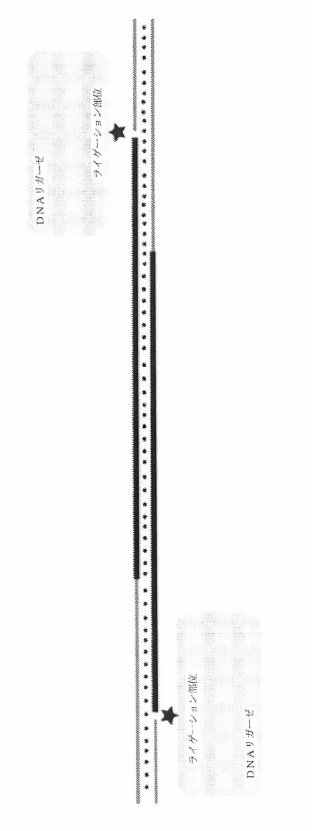
【図４Ａ】



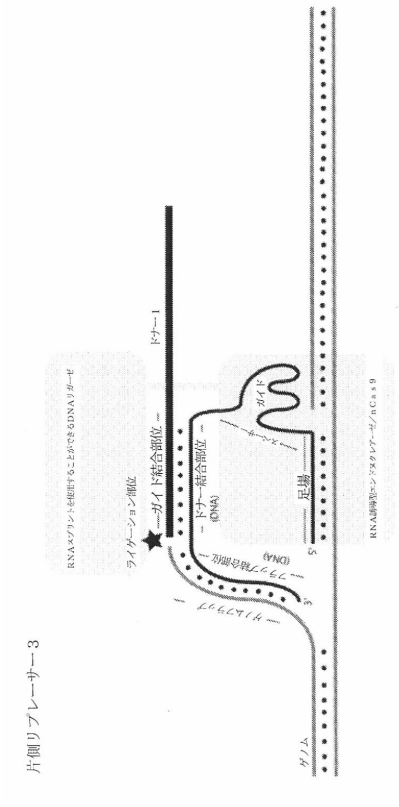
【図４Ｂ】



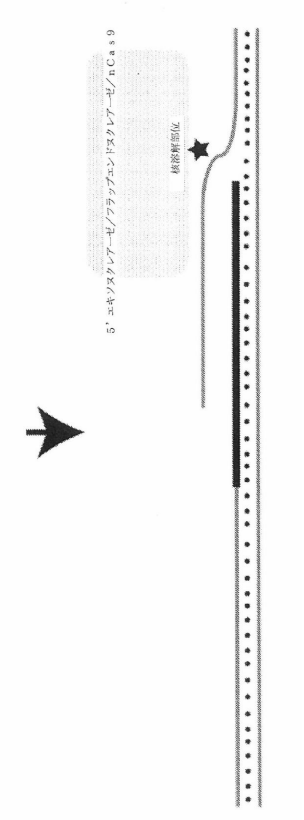
【図４Ｃ】



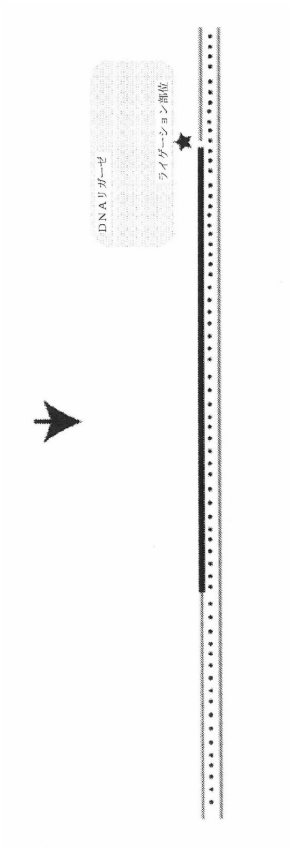
【図５Ａ】



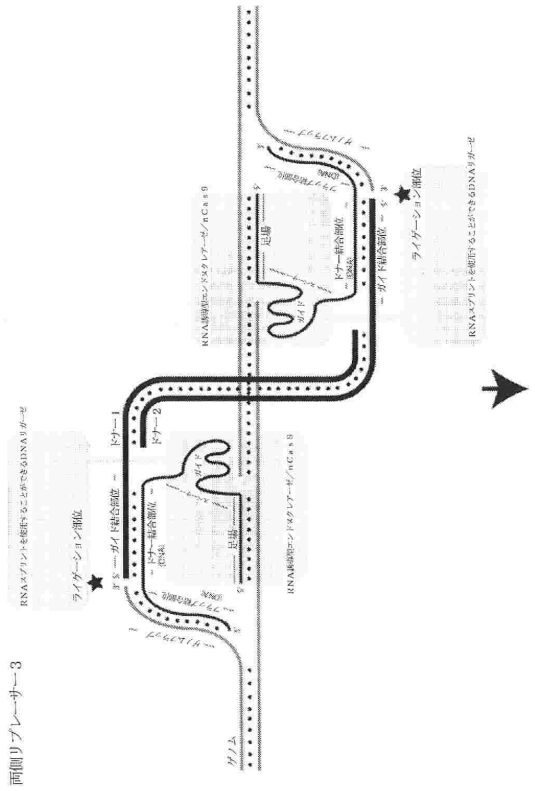
【図５Ｂ】



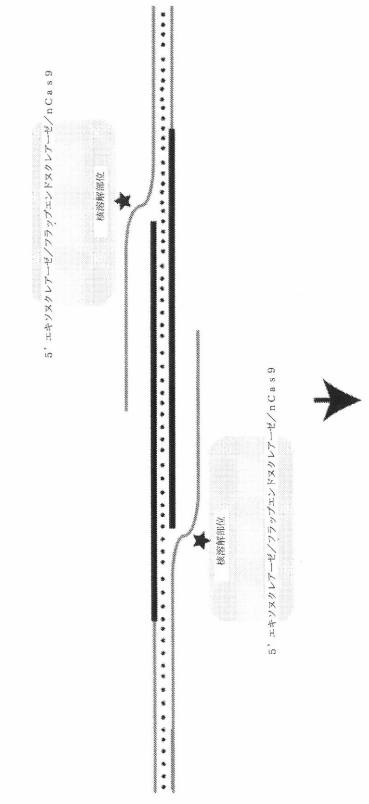
【図５Ｃ】



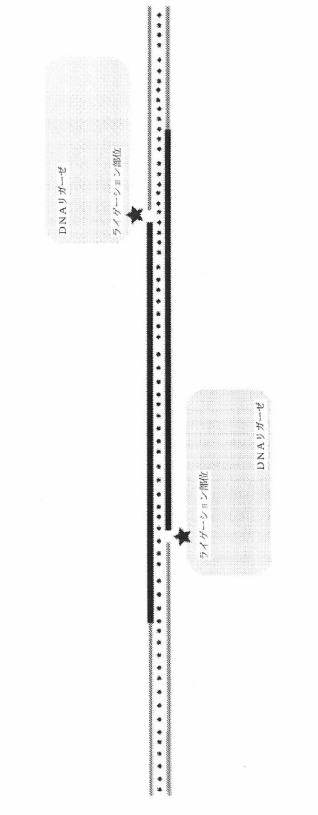
【図６Ａ】



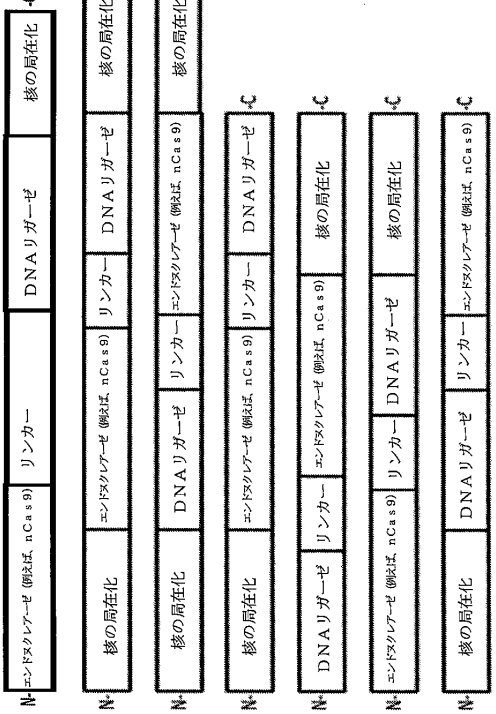
【図６Ｂ】



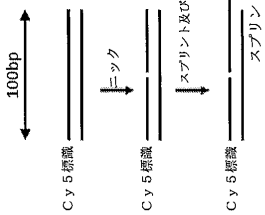
【図６Ｃ】



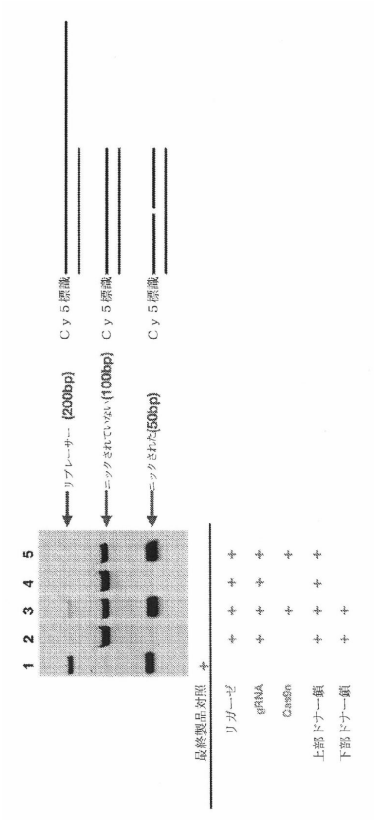
【図７】



