

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-543001

(P2024-543001A)

(43)公表日 令和6年11月19日(2024.11.19)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 7
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全106頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-525372(P2024-525372)			(71)出願人	514232085
(86)(22)出願日	令和4年10月26日(2022.10.26)				ユーシービー バイオファルマ エスアー
(85)翻訳文提出日	令和6年6月11日(2024.6.11)				ルエル
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/080020				ベルギー国 1 0 7 0 ブリュッセル アレ
(87)国際公開番号	WO2023/073071				デ ラ レシエルシエ 6 0
(87)国際公開日	令和5年5月4日(2023.5.4)			(74)代理人	110000855
(31)優先権主張番号	63/263,175				弁理士法人浅村特許事務所
(32)優先日	令和3年10月28日(2021.10.28)			(72)発明者	ロドリゲス アルバレス、ナタリア
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				英国 エスエル1 3ダブリュイー バ
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く			(72)発明者	シベキー、シツラ
					英国 エスエル1 3ダブリュイー バ
					ークシャー、スラウ、バス ロード 2 0
					8、ユーシービー、アイビーディー 気付
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸構築物、ウイルスベクターおよびウイルス粒子

(57)【要約】

本発明は、シンタキシン結合タンパク質1 (S T X B P 1、M u n c - 1 8) をコードする導入遺伝子を含む核酸構築物、ウイルス粒子に該核酸をパッケージングするためのウイルスベクター、および S T X B P 1 機能活性の喪失に関連する疾患を治療するためのそのようなウイルス粒子の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

i. それぞれ配列番号 9、10、11、12、13、14、15 もしくは 16 に示される配列を有するアイソフォーム a、b、c、d、e、f、g もしくは h を含むシタキシ結合タンパク質 1 (STXB P 1)、または

ii. 配列番号 9、10、11、12、13、14、15 もしくは 16 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有し、STXB P 1 としての機能を保持する配列、または

iii. 配列番号 9 を参照して、表 7 に示される 1 つ以上の変異を含む天然変異体をコードする導入遺伝子を含む核酸構築物。

【請求項 2】

10

前記導入遺伝子が、

i. それぞれ配列番号 22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32 もしくは 33 に示される配列を有する STXB P 1 転写物変異体 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 もしくは 12、または

ii. 配列番号 22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32 もしくは 33 に対して少なくとも 95% もしくは 96% もしくは 97% もしくは 98% もしくは 99% もしくは 99.5% の配列同一性を有する配列、

をコードする、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 3】

前記導入遺伝子が、STXB P 1 アイソフォーム a をコードし、配列番号 7 の cDNA 配列、または配列番号 7 に対して少なくとも 95% もしくは 96% もしくは 97% もしくは 98% もしくは 99% もしくは 99.5% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 に記載の核酸構築物。

20

【請求項 4】

前記導入遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターをさらに含み、前記プロモーターが、

i. 配列番号 1 の CAG 1.6 kb プロモーター、または

ii. 配列番号 2 の hSYN プロモーター、または

iii. 配列番号 3 の MECP2 プロモーター、または

iv. 配列番号 4 の hNSE プロモーター、または

30

v. 配列番号 5 の CamKII プロモーター、または

vi. 配列番号 6 の内因性 hSTXB P 1 プロモーター、または

vii. 配列番号 37 の MECP2 イントロンに 5' から 3' 方向に作動可能に連結された、配列番号 3 の MECP2 プロモーター、

を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 5】

配列番号 8 の SV40 ポリアデニル化シグナル配列を含む、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 6】

請求項 1～5 のいずれか一項に記載の核酸構築物を含むウイルスベクターであって、前記核酸構築物の 5' および／または 3' フランク (flank) に逆方向末端反復 (ITR) をさらに含むウイルスベクター。

40

【請求項 7】

前記 5' ITR および／または前記 3' ITR が、天然のアデノ随伴ウイルス (AAV) の ITR を含む、請求項 6 に記載のウイルスベクター。

【請求項 8】

前記 3' ITR が配列番号 18 を含み、および／または前記 5' ITR が配列番号 19 を含む、請求項 6 または請求項 7 に記載のウイルスベクター。

【請求項 9】

請求項 1～5 のいずれか一項に記載の核酸構築物または請求項 6～8 のいずれか一項に

50

記載のウイルスベクターを含むウイルス粒子。

【請求項 10】

AAV2、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV10、AAVttまたはそれらの組合せからなる群から選択されるAAV由来のVP1カプシドタンパク質を含む、請求項9に記載のウイルス粒子。

【請求項 11】

前記カプシドタンパク質が、AAVttまたはAAV9に由来し、それぞれ配列番号20もしくは21、または配列番号20もしくは21に対して少なくとも98.5%もしくは99%もしくは99.5%の配列同一性を有する配列を含む、請求項10に記載のウイルス粒子。

10

【請求項 12】

治療に使用するための、請求項9～11のいずれか一項に記載のウイルス粒子。

【請求項 13】

重症早期発症てんかん性脳症に関連するSTXB P1遺伝性障害の治療および／または予防における、請求項12に記載の使用のためのウイルス粒子。

【請求項 14】

大田原症候群、ウエスト症候群またはドラベ症候群の治療における、請求項12または請求項13に記載の使用のためのウイルス粒子。

【請求項 15】

STXB P1機能活性の喪失を特徴とする疾患を治療および／または予防する方法であって、それを必要とする対象に、請求項9～11のいずれか一項に記載のウイルス粒子を投与することを含む方法。

20

【請求項 16】

前記疾患が、病理学的STXB P1変異体をもたらす、患者における少なくとも1つの変異に関連し、前記病理学的STXB P1変異体が、配列番号9を参照して、表5および／または表6に示される変異、または変異の組合せを含む、請求項15に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば、てんかんに関連する神経発達障害、例えば、大田原症候群、ウエスト症候群およびドラベ症候群で同定される、シンタキシン結合タンパク質1（STXB P1）機能活性の喪失に関連する疾患の治療および／または予防に使用するための核酸構築物、ウイルスベクターおよびウイルス粒子に関する。

30

【背景技術】

【0002】

多くの神経発達障害は、人生の早い時期に重度の臨床症状の発現をもたらす遺伝子変化に関連している。STXB P1の遺伝子変化は、大田原症候群、ウエスト症候群およびドラベ症候群などの重度の早期発症てんかん性脳症（EOEE）に関連する（Saitset al. 2008, Stamberger et al. 2016）。STXB P1脳症（STXB P1-E）は、広範囲の症状を特徴とするが、いずれの患者も深刻な知的障害を有し、患者の最大85%が発作を発症することが現在確立されている（Abramov et al. 2020）。STXB P1-Eは、STXB P1（Munc-18）遺伝子における優性のヘテロ接合性のデノボ変異によって引き起こされ得る。ミスセンス、ナンセンス、フレームシフト、欠失、重複およびスプライス部位変異体を含む複数の遺伝的変異体が報告されている。ほとんどの場合が、典型的にはデノボでヘテロ接合性の機能喪失（LoF）変異によって引き起こされるが、まれにヘテロ接合性またはモザイク性の親から遺伝する。STXB P1のホモ接合性変異をもたらす新たな変異体が記載されている。遺伝子型－表現型相関試験では、変異型と現在までのSTXB P1-Eの様々な発現との間の明確な関連が同定されるには至らなかった。

40

【0003】

50

STXB P1 (Munc-18; シンタキシン結合タンパク質1) は、ニューロンおよび神経内分泌細胞内のSNARE媒介 (N-エチルマレイミド感受性因子付着タンパク質受容体) 膜融合を制御する分子機構の必須成分である。STXB P1は、シナプス小胞の融合とシナプスでの神経伝達物質放出とを促進するプロセスである、シンタキシン-1の閉構造に結合することによってSNARE複合体の形成を調節する。

【0004】

図1は、正常条件 (A) および疾患条件 (B) 下でのシナプス伝達に対するSTXB P1の影響の概略図を示す。STXB P1 (Munc18) は、シナプス機構の主要な構成要素であり、シナプス前膜でのシンタキシン-1との相互作用は、神経伝達物質放出を引き起こすための重要な工程である。正常条件 (A) 下では、STXB P1はシナプス前膜で多量に発現され、シンタキシン-1との複合体形成は、神経伝達物質放出とシナプス後電流の生成とをもたらす効率的なシナプス小胞融合を確実にする。疾患条件 (B) 下では、変異STXB P1はシンタキシン-1を発現しないかまたはシンタキシン-1に直接結合することができず、残りの正常なSTXB P1レベルは効率的な神経伝達物質放出を維持するのに十分ではなく、シナプス後電流が減少する [Patzke et al. 2015]。

【0005】

STXB P1ノックアウト (KO) 試験では、ニューロンに該タンパク質が存在しないことが、発症の間中、シナプス小胞からの神経伝達物質分泌の完全な喪失をもたらすことが実証された (Verhage et al. 2000)。STXB P1のヘテロ接合性KOモデル (HET) の特性評価では、STXB P1タンパク質レベルの約50%の低下が、ミオクローヌス発作および棘徐波発射を特徴とする強い発作表現型をもたらすことが示された (Kovacevic et al. 2018, Orock et al. 2018, Chen et al. 2020)。そのようなHETマウスの広範囲の表現型決定ではまた、認知能力、多動および不安様行動の障害が示された。GABA作動性ニューロンのみにヘテロ接合性発現を有するマウスの作製では、GABA作動性介在ニューロンからグルタミン酸作動性錐体ニューロンへのシナプス伝達の差を強調することによって、STXB P1変異の機構へのさらなる洞察が提供された (Chen et al. 2020)。

【0006】

STXB P1 HETマウスニューロンは正常なシナプス伝達を示すが、さらに詳細な分析では、STXB P1のレベルが低下すると、グルタミン酸作動性シナプス、GABA作動性シナプスおよび神経筋シナプスでの強い刺激中にシナプス抑圧が増加することが示された (Toonen et al. 2006)。幹細胞由来のヒトニューロンを用いた実験では、STXB P1レベルの20~30%の低下が、正常なシナプス機能の劇的な低下をもたらすことが示され (Patzke et al. 2015)、STXB P1変異の影響がニューロンのサブタイプと種の背景との間で変動し得ることがさらに強調された。対照的に、正常マウスニューロン内のSTXB P1の過剰発現はシナプス機能を増加させ (Toonen et al. 2006)、脳内にタンパク質アイソフォームmunc18-1aを過剰発現するトランスジェニックマウス系統の表現型分析では、いくつかの統合失調症関連行動が示された (Urigen et al. 2013)。STXB P1に関して追加の非シナプスの役割が記載されており、皮質ニューロンの放射状移動の機構を調節することが示唆されている。したがって、STXB P1はまた、原形質膜での小胞融合を調節して、細胞表面に様々なタンパク質を分布させ、小胞輸送をゴルジから原形質膜に分配し得る (Hamada et al. 2016)。

【0007】

機能活性の喪失をもたらすSTXB P1の変異は、ニューロン機能への影響を確立するためにインビトロおよびモデル系で特性評価されている。一般にナンセンス、フレームシフトまたは欠失に関連する、STXB P1タンパク質の切断をもたらす変異は、ニューロン系では検出されず、そのような変異タンパク質は、それらのRNAメッセンジャーのナ

10

20

30

40

50

ンセンス媒介崩壊機構によって迅速にダウンレギュレートされると仮定される。STXB P 1の変異の約40～50%はミスセンス変異であり(Abramov et al. 2020)、インビトロ実験では、そのような点変異がSTXB P 1タンパク質の安定性の低下をもたらし、ニューロン系における発現レベルの低下をもたらすことが実証された(Kovacevik et al. 2018, Zhu et al. 2020)。STXB P 1ミスセンス変異を有する大田原患者由来の幹細胞由来ニューロンの試験ではまた、STXB P 1タンパク質レベルの低下が示された(Yamashita et al. 2016)。さらに近年では、ホモ接合性STXB P 1変異が同定され、インビトロ試験では、ホモ接合性L446F変異が機能獲得型表現型を引き起こすが、ヘテロ接合性変異について以前に報告されたよりもタンパク質レベルに対する影響が少ないことが示された(Lammer tse et al. 2020)。

10

【0008】

全体として、STXB P 1遺伝性障害は、STXB P 1タンパク質の機能喪失に関連しており、変異形態の凝集を防止するための小分子シャペロン、およびSTXB P 1発現を負に調節する特異的miRNAをダウンレギュレートするためのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む複数の治療手法が提案されている(Abramov et al. 2020)。STXB P 1のための疾患改変療法を開発するための複雑さは、正常なSTXB P 1機能活性を回復させることができ、臨床に移行させることができる新しい特定のツールを開発することにある。根底にある疾患機序に対処する承認された薬物療法は、この時点で利用可能ではない。

20

【0009】

STXB P 1遺伝性障害の効果的な治療に対する明らかな満たされていない医学的必要性がある。本開示は、STXB P 1を過剰発現させて正常なSTXB P 1機能活性を回復させ、治癒させる可能性を有する疾患改変遺伝子療法を提供する。

【発明の概要】

【0010】

本発明は、遺伝子療法によって、STXB P 1変異の影響を補正し、正常なSTXB P 1機能活性を回復させることができる、STXB P 1遺伝子の健常なコピーを提供する。

【0011】

本発明は、以下を提供する：

30

i. それぞれ配列番号9、10、11、12、13、14、15もしくは16に示される配列を有するアイソフォームa、b、c、d、e、f、gもしくはhを含むシタキシン結合タンパク質1(STXB P 1)、または

ii. 配列番号9、10、11、12、13、14、15もしくは16に対して少なくとも95%もしくは96%もしくは97%もしくは98%もしくは99.5%の配列同一性を有し、STXB P 1としての機能を保持する配列、または

iii. 配列番号9を参照して、表7に示される1つ以上の変異を含む天然変異体をコードする導入遺伝子を含む核酸構築物。

【0012】

本発明は、以下をさらに提供する：

40

・核酸構築物を含むウイルスベクター。

・ウイルスベクターを含むウイルス粒子。

・STXB P 1遺伝性障害を治療および／または予防するためのウイルス粒子の医学的使用。

・STXB P 1変異を特徴とする疾患を治療および／または予防する方法であって、それを必要とする対象にウイルス粒子を投与することを含む方法。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】正常条件(A)および疾患条件(B)下でのシナプス伝達に対するSTXB P 1の影響の概略図。STXB P 1(Munc18)は、シナプス機構の主要な構成要素であ

50

り、シナプス前膜でのシンタキシン-1とその相互作用は、神経伝達物質放出を引き起こすための重要な工程である。正常条件（A）下では、STXB P1はシナプス前膜で多量に発現され、シンタキシン-1との複合体形成は、神経伝達物質放出とシナプス後電流の生成とをもたらす効率的なシナプス小胞融合を確実にする。疾患条件（B）下では、変異STXB P1はシンタキシン-1を発現しないかまたはシンタキシン-1に直接結合することができず、残りの正常なSTXB P1レベルは効率的な神経伝達物質放出を維持するのに十分ではなく、シナプス後電流が減少する [Patzke et al., 2015]。

【図2】ヒト、サルおよびマウスのSTXB P1配列（配列番号9によるヒトアイソフォームa）のタンパク質配列アライメント。アライメントは、種全体にわたって高い配列相

10

同性を示す。サルおよびマウスのアミノ酸配列は、ヒトのアミノ酸配列と同一である。

【図3】設計した構築物の概略図。図では、「prom」はプロモーターを意味し、「INT」はイントロンを意味し、「h」はヒトを意味し、SV40はポリアデニル化配列SV40を意味し、「タグ」は、構築物のN末端またはC末端のいずれかに位置するHAタグまたはMycタグを意味する。

【図4】（A）抗STXB P1抗体によって検出された、様々なプロモーター（CAG、MECP2およびMECP2-イントロン）によって駆動されるhSTXB P1プラスミドによってトランスフェクトされたAD-HEK293細胞の免疫蛍光イメージング。（B）拡大部分は、STXB P1が細胞膜に局在していることを示す。AD=接着、NC=陰性対照。

20

【図5】（A）抗STXB P1抗体によって検出された、様々なプロモーター（CAG、MECP2およびMECP2-イントロン）によって駆動されるhSTXB P1プラスミドによってトランスフェクトされたNeuro-2A細胞の免疫蛍光イメージング。（B）拡大は、STXB P1が細胞膜に局在していることを示す。NC=陰性対照。

【図6】様々なプロモーター（CAG、MECP2およびMECP2-イントロン）によって駆動されるhSTXB P1によってトランスフェクトされたNeuro-2A細胞のウェスタンブロット分析。各条件の2つの技術的複製物が示されている。NC=陰性対照、1=MECP2-イントロン-hSTXB P1、2=CAG-hSTXB P1、3=MECP2-hSTXB P1。

【図7】（A）抗Myc抗体によって検出された、AD-HEK293細胞におけるCAGプロモーターによって駆動されるMycタグ付きhSTXB P1ならびに（B）抗HA抗体によって検出された、AD-HEK293細胞、SH-SY5Y細胞およびNeuro-2a細胞におけるhSYNプロモーターによって駆動されるHAタグ付きhSTXB P1のウェスタンブロット分析。各条件の2つの技術的複製物が示されている。（C）抗STXB P1抗体を使用して、AD-HEK293細胞内でエピトプタグ付きタンパク質も検出した。NC=陰性対照、1=CAG-hSTXB P1-Myc、2=CAG-Myc-hSTXB P1、3=hSYN-HA-hSTXB P1。（A）のNCレーンにおけるバックグラウンドタンパク質バンドは、抗Myc抗体による内因性Mycの検出に起因する。