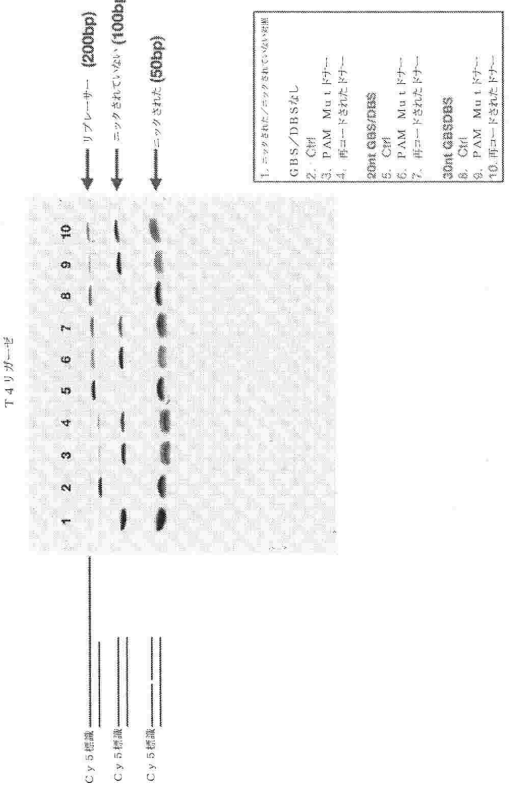
【図８Ａ】



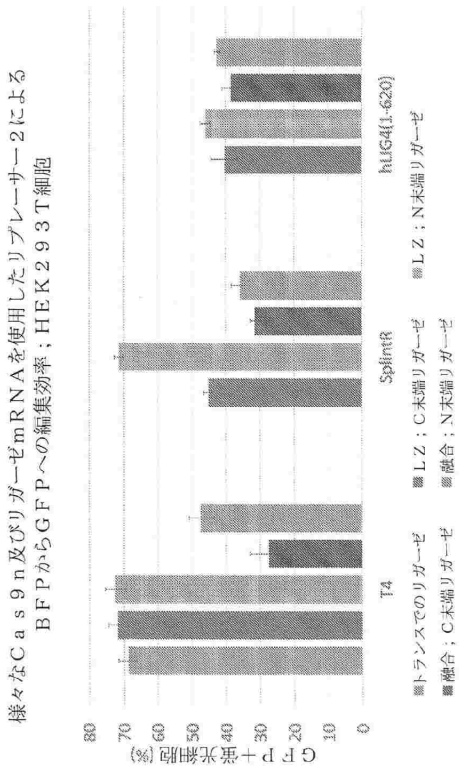
【図８Ｂ】



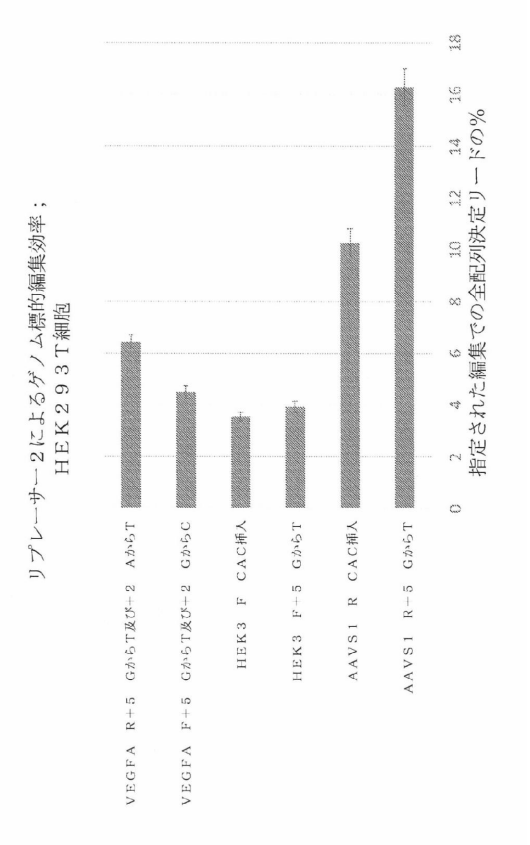
【図８Ｃ】



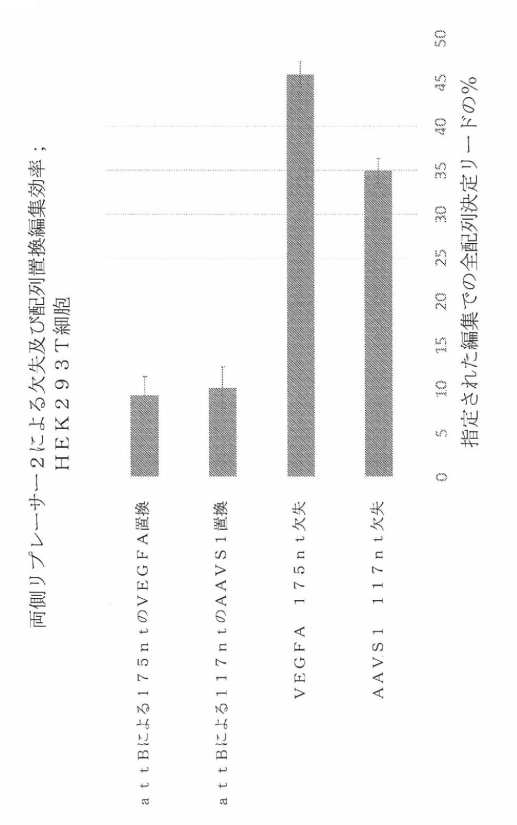
【図９】



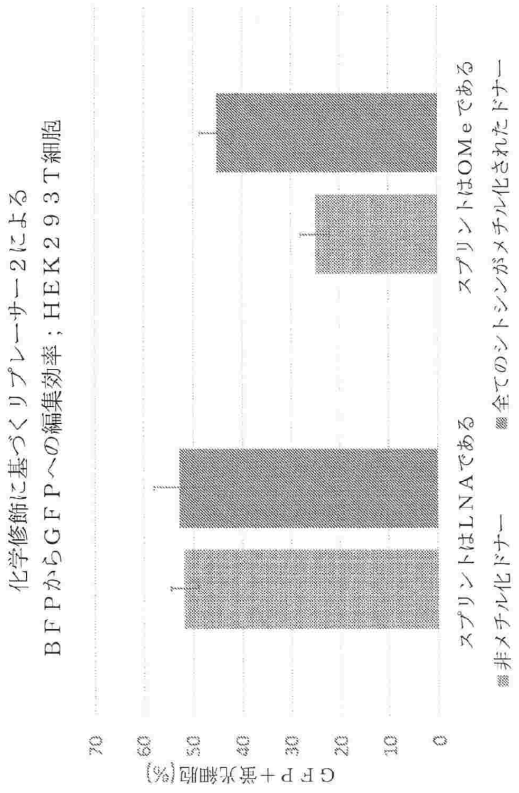
【図１０】



【図１１】



【図１２】



【配列表】
20245434810000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/79567

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C12Q 1/6844, C12N 15/66 (2023.01)
ADD. C12N 15/10, C12N 15/64 (2023.01)
CPC - INV. C12Q 1/6844, C12N 15/66
ADD. C12N 15/1031
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic 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 2019/0330659 A1 (ZYMERGEN INC.) 31 October 2019 (31.10.2019) para [0008]; [0027]; [0031]; [0036]; [0071]; [0109]; [0112]; [0128]; [0130]; [0135]; [0137]; [0167];	1-6, 16-17, (18-22, 25-26)/(1-6, 16-17), 27/(1-6, 16), 28/(1-6) --- 7-15, (18-22)/(7-15), 23-24, (25-28)/(7-15)
Y	WO 2021/188840 A1 (REWRITE THERAPEUTICS, INC.) 23 September 2021 (23.09.2021) [0019]; [0020]; [0021]; [0218]	7-13, (18-28)/(7-13)
Y	US 2020/0377564 A1 (TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY) 03 December 2020 (03.12.2020) para [0248]	14-15, (18-28)/(14-15)
Y	WO 2021/127238 A1 (AGILENT TECHNOLOGIES, INC.) 24 June 2021 (24.06.2021) para [0009]; [0043]; [0093]	23-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 January 2023	MAR 22 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Karl Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/79567

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed.