30

【図8】iPSC由来グルタミン酸作動性ニューロンにおけるSTXB P1カセットのレンチウイルスベクター形質導入。画像は、対照条件下（非形質導入）、およびhSynまたはMECP2プロモーターの制御下でのカセットの形質導入後のSTXB P1発現の代表的な写真を示す。

40

【図9】マウス一次ニューロンにおけるSTXB P1のAAV9形質導入。（A）MOI 5.0E+5 G/C細胞でAAV9ウイルスベクターを形質導入した一次マウス皮質ニューロンにおけるSTXB P1染色の代表的な画像。写真は、hSyn、MECP2またはMECP2-イントロンプロモーターの制御下での対照条件（非形質導入）およびSTXB P1発現を示す。（B）同じ一次マウス皮質ニューロンにおけるHA染色（右）とSTXB P1染色（左）との比較。

【図10】MAP2陽性ニューロンにおけるSTXB P1過剰発現の共局在。画像は、A

50

AAV9ウイルスベクターの形質導入後のマウス一次ニューロンにおける抗HAタグ染色（左パネル）および抗MAP2染色（右パネル）の代表的な写真である。矢印は、STXB P1（HA）およびニューロンマーカー（MAP2）を発現する細胞の例を示す。

【図11】ウイルスベクターDNAコピー分析。AAV処置後の5週齢マウスの左海馬および左前頭皮質由来の二倍体マウスゲノムの数によって正規化されたSV40pAのqPCRデータ（シミアンウイルス40のポリAシグナル）。ビヒクル群および4つのAAV9形質導入群（対照ウイルス、hSyn、MECP2、MECP2-イントロン）についてデータを示す。結果を平均±SDとして示す。

【図12】STXB P1 mRNA発現分析。データは、2つの参照遺伝子に対して正規化され、全群の平均発現（平均±SD）にスケールされた相対発現として表している。AAV処置後の5週齢マウスの左海馬および左前頭皮質の組織から分析を行った。ビヒクル群および4つのAAV9形質導入群（対照ウイルス、hSyn、MECP2、MECP2-イントロン）についてデータを示す。

【図13】ウエスタンブロットによるタンパク質分析。（A）皮質における様々なカセットに関するHAタグ発現を示すウエスタンブロット（n=5~7/群）。GAPDHをローディング対照として使用した。（B）HAタグバンド強度の定量、各試料をGAPDHローディング対照に対して正規化する。結果を平均±SDとして示す。

【図14】AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLSウイルス由来のGFPレポーターを使用した、マウス脳における感染細胞の分布。（A）AAV9-hSyn1-NLS-GFP-NLS i c vを投与し、1ヶ月後に殺処分し、免疫染色してGFPを標識したマウス脳の矢状切片。GFPを発現する細胞の分布は、脳全体の前部から後部まで観察された。GFP+細胞を示す主な脳領域のいくつかは、長方形によって強調されている。（B~G）：AからのGFP+細胞を示す脳領域の高拡大（矢印はGFP+細胞を指す）。

【図15】AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLSウイルス由来のGFPレポーターを発現する細胞の特性評価。二重免疫蛍光標識を行って、（A~F）GFPおよびニューロンマーカーNeuN、（G~L）GFPおよび星状膠細胞マーカーGFAPを検出した。（A~C）GFPおよび（D~F）NeuNの両方に関する細胞陽性が全脳領域内で観察され（矢印は二重標識細胞を指す）、ニューロンが形質導入され、レポーター遺伝子を発現したことが示された。反対に、GFP（G~I）シグナルはGFAP陽性細胞（J~L）では検出されず、星状膠細胞がレポーター遺伝子を発現していないことが示唆された。

【図16】AAV9投与後のマウス脳における様々なプロモーター由来のHA-STXB P1融合タンパク質の分布。HAに対する免疫組織化学的検査によって、マウスの脳内の様々なプロモーターから過剰発現されたHAタグ付きSTXB P1の分布を試験した。陰性対照条件として、（A）PBSのみまたは（B）AAV9-hSyn-GFPウイルス i c vを投与した動物では、HAシグナルは観察されなかった。（C）抗体選択性の陰性対照（NC）として、AAV9-MECP2-イントロン-HA-STXB P1ウイルスを投与したが免疫組織化学的検査手技中の一次HA抗体を省いた動物では、HAシグナルは観察されなかった。（D~F）様々なプロモーター由来のHA-STXB P1を発現する様々なウイルスを注射した全動物の脳内でHAシグナルが観察された。3つのプロモーターは、脳全体にわたるHA分布の共通のパターンをもたらし、主な発現は、大脳皮質、海馬、線条体、嗅球、黒質、および前脳の繊維路で観察された。プロモーター間のHA分布の顕著な差を表16に報告する。

【図17】AAV9投与後の海馬における様々なプロモーター由来のHA-STXB P1融合タンパク質の分布。二重免疫蛍光標識を行って、（A~C）HA、および（D~F）海馬の異なる部分を同定するために使用したニューロンマーカーNeuNを検出した。3つのプロモーターはいずれも、海馬全体に、主にニューロン投射（Mol、LMolまたはMF）に、時に細胞体にHA発現をもたらした。（F）MECP2-イントロンプロモーターは、他の2つのプロモーターよりも良好なカバレッジおよび高いHAシグナル強度

10

20

30

40

50

をもたらした (D、E)。LMol：海馬の網状層 (lacunosum) 分子層；MF：苔状線維；Mol：歯状回の分子層；Or：多形細胞層。

【図18】様々なプロモーター由来のHA-STXB P1を発現する細胞の特性評価。二重免疫蛍光標識を行って、(A～C) HAおよび (D～F) ニューロンマーカー NeuNを検出した。HAについて陽性であり、脳の異なる領域で時折観察された細胞体は NeuNについても陽性であり、3つのプロモーターがいずれも、ニューロン内で導入遺伝子発現を促進することが裏付けられた。矢印は二重標識細胞を指す。

【図19】qPCRによるマウス脳におけるSTXB P1変異体mRNAレベルの分析。WT (野生型) 同腹子およびHET (ヘテロ接合性) マウスの後部皮質 (caudal cortex) (右半球) 由来の脳組織試料のmRNA分析 ($n=11\sim13$ /群)。(A) 総内因性STXB P1のmRNA発現分析 (あらゆるSTXB P1転写物を認識する共通プローブ)。(B) および (C)：長アイソフォーム (B) または短タンパク質アイソフォーム (C) を特異的に認識する2つの異なるプローブを使用した、STXB P1変異体のmRNA発現分析。データは、 $2^{-\Delta C_t}$ 値を計算することによってmRNA発現レベルとして示しており、ここで、2つの参照遺伝子の平均に対して発現を正規化した。結果を平均±SDとして示す。

【図20】ウエスタンブロットによるマウス脳におけるSTXB P1タンパク質レベルの分析。WT (野生型) 同腹子およびHET (ヘテロ接合性) マウス ($n=11\sim13$ /群) の右前頭 (内側) 皮質由来の組織試料を分析した。(A)：総STXB P1タンパク質発現を表すウエスタンブロット。(B) (A) のそれぞれのウエスタンブロットの定量データ。正規化のために、 β -アクチンをローディング対照として使用した。スケールンク群として「WT」群を使用した。結果を平均±SDとして示す。

【図21】LC-MSによるマウス脳におけるSTXB P1変異体タンパク質レベルの分析。WT (野生型) 同腹子およびHET (ヘテロ接合性) マウス ($n=11\sim13$ /群) の前頭皮質の外側半分由来の組織試料を分析した。(A) 総STXB P1ペプチド対STXB P1長アイソフォーム対STXB P1短アイソフォームの定量。結果を平均±SDとして示す。(B)：STXB P1短アイソフォームおよび長アイソフォームを表すウエスタンブロット。(C)：(B) のそれぞれのウエスタンブロットの組み合わせた定量データ。 β -アクチンをローディング対照として使用した。データは、各STXB P1アイソフォームのバンド強度とそれぞれの β -アクチンバンドとの比として示している。結果を平均±SDとして示す。

【図22】ウエスタンブロットによるマウス脳におけるシンタキシン-1A (STX1A) タンパク質レベルの分析。マウス脳組織試料におけるSTX1Aタンパク質発現の定量 ($n=11\sim13$ /群)。正規化のために、 β -アクチンをローディング対照として使用した。スケールンク群として「WT」群を使用した。結果を平均±SDとして示す。

【図23】qPCRによるマウス脳におけるAAV形質導入効率の分析 (注射7週間後) (A) ビヒクル-PBSを注射したWTマウス (WT)、ビヒクル-PBSを注射したHETマウス (HET)、STXB P1長変異体を注射したHETマウス (HET-AAV9 (L))、およびSTXB P1短変異体を注射したHETマウス (HET-AAV9 (S)) におけるウイルスゲノムコピーのqPCRによる絶対定量。試料を後部皮質 (右半球) から収集し、二倍体マウスゲノムの絶対数に対して正規化したSV40pAを使用して定量した。結果を平均±SDとして示す。1群当たり $n=14\sim15$ の動物を分析し、ノンパラメトリック一元配置ANOVA (Kruskal-Wallis検定)、続いてDunnの事後多重比較検定を適用した。形質導入群間に有意差は認められなかった。(B) SV40ポリAおよび (C) ヒト特異的STXB P1のmRNA発現分析。データは、 $2^{-\Delta C_t}$ 値を計算することによってmRNA発現レベルとして示しており、ここで、2つの参照遺伝子の平均に対して発現を正規化した。結果を平均±SDとして示す。1群当たり $n=14\sim15$ の動物を分析し、ノンパラメトリック一元配置ANOVA (Kruskal-Wallis検定)、続いてDunnの事後多重比較検定を適用した。形質導入群間に有意差は認められなかった。

10

20

30

40

50

【図24】qPCRによるマウス脳におけるAAV処置後のSTXB P1変異体発現の分析（注射7週間後）。短変異体（A）または長変異体（B）の総（マウスおよびヒト）レベルを特異的に測定するプローブを使用して、STXB P1変異体mRNA発現の分析を行った。データは、 $2^{-\Delta C_t}$ 値を計算することによってmRNA発現レベルとして示しており、ここで、2つの参照遺伝子の平均に対して発現を正規化した。結果を平均±SDとして示す。1群当たり $n=14\sim16$ の動物を分析した。

【図25】ウエスタンブロットによるマウス脳におけるAAV処置後のSTXB P1変異体発現の分析（注射7週間後）。ビヒクル-PBSを注射したWTマウス（WT）、ビヒクル-PBSを注射したHETマウス（HET）、STXB P1長変異体を注射したHETマウス（HET-AAV9（L））、およびSTXB P1短変異体を注射したHETマウス（HET-AAV9（S））における右前頭（内側）皮質由来の試料のウエスタンブロットによるタンパク質分析（A）総STXB P1（長変異体および短変異体）タンパク質発現に関するウエスタンブロットデータの定量。（B）長STXB P1変異体タンパク質発現に関するウエスタンブロットデータの定量。（C）短STXB P1変異体タンパク質発現に関するウエスタンブロットデータの定量。（D）シンタキシン-1Aタンパク質発現に関するウエスタンブロットデータの定量 各STXB P1およびSTX1Aバンド強度の正規化のために、 β -アクチンをローディング対照として使用した。スクリーニング群としてビヒクルWT群（WT）を使用した。結果を平均±SDとして示す。ノンパラメトリック一元配置ANOVA（Kruskal-Wallis検定）、続いてDunnの事後多重比較検定を使用して、データを分析した（* $p<0.05$ ；** $p<0.01$ *** $p<0.001$ ；**** $p<0.0001$ ）。

【図26】免疫組織化学的検査による、マウス脳におけるAAV処置後のHAタグ付きSTXB P1発現の脳分布（注射7週間後）。HAタグ付きSTXB P1長変異体を注射したHETマウス由来の矢状切片に対してHAタグ染色を行い、ビヒクル（PBS）処置マウスと比較した。AAV処置群（動物6023）およびビヒクル処置群（動物6009）の代表的な脳切片の例を示す。動物6023（AAV処置）では主要な脳領域内で強いHA染色が観察されるが、PBS処置群（動物6009）ではHA染色は観察されない。

【図27】注射（6～7週間後）（A、B）および24週間後（C、D）のEEGによる、STXB P1 HETマウス脳におけるAAV処置後の棘徐波発射（SWD）の分析。

（A）ビヒクル-PBSを注射したWTマウス（WT、 $n=10$ ）、ビヒクル-PBSを注射したHETマウス（HET、 $n=19$ ）、STXB P1長変異体を注射したHETマウス（HET-AAV9（L）、 $n=15$ ）、およびSTXB P1短変異体を注射したHETマウス（HET-AAV9（S）、 $n=16$ ）におけるSWDの平均数。注射6～7週間後、24時間にわたって7日間連続してSWDを分析した。（B）「無発作」動物（記録中にSWDが検出されなかった）および「発作がある」動物（記録中にSWDが検出された）の数の分析。（C）ビヒクル-PBSを注射したWTマウス（WT、 $n=5$ ）、ビヒクル-PBSを注射したHETマウス（HET、 $n=12$ ）、STXB P1長変異体を注射したHETマウス（HET-AAV9（L）、 $n=9$ ）、およびSTXB P1短変異体を注射したHETマウス（HET-AAV9（S）、 $n=11$ ）におけるSWDの平均数。注射24週間後、24時間にわたって7日間連続してSWDを分析した。（D）注射24週間後の「無発作」動物（記録中にSWDが検出されなかった）および「発作がある」動物（記録中にSWDが検出された）の数の分析。ノンパラメトリック一元配置ANOVA（Kruskal-Wallis検定）、続いてDunnの事後多重比較検定（**** $p<0.0001$ ）、（*** $p<0.001$ ）によって群間差を分析し、無発作分析ではカイ二乗分割検定を使用した。

【図28】STXB P1 HETマウス（注射1～22週間後）におけるAAV処置後の体重の分析（A）ビヒクル-PBSを注射したWT（ $n=17$ ）およびHETマウス（ $n=16$ ）における週齢の関数としての平均体重。二元配置反復測定ANOVA、続いて補正されていないFisherのLSD事後多重比較検定によって群間差を分析した（* $p<0.05$ ；** $p<0.01$ ；*** $p<0.001$ ；**** $p<0.0001$ ）

10

20

30

40

50

。(B) ビヒクルーPBSを注射したWTマウス(WT、 $n=17$)、ならびにビヒクルーPBSを注射したHETマウス(HET、 $n=16$)、STXBP1長変異体を注射したHETマウス(HET-AAV9(L)、 $n=10$)、およびSTXBP1短変異体を注射したHETマウス(HET-AAV9(S)、 $n=13$)において22週齢で測定した平均体重。パラメトリック一元配置ANOVA、続いて補正されていないFisherのLSD事後多重比較検定によって群間差を分析した($**p<0.01$; $****p<0.0001$; ns、有意でない)。棒グラフは平均±SEMである。

【図29】STXBP1 HETマウス(注射4~22週間後)におけるAAV処置後の後肢抱擁(hind limb clasping)の分析(A)ビヒクルーPBSを注射したWTマウス(WT、 $n=17$)、ならびにビヒクルーPBSを注射したHETマウス(HET、 $n=16$)、STXBP1長変異体を注射したHETマウス(HET-AAV9(L)、 $n=10$)、およびSTXBP1短変異体を注射したHETマウス(HET-AAV9(S)、 $n=13$)における週齢の関数としての平均後肢抱擁スコア。(B)ビヒクルーPBSを注射したWTマウス($n=17$)、ならびにビヒクルーPBS($n=16$)、AAV9/MECP2-int-STXBP1-L($n=10$)およびAAV9/MECP2-int-STXBP1-S($n=13$)を注射したHETマウスにおいて22週齢で記録した平均後肢抱擁スコア。ノンパラメトリック一元配置ANOVA(Kruskal-Wallis検定)、続いて補正されていないDunnの事後多重比較検定によって群間差を分析した($*p<0.05$; $**p<0.01$; $****p<0.0001$; ns、有意でない)。棒グラフは平均±SEMである。

【図30】AAV処置後(注射8週間後)のワイヤーハンギング試験におけるSTXBP1 HETマウスの分析。ビヒクルーPBSを注射したWTマウス(WT、 $n=17$)、ビヒクルーPBSを注射したHETマウス(HET、 $n=16$)、STXBP1長変異体を注射したHETマウス(HET-AAV9(L)、 $n=10$)、およびSTXBP1短変異体を注射したHETマウス(HET-AAV9(S)、 $n=13$)において、8週齢での四肢ワイヤーハンギング試験で測定した落下するまでの時間。パラメトリック一元配置ANOVA、続いて補正されていないFisherのLSD事後多重比較検定によって群間差を分析した($****p<0.0001$; ns、有意でない)。棒グラフは平均±SEMである。