   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/79567

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.:
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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-28, directed to a system comprising a cell containing an endonuclease, a DNA ligase or fusion protein thereof, and an integrating nucleic acid.

Group II, claims 29-42, directed to a system of nucleic acids.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

---- See Extra Pages ----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-28

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/79567

--continued from: Box No. III Observations where unity of invention is lacking--

Special technical features:

Group I has the special technical feature of a fusion protein or non-covalently linked proteins comprising an endonuclease and a DNA ligase, that is not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a system of nucleic acids, that is not required by Group I. Group II further requires a flap binding site, not required by Group I.

Common technical features:

Groups I-II share the common technical feature of:
a. a guide nucleic acid comprising:
i. a spacer complementary to a region of a genomic locus of a genomic strand,
ii. a scaffold for complexing with an endonuclease;
b. an integrating nucleic acid comprising a 5' end to be ligated to a 3' terminus of the genomic strand generated by the endonuclease.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is made obvious by WO 2021/188840 A1 to Rewrite Therapeutics, Inc. (hereinafter 'Rewrite'), in view of US 2019/0330659 A1 to Zymergen Inc. (hereinafter 'Zymergen').

Rewrite teaches a system of nucleic acids comprising:
a. a guide nucleic acid comprising:
i. a spacer complementary to a region of a genomic locus of a genomic strand,
ii. a scaffold for complexing with an endonuclease (para [0021] - "In various aspects, the present disclosure provides a guide nucleic acid comprising: a spacer reverse complementary to a first region of a target nucleic acid, a scaffold configured to bind to a Cas nickase"),
iii. an optional donor binding site that is at least partially complementary to an integrating nucleic acid, and
iv. a flap binding site that is at least partially identical or complementary to a genomic flap at or adjacent to the genomic locus (para [0044] - "A first strand primer binding site of the gRNA hybridizes to a flap 5' of the nick"), but does not explicitly teach b. an integrating nucleic acid comprising a 5' end to be ligated to a 3' terminus of the genomic strand generated by the endonuclease.

Zymergen teaches genome editing using a system, comprising:
an endonuclease coupled to a DNA ligase (para [0128] - "In some embodiments, the present disclosure teaches fusing a Cpf1 or other CRISPR polypeptide with a polypeptide with ligase activity"); and comprising an integrating nucleic acid comprising a 5' end to be ligated to a 3' terminus of the genomic strand generated by the endonuclease (para [0031] - " the in vivo CLIC method may also comprise a fourth insert polynucleotide, wherein said insert polynucleotide is also cleaved by the Cpf1 endonuclease, thereby creating sticky ends on the insert polynucleotide that are compatible with the sticky ends of the cell's genome; wherein the annealing step (b) is modified to anneal the sticky ends of the genome to the sticky ends of the insert polynucleotide; and wherein the ligating step (c) is modified to ligate the annealed genome and insert sticky ends"). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to apply the nucleic acid taught by Zymergen to the system taught by Rewrite in order to integrate a nucleic acid into a target sequence in a scarless manner.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I-II inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)国際特許分類　　ＦＩ
　　Ｃ１２Ｎ　15/52　　Ｚ

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　服部 博信
(74)代理人　100123766
弁理士　松田 七重
(72)発明者　ハルペリン シャケド オマー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４６０８ エメリーヴィル パウエル ストリート １２５０ アパートメント ４
(72)発明者　チッカリング マイケル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４６０８ エメリーヴィル パウエル ストリート １２５０ アパートメント ４
(72)発明者　グレワル パルビール
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４６０８ エメリーヴィル パウエル ストリート １２５０ アパートメント ４
(72)発明者　チャヴェス レオナルド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４６０８ エメリーヴィル パウエル ストリート １２５０ アパートメント ４