【図31】AAV処置後(注射10週間後)の恐怖条件付け試験におけるSTXBP1 HETマウスの分析(A)ビヒクルーPBSを注射したWTマウス(WT、 $n=17$)、ならびにビヒクルーPBSを注射したHETマウス(HET、 $n=16$)、STXBP1長変異体を注射したHETマウス(HET-AAV9(L)、 $n=10$)、およびSTXBP1短変異体を注射したHETマウス(HET-AAV9(S)、 $n=13$)における、恐怖条件付け訓練段階の24時間後に10週齢で行った文脈的恐怖記憶試験中の平均すくみ行動。パラメトリック一元配置ANOVA、続いて補正されていないFisherのLSD事後多重比較検定によって群間差を分析した($*p<0.05$; $****p<0.0001$)。(B)文脈的恐怖記憶試験の1時間後に(A)と同じ動物に対して行った合図恐怖記憶試験(cued fear memory test)中の平均すくみ行動。パラメトリック一元配置ANOVA、続いて補正されていないFisherのLSD事後多重比較検定によって群間差を分析した($*p<0.05$; $***p<0.001$; $****p<0.0001$)。棒グラフは平均±SEMである。

【0014】

配列の簡単な説明

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1：配列の要約

配列識別子	配列名
配列番号 1	CAG 1.6kb プロモーター
配列番号 2	hSYN プロモーター
配列番号 3	MECP2 プロモーター
配列番号 4	hNSE プロモーター
配列番号 5	CamKII プロモーター
配列番号 6	内因性 hSTXBP1 プロモーター
配列番号 7	アイソフォーム a をコードするヒト STXBP1 cDNA 配列
配列番号 8	SV40 ポリ A
配列番号 9	ヒト STXBP1 アイソフォーム a(603 アミノ酸)
配列番号 10	ヒト STXBP1 アイソフォーム b(594 アミノ酸)
配列番号 11	ヒト STXBP1 アイソフォーム c
配列番号 12	ヒト STXBP1 アイソフォーム d
配列番号 13	ヒト STXBP1 アイソフォーム e
配列番号 14	ヒト STXBP1 アイソフォーム f
配列番号 15	ヒト STXBP1 アイソフォーム g
配列番号 16	ヒト STXBP1 アイソフォーム h
配列番号 17	AAV9.hu14 DNA 配列
配列番号 18	3' ITR
配列番号 19	5' ITR
配列番号 20	AAVtt(アミノ酸配列)
配列番号 21	AAV9(アミノ酸配列)
配列番号 22	アイソフォーム a をコードするヒト STXBP1(転写物変異体 1)
配列番号 23	アイソフォーム b をコードするヒト STXBP1(転写物変異体 2)
配列番号 24	アイソフォーム c をコードするヒト STXBP1(転写物変異体 3)
配列番号 25	アイソフォーム d をコードするヒト STXBP1(転写物変異体 4)
配列番号 26	アイソフォーム d をコードするヒト STXBP1(転写物変異体 5)
配列番号 27	アイソフォーム e をコードするヒト STXBP1(転写物変異体 6)
配列番号 28	アイソフォーム e をコードするヒト STXBP1(転写物変異体 7)

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

配列番号 29	アイソフォーム e をコードするヒト STXBP1 (転写物変異体 8)
配列番号 30	アイソフォーム e をコードするヒト STXBP1 (転写物変異体 9)
配列番号 31	アイソフォーム f をコードするヒト STXBP1 (転写物変異体 10)
配列番号 32	アイソフォーム g をコードするヒト STXBP1 (転写物変異体 11)
配列番号 33	アイソフォーム h をコードするヒト STXBP1 (転写物変異体 12)
配列番号 34	AAVtt DNA 配列
配列番号 35	MYC TAG
配列番号 36	HA TAG
配列番号 37	MECP2 イントロン
配列番号 38	Munc18-1a(aa 568~603)
配列番号 39	Munc18-1b(aa 568~594)
配列番号 40	例 4 で使用したフォワードプライマー。
配列番号 41	例 4 で使用したリバースプライマー。
配列番号 42	例 4 で使用したプローブ 6-Fam/Zen/3'IB FQ。
配列番号 43	STXBP1 ペプチド(例 9)。
配列番号 44	STXBP1 ペプチド(例 9)。
配列番号 45	STXBP1 ペプチド(例 9)。
配列番号 46	STXBP1 ペプチド長アイソフォーム特異的(例 9)。
配列番号 47	STXBP1 ペプチド短アイソフォーム特異的(例 9)。

10

20

30

【発明を実施するための形態】

【0015】

ここで、特定の非限定的な態様およびその実施形態に関して、ならびに特定の図および例を参照して、本発明を説明する。

【0016】

技術用語は、別段の指示がない限り、それらの常識によって使用される。特定の意味が特定の用語に伝えられる場合、用語の定義は、その用語が使用される文脈で与えられる。

【0017】

単数名詞を指す際に不定冠詞または定冠詞、例えば、「a」、「an」または「the」が使用される場合、特に明記されない限り、これはその名詞の複数形を含む。

40

【0018】

本明細書で使用される場合、用語「含む (comprising)」は、他の要素を除外しない。本開示の目的のために、用語「からなる (consisting of)」は、用語「含む (comprising)」の好ましい実施形態であると考えられる。

【0019】

本明細書で使用される場合、用語「治療」、「治療すること」などは、所望の薬理学的および／または生理学的効果を得ることを指す。効果は、疾患もしくはその症状を完全にもしくは部分的に予防するという点で予防的であり得、ならびに／または疾患、および／もしくは疾患に起因する有害症状の部分的もしくは完全な治療という点で治療的であり得る。したがって、治療は、哺乳動物、特にヒトの疾患の任意の治療を包含し、(a) 疾患

50

の素因を有する可能性があるが、それを有すると未だ診断されていない対象、すなわち、ヒトに疾患症状が発生するのを予防すること、(b) 疾患を阻害すること、すなわち、その発症を停止させること、および(c) 疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退縮を引き起こすことを含む。

【0020】

シンタキシン結合タンパク質1

8個のタンパク質アイソフォームをコードする、ヒトSTXBP1の12個の転写物変異体が同定されている。アミノ酸配列は、げっ歯類とヒトとの間で高度に保存されている。中枢神経系では、STXBP1はニューロン内で特異的に発現され、皮質、小脳、海馬および基底核を含む主要な脳領域にわたって広く分布する(Kalidas et al. 2000)。短いバージョンおよび長いバージョンを含む2つの主要なスプライス変異体が記載されている：

10

Munc18-1a (aa 568~603) : GSTHILTPTKFLMDLRHPDFRESSRVSFEDQAPTME (配列番号38)。

Munc18-1b (aa 568~594) : GSTHILTPQKLLDTLKKLNKTDEEISS (配列番号39)。

【0021】

長い方のスプライスバージョン(M18L、Munc18-1a、603アミノ酸)は、最後の25個のC末端アミノ酸の差を示し、ラット脳では、シナプスレベルで、およびGABA作動性ニューロン内で主要部分に発現されると報告されている(Ramos et al. 2015)。小さい方のスプライスバージョン(M18S、Munc18-1b、594アミノ酸)は、様々な細胞区画に局在しており、GABA作動性ニューロンおよびグルタミン酸作動性ニューロン内でさらに遍在的に発現される。機能的試験では、STXBP1スプライス変異体がシナプス可塑性に様々な役割を果たすことができることが示された(Meijer et al. 2015)。

20

【0022】

STXBP1遺伝子は染色体9q34.11上に位置し(GRCh38ゲノム座標: chr9:127,579,370~127,696,029)、ヒトコードタンパク質は、ラットおよびマウスの両STXBP1と高レベルの同一性を有する(Swanson et al. 1998)。STXBP1遺伝子は25個のエクソンを含有する。STXBP1一次転写物中の最終エクソンの選択的スプライシングは、終止コドンを含む110bpの配列を含むかまたはスキップして、STXBP1の2つの異なるC末端アミノ酸配列をもたらす。STXBP1-202転写物(ENST00000373302.8) (配列番号22)が最も長く、603アミノ酸のタンパク質(配列番号9)をコードする。STXBP1-201(ENST00000373299.5) (配列番号23)は、594アミノ酸のタンパク質(配列番号10)をコードする。これらの変異体はともに、中枢神経系で検出されるが、それらの発現パターンは脳組織と細胞型との間で異なり得る(Ramos-Miguel et al. 2015)。

30

【0023】

ヒトSTXBP1の12個の転写物変異体および8個のタンパク質アイソフォームを表2に要約する。

40

【0024】

【表 2】

表 2：STXBP1 転写物変異体およびタンパク質アイソフォーム

ヒト STXBP1 アイソフォーム	タンパク質 配列識別子	転写物変異体	DNA 配列識別子
アイソフォーム a	配列番号 9	アイソフォーム a をコードする 転写物変異体 1	配列番号 22
アイソフォーム b	配列番号 10	アイソフォーム b をコードする 転写物変異体 2	配列番号 23
アイソフォーム c	配列番号 11	アイソフォーム c をコードする 転写物変異体 3	配列番号 24
アイソフォーム d	配列番号 12	アイソフォーム d をコードする 転写物変異体 4	配列番号 25
		アイソフォーム d をコードする 転写物変異体 5	配列番号 26
アイソフォーム e	配列番号 13	アイソフォーム e をコードする転 写物変異体 6	配列番号 27
		アイソフォーム e をコードする 転写物変異体 7	配列番号 28
		アイソフォーム e をコードする 転写物変異体 8	配列番号 29
		アイソフォーム e をコードする 転写物変異体 9	配列番号 30
アイソフォーム f	配列番号 14	アイソフォーム f をコードする 転写物変異体 10	配列番号 31
アイソフォーム g	配列番号 15	アイソフォーム g をコードする 転写物変異体 11	配列番号 32
アイソフォーム h	配列番号 16	アイソフォーム h をコードする 転写物変異体 12	配列番号 33

【0025】

シンタキシン結合タンパク質 1 または STXBP1 は、当技術分野では、表 3 に列挙した代替名によって呼ばれることがある。最も一般的なものは「Munc18-1」であり、それよりも程度が低いものは「Sec1」である。承認された遺伝子名は STXBP1 である。

【0026】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3：シンタキシン結合タンパク質 1 の代替名

シンタキシン結合タンパク質 1
シンタキシン-結合タンパク質 1
MUNC18-1
タンパク質 Unc-18 ホモログ 1
タンパク質 Unc-18 ホモログ A
Unc-18A
Unc18-1
N-Sec1
UNC18
P67
Neuronal SEC1
RBSEC1
STXBP1
HUNC18
RbSec1
UNC18A
NSEC1
M18

【 0 0 2 7 】

ヒト、サルおよびマウスの S T X B P 1 配列（配列番号 9 によるヒトアイソフォーム a）のタンパク質配列アライメントを図 2 に示す。アライメントは、種全体にわたって高い配列相同性を示す。サルおよびマウスのアミノ酸配列は、ヒトのアミノ酸配列と同一である。

【 0 0 2 8 】

導入遺伝子
本発明は、

- i . それぞれ配列番号 9、10、11、12、13、14、15 もしくは 16 に示される配列を有するアイソフォーム a、b、c、d、e、f、g もしくは h を含むシンタキシン結合タンパク質 1（S T X B P 1）、または
- i i . 配列番号 9、10、11、12、13、14、15 もしくは 16 に対して少なくとも 95% もしくは 96% もしくは 97% もしくは 98% もしくは 99% もしくは 99.5% の配列同一性を有し、S T X B P 1 としての機能を保持する配列、または
- i i i . 配列番号 9 を参照して、表 7 に示される 1 つ以上の変異を含む天然変異体、をコードする導入遺伝子を含む核酸構築物を提供する。

【 0 0 2 9 】

用語「導入遺伝子」は、遺伝子療法における有効な原理として使用するための遺伝子産物をコードする核酸分子（「核酸分子」および「核酸」は区別なく使用される）、DNA または c DNA を指す。遺伝子産物は、1 つ以上のペプチドまたはタンパク質であり得る。

【 0 0 3 0 】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号 9 に示される配列を有する S T X B P 1 アイソフォーム a、または配列番号 9 に対して少なくとも 95% もしくは 96% もしくは 97

%もしくは98%もしくは99%もしくは99.5%の配列同一性を有する配列をコードする。

【0031】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号10に示される配列を有するSTXB P1アイソフォームb、または配列番号10に対して少なくとも95%もしくは96%もしくは97%もしくは98%もしくは99%もしくは99.5%の配列同一性を有する配列をコードする。

【0032】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号11に示される配列を有するSTXB P1アイソフォームc、または配列番号11に対して少なくとも95%もしくは96%もしくは97%もしくは98%もしくは99%もしくは99.5%の配列同一性を有する配列をコードする。

【0033】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号12に示される配列を有するSTXB P1アイソフォームd、または配列番号12に対して少なくとも95%もしくは96%もしくは97%もしくは98%もしくは99%もしくは99.5%の配列同一性を有する配列をコードする。

【0034】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号13に示される配列を有するSTXB P1アイソフォームe、または配列番号13に対して少なくとも95%もしくは96%もしくは97%もしくは98%もしくは99%もしくは99.5%の配列同一性を有する配列をコードする。

【0035】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号14に示される配列を有するSTXB P1アイソフォームf、または配列番号14に対して少なくとも95%もしくは96%もしくは97%もしくは98%もしくは99%もしくは99.5%の配列同一性を有する配列をコードする。

【0036】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号15に示される配列を有するSTXB P1アイソフォームg、または配列番号15に対して少なくとも95%もしくは96%もしくは97%もしくは98%もしくは99%もしくは99.5%の配列同一性を有する配列をコードする。

【0037】

一実施形態では、導入遺伝子は、配列番号16に示される配列を有するSTXB P1アイソフォームh、または配列番号16に対して少なくとも95%もしくは96%もしくは97%もしくは98%もしくは99%もしくは99.5%の配列同一性を有する配列をコードする。

【0038】

一実施形態では、導入遺伝子は、以下をコードする：

i. それぞれ配列番号22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32もしくは33に示される配列を有するSTXB P1転写物変異体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11もしくは12、または

ii. 配列番号22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32もしくは33に対して少なくとも95%もしくは96%もしくは97%もしくは98%もしくは99%もしくは99.5%の配列同一性を有する配列。

【0039】

当技術分野における従来の実施と同様に、STXB P1転写物変異体1～12のmRNA配列は、参照ゲノム配列との整合性のためにDNA配列として報告される。(National Center for Biotechnology Information、www.ncbi.nlm.nih.gov)。この目的は、ゲノムアライメントを

10

20

30

40

50

さらに直接的に行い、報告されるミスマッチを少なくすることである。STXB P 1アイソフォーム a、b または c を発現させるために、例えば、当業者であれば、転写物変異体 1、2 または 3 由来の cDNA を発現させるであろう。

【0040】

一実施形態では、導入遺伝子は、STXB P 1アイソフォーム a をコードし、配列番号 7 の cDNA 配列、または配列番号 7 に対して少なくとも 95 % もしくは 96 % もしくは 97 % もしくは 98 % もしくは 99 % もしくは 99.5 % の配列同一性を有する配列を含む。

【0041】

用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド配列」は、モノマーヌクレオチドから構成されるかまたはモノマーヌクレオチドを含む任意の分子を指すために区別なく使用され得る。核酸は、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであり得る。ヌクレオチド配列は、DNA または RNA であり得る。ヌクレオチド配列は、化学的に修飾されていても人工的であってもよい。ヌクレオチド配列には、ペプチド核酸 (PNA)、モルホリノおよびロックド核酸 (LNA)、ならびにグリコール核酸 (GNA) およびトレース核酸 (TNA) が含まれる。これらの配列の各々は、分子の骨格への変化によって、天然に存在する DNA または RNA と区別される。ホスホロチオアートヌクレオチドが使用されてもよい。他のデオキシヌクレオチド類似体には、メチルホスホナート、ホスホルアミダート、ホスホロジチオアート、N3' P5' -ホスホルアミダートおよびオリゴリボヌクレオチドホスホロチオアート、ならびにそれらの 2' -O-アシル類似体、および 2' -O-メチルリボヌクレオチドメチルホスホナートが含まれる。

【0042】

用語「核酸構築物」は、組換え DNA 技術の使用から生じる天然に存在しない核酸を指す。特に、核酸構築物は、天然には存在しない様式で組み合わせられるかまたは並置される核酸配列のセグメントを含有するように修飾された核酸分子である。

【0043】

特定の実施形態では、該核酸構築物は、STXB P 1の天然に存在する変異体または組換え機能的変異体のコード配列に対して少なくとも 70 %、80 %、90 % ; 95 %、99 % または 100 % の同一性を有するコード核酸配列の全部または断片を含む。

【0044】

本明細書で使用される用語「断片」は、参照配列の連続部分を指す。例えば、1000ヌクレオチド長を有する配列の断片とは、該配列の 5、50、500 連続ヌクレオチドを指し得る。

【0045】

本明細書で使用される用語「病理学的変異体」は、参照配列と比較して修飾され、該参照配列と比較して機能障害を有する核酸配列またはアミノ酸配列を指す。STXB P 1の病理学的変異体および可能性のある病理学的変異体をそれぞれ表 5 および表 6 に示す。

【0046】

本明細書で使用される用語「機能的変異体」は、参照配列と比較して修飾されているが、該参照配列の機能を保持する核酸配列またはアミノ酸配列を指す。STXB P 1の機能的変異体を表 7 に示す。

【0047】

用語「配列同一性」または「同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列のアライメントから得られた位置における一致 (同一の核酸残基またはアミノ酸残基) の数を指す。配列同一性は、配列ギャップを最小限に抑えながら重複および同一性を最大化するようにアライメントされた際の配列を比較することによって決定される。特に、配列同一性は、2つの配列の長さに応じて、いくつかの数学的グローバルまたはローカルアライメントアルゴリズムのいずれかを使用して決定され得る。類似の長さの配列は、好ましくは、配列を全長にわたって最適にアライメントするグローバルアライメントアルゴリズム (例えば、Needleman and Wunsch algorithm

；Needleman and Wunsch, 1970, J Mol Biol. ; 48 (3) : 443-53) を使用してアライメントされるのに対して、実質的に異なる長さの配列は、好ましくは、ローカルアライメントアルゴリズム (例えば、Smith and Waterman アルゴリズム (Smith and Waterman, 1981, J Theor Biol. ; 91 (2) : 379-80) または Altschul アルゴリズム (Altschul SF et al., 1997, Nucleic Acids Res. ; 25 (17) : 3389-402. ; Altschul SF et al., 2005, Bioinformatics. ; 21 (8) : 1451-6) を使用してアライメントされる。核酸配列同一性パーセントまたはアミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、例えば、<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> または <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/> などのインターネットウェブサイトで入手可能な公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して、当技術分野の技能の範囲内である様々な方法で達成され得る。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大のアライメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含め、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。本明細書の目的のために、核酸配列同一性値%またはアミノ酸配列同一性値%とは、全検索パラメータがデフォルト値、すなわち、Scoring matrix=BLOSUM62、Gap open=10、Gap extend=0.5、End gap penalty=false、End gap open=10、および End gap extend=0.5 に設定される Needleman-Wunsch アルゴリズムを使用して2つの配列の最適なグローバルアライメントを作成するペアワイズ配列アライメントプログラム EMBOS Needle を使用して生成された値を指す。

10

20

【0048】

本開示による核酸構築物は、導入遺伝子と、宿主、例えば、宿主細胞内のその発現のための少なくとも好適な核酸エレメントとを含む。

【0049】

例えば、該核酸構築物は、STXBP1 をコードする導入遺伝子と、関連する宿主における STXBP1 の発現に必要な1つ以上の制御配列とを含む。一般に、核酸構築物は、導入遺伝子と、導入遺伝子の前 (5' 非コード配列) および後 (3' 非コード配列) に、STXBP1 の発現に必要な調節配列とを含む。

30

【0050】

プロモーター

一実施形態では、核酸構築物は、STXBP1 をコードする導入遺伝子と、該導入遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターとを含む。好ましくは、導入遺伝子は、プロモーターの制御下にある。

【0051】

用語「プロモーター」は、それが作動可能に連結されている核酸の転写を導く調節エレメントを指す。プロモーターは、作動可能に連結された核酸の転写の速度および効率の両方を調節することができる。プロモーターはまた、核酸のプロモーター依存転写を増強する (「エンハンサー」) または抑制する (「リプレッサー」) 他の調節エレメントに作動可能に連結され得る。これらの調節エレメントには、限定するものではないが、転写因子結合部位、リプレッサーおよびアクチベータータンパク質結合部位、ならびにプロモーターからの転写量を調節するために直接的または間接的に作用することが当業者に公知の任意の他のヌクレオチド配列、例えば、アテニュエーター、エンハンサーおよびサイレンサーが含まれる。プロモーターは、同じ鎖上、および DNA 配列の上流で (センス鎖の5' 領域に向かって)、それが作動可能に連結されている遺伝子またはコード配列の転写開始部位の近くに位置する。プロモーターは、約100~1000塩基対長であり得る。プロモーター内の位置は、特定の遺伝子の転写開始部位に関連して指定される (すなわち、上流の位置は、-1 から逆に数えた負数であり、例えば、-100 は、上流の位置100塩

40

50

基対である)。

【0052】

用語「5'から3'方向に作動可能に連結された」または単に「作動可能に連結された」は、2つ以上のヌクレオチド配列の各々がそれらの通常の機能を果たすことを可能にする機能的関係にある該2つ以上の配列の連結を指す。典型的には、作動可能に連結されたという用語は、プロモーター、および目的のタンパク質をコードする導入遺伝子などの調節エレメントの並置を指すために使用される。例えば、プロモーターと導入遺伝子との間の作動可能な連結は、プロモーターが、細胞内などの好適な発現系内で導入遺伝子の5'発現を促進するように機能することを可能にする。

【0053】

プロモーターは、組織特異的プロモーターもしくは細胞型特異的プロモーター、または器官特異的プロモーター、または複数の器官に特異的なプロモーター、または全身性プロモーターもしくは遍在性プロモーターであり得る。

【0054】

用語「遍在性プロモーター」は、さらに具体的には、様々な異なる細胞または組織、例えば、ニューロンおよび星状膠細胞内で活性なプロモーターに関する。

【0055】

中枢神経系全体にわたる導入遺伝子の発現に適したプロモーターの例には、ニワトリベータアクチン(CBA)プロモーター(Miyazaki 1989, Gene 79: 269-277)、CAGプロモーター(Niwa 1991, Gene 108: 193-199)、伸長因子1アルファプロモーター(EF1 α)(Nakai 1998, Blood 91: 4600-4607)、ヒトシナプシン1遺伝子プロモーター(hSyn)(Kugler S. et al. Gene Ther. 2003. 10(4): 337-47)またはホスホグリセリン酸キナーゼ1プロモーター(PGK1)(Hannan 1993, Gene 130: 233-239)、メチルCPG結合タンパク質2(MECP2)プロモーター(Adachi et al., Hum. Mol. Genetics. 2005; 14(23): 3709-3722)、ヒトニューロン特異的エノラーゼ(NSE)プロモーター(Twyman, R. M. and E. A. Jones (1997). J Mol Neurosci 8(1): 63-73)、カルシウム／カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMKII)プロモーター(Nathanson, J. L., et al. (2009). Neuroscience 161(2): 441-450)およびヒトユビキチンC(UBC)プロモーター(Schorpp, M., et al. (1996). Nucleic Acids Res 24(9): 1787-1788)が挙げられる。

【0056】

一実施形態では、プロモーターは、配列番号1のCAG 1.6 kbプロモーターである。

【0057】

一実施形態では、プロモーターは、配列番号2のhSYNプロモーターである。

【0058】

一実施形態では、プロモーターは、配列番号3のMECP2プロモーターである。

【0059】

一実施形態では、プロモーターは、配列番号4のhNSEプロモーターである。

【0060】

一実施形態では、プロモーターは、配列番号5のCamKIIプロモーターである。

【0061】

一実施形態では、プロモーターは、配列番号6の内因性hSTXB P1プロモーターである。

【0062】

一実施形態では、プロモーターは、配列番号37のMECP2イントロンに5'から3'

10

20

30

40

50

方向に作動可能に連結された、配列番号 3 の M E C P 2 プロモーターである。

【0063】

代替的な実施形態では、核酸構築物は、S T X B P 1 をコードする導入遺伝子と、該導入遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターとを含み、プロモーターは、以下と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一である：

(a) C A G 1.6 k b プロモーター（配列番号 1）。

(b) h S Y N プロモーター（配列番号 2）。

(c) M E C P 2 プロモーター（配列番号 3）。

(d) h N S E プロモーター（配列番号 4）。

(e) C a m K I I プロモーター（配列番号 5）。

(f) 内因性 h S T X B P 1 プロモーター（配列番号 6）。

(g) M E C P 2 イントロン（配列番号 37）に 5' から 3' 方向に作動可能に連結された M E C P 2 プロモーター（配列番号 3）。

【0064】

プロモーターは、本明細書に記載のプロモーターの機能的変異体または断片であり得る。プロモーターの機能的変異体または断片は、対応する非変異体または完全長プロモーターの特徴を保持するという意味で機能的であり得る。したがって、プロモーターの機能的変異体または断片は、それが作動可能に連結されている導入遺伝子の転写を促進する能力を保持し、それによって、該導入遺伝子によってコードされる S T X B P 1 の発現を促進する。プロモーターの機能的変異体または断片は、特定の組織型に対する特異性を保持し得る。例えば、プロモーターの機能的変異体または断片は、C N S の細胞に特異的であり得る。プロモーターの機能的変異体または断片は、ニューロン内の S T X B P 1 の発現を特異的に促進し得る。

【0065】

プロモーターは、「最小配列」を含み得、最小配列とは、十分な長さを有し、プロモーターとして機能するのに必要なエレメントを含有する、すなわち、該プロモーターが作動可能に連結された導入遺伝子の転写を促進し、それによって、S T X B P 1 の発現を促進することができる、プロモーターのヌクレオチド配列を意味する。

【0066】

本発明の核酸構築物に使用される最小プロモーターは、例えば、配列番号 1 を含む C A G プロモーター、または配列番号 2 を含む h S Y N プロモーター、または配列番号 3 を含む M E C P 2 プロモーターであり得る。

【0067】

プロモーターは、1 つ以上のイントロンを含み得る。用語「イントロン」は、遺伝子内非コードヌクレオチド配列を指す。典型的には、イントロンは、遺伝子の転写中に D N A からメッセンジャー R N A (m R N A) に転写されるが、その翻訳前にスプライシングによって m R N A 転写物から切除される。

【0068】

プロモーターは、本明細書に記載のイントロンの機能的変異体または断片を含み得る。イントロンの機能的変異体または断片は、対応する非変異体または完全長イントロンの特徴を保持するという意味で機能的であり得る。したがって、本明細書に記載のイントロンの機能的変異体または断片は非コードである。本明細書に記載のイントロンの機能的変異体または断片はまた、D N A から m R N A に転写される能力、および／またはスプライシングによって m R N A から切除される能力を保持し得る。

【0069】

本発明で使用されるプロモーターに組み込まれ得るイントロンは、天然の非コード領域に由来し得るか、または操作され得る。

【0070】

一実施形態では、イントロンは、配列番号 37 を含むかもしくは配列番号 37 からなる

10

20

30

40

50

M E C P 2 イントロン、または配列番号 37 に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5% もしくは 99.9% の同一性を有するその機能的変異体もしくは断片である。

【0071】

プロモーターおよび／またはイントロンは、1つ以上の非発現エクソン配列と組み合わされ得る。非発現エクソン配列は転写物を生成することができず、むしろ、それらはイントロン配列に隣接してスプライス部位を提供し得る。

【0072】

あるいは、プロモーターは、化学的に誘導可能なプロモーターであり得る。化学的に誘導可能なプロモーターは、それを必要とする対象への化学的誘導剤のインビボ投与によって調節されるプロモーターである。好適な化学的に誘導可能なプロモーターの例には、限定するものではないが、テトラサイクリン／ミノサイクリン誘導可能プロモーター (Ch tarto 2003, Neurosci Lett. 352:155-158) またはラパマイシン誘導可能プロモーター (Sanftner 2006, Mol Ther. 13:167-174) が挙げられる。

【0073】

ポリアデニル化シグナル配列

核酸構築物は、ポリアデニル化シグナル配列および／または転写ターミネーターを含む 3' 非翻訳領域を含み得る。

【0074】

用語「ポリアデニル化シグナル配列」(またはいずれも区別なく使用される「ポリアデニル化部位または「ポリ(A)シグナル」)は、前駆体 mRNA に転写され、遺伝子転写の終結をガイドする、遺伝子の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) 内の特異的認識配列を指す。ポリアデニル化シグナル配列は、その 3' 末端での新たに形成された前駆体 mRNA のヌクレオチド鎖切断のための、およびアデニン塩基のみからなる RNA のストレッチのこの 3' 末端への付加のためのシグナルとして作用する (ポリアデニル化プロセス; ポリ(A)テール)。ポリアデニル化シグナル配列は、mRNA の核外輸送、翻訳および安定性にとって重要である。本発明の文脈では、ポリアデニル化シグナル配列は、哺乳動物細胞内の哺乳動物遺伝子および／またはウイルス遺伝子のポリアデニル化を導くことができる認識配列である。

【0075】

ポリアデニル化シグナル配列は、典型的には、(a) プレメッセンジャー RNA (プレ mRNA) の 3' 末端切断およびポリアデニル化の両方のために、ならびに下流の転写終結を促進するために必要であることが示されているコンセンサス配列 AAUAAA と、(b) ポリ(A)シグナルとしての AAUAAA の利用効率を制御する、AAUAAA の上流および下流の追加の要素とからなる。哺乳動物遺伝子では、これらのモチーフにはかなりの多様性がある。

【0076】

一実施形態では、任意に、本明細書に記載の様々な実施形態の 1つ以上の特徴と組み合わせて、本発明の核酸構築物のポリアデニル化シグナル配列は、哺乳動物遺伝子またはウイルス遺伝子のポリアデニル化シグナル配列である。好適なポリアデニル化シグナルには、とりわけ、SV40 初期ポリアデニル化シグナル、SV40 後期ポリアデニル化シグナル、HSV チミジンキナーゼポリアデニル化シグナル、プロタミン遺伝子ポリアデニル化シグナル、アデノウイルス 5 E1b ポリアデニル化シグナル、成長ホルモンポリアデニル化シグナル、PBGD ポリアデニル化シグナルまたはインシリコ設計合成ポリアデニル化シグナルが含まれる。

【0077】

一実施形態では、ポリアデニル化シグナル配列は、配列番号 8 を含む SV40 ポリアデニル化シグナル配列である。

【0078】

他の調節エレメント

核酸構築物は、追加の調節エレメント、例えば、エンハンサー配列、イントロン、マイクロRNA標的化配列、ベクター内へのDNA断片の挿入を促進するポリリンカー配列、および／またはスプライシングシグナル配列を含み得る。

【0079】

ウイルスベクター

本発明は、本明細書に記載の核酸構築物を含むウイルスベクターをさらに提供する。

【0080】

用語「ウイルスベクター」は、カプシドにパッケージングされ得る、本明細書に開示されるウイルス粒子の核酸部分を指す。

【0081】

ウイルスベクターは、典型的には、少なくとも(i)導入遺伝子、および宿主内のその発現のための好適な核酸エレメントを含む核酸構築物と、(ii)ウイルスゲノムの全部または一部、例えば、ウイルスゲノムの逆方向末端反復とを含む。

【0082】

用語「逆方向末端反復」(ITR)は、回文配列を含有し、DNA複製の開始中にプライマーとして機能するT字形ヘアピン構造を形成するように折り畳まれ得る、ウイルスの5'末端に位置するヌクレオチド配列(5' ITR)および3'末端に位置するヌクレオチド配列(3' ITR)を指す。それらはまた、宿主ゲノムへのウイルスゲノム組込み、宿主ゲノムからの救済、および成熟ビリオンへのウイルス核酸のカプシド形成にも必要とされる。ITRは、ベクターゲノム複製、およびウイルス粒子へのそのパッケージングのためにシスにおいて必要とされる。

【0083】

一実施形態では、ウイルスベクターは、ウイルスの5' ITRおよび3' ITRを含む。

【0084】

一実施形態では、ウイルスベクターは、パルボウイルス(特にアデノ随伴ウイルス)、アデノウイルス、アルファウイルス、レトロウイルス(特にガンマレトロウイルスおよびレンチウイルス)、ヘルペスウイルスおよびSV40からなる群から独立して選択されるウイルスの5' ITRおよび3' ITRを含む。

【0085】

一実施形態では、ウイルスは、アデノ随伴ウイルス(AAV)、アデノウイルス(Ad)またはレンチウイルスである。

【0086】

一実施形態では、ウイルスはAAVである。

【0087】

一実施形態では、ウイルスベクターは、AAVの5' ITRおよび3' ITRを含む。

【0088】

AAVは、ヒト遺伝子療法のための潜在的なベクターとしてかなりの関心を集めている。該ウイルスの好ましい特性の中には、任意のヒト疾患との関連性の欠如、分裂細胞および非分裂細胞の両方に感染する能力、ならびに感染し得る様々な組織に由来する広範囲の細胞株がある。AAVゲノムは、4681塩基を含有する線状一本鎖DNA分子から構成される(Berns and Bohezky, 1987, *Advances in Virus Research* (Academic Press, Inc.) 32: 243-307)。該ゲノムは、DNA複製の起点として、およびウイルスのパッケージングシグナルとしてシスにおいて機能する逆方向末端反復(ITR)を各末端に含む。ITRは、典型的には約100~150bp長である。

【0089】

AAV ITRは、野生型ヌクレオチド配列を有し得るか、または公知のAAV ITRと比較して、1つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失もしくは置換、典型的には5、4、3、2もしくは1個以下のヌクレオチドの挿入、欠失もしくは置換によって変化し得る。

10

20

30

40

50

AAVベクターの逆方向末端反復（ITR）の血清型は、任意の公知のヒトまたは非ヒトのAAV血清型から選択され得る。

【0090】

特定の実施形態では、ウイルスベクターは、任意のAAV血清型のITRを含み得る。公知のAAV ITRには、限定するものではないが、AAV1、AAV2、AAV3（タイプ3Aおよび3Bを含む）、AAV-LK03、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10（AAVrh10）、AAV11、AAV12、鳥類AAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、ヒツジAAVが含まれる。霊長類の脳から同定されたRec2およびRec3などの組換え血清型も含まれる。

【0091】

あるいは、ウイルスベクターは、合成5' ITRおよび／または3' ITRを含み得る。

【0092】

一実施形態では、本発明の核酸構築物は、血清型AAV2のAAVの5' ITRおよび／または3' ITRをさらに含むウイルスベクターに含まれる。

【0093】

一実施形態では、ウイルスベクターは、それぞれ配列番号18および／もしくは19に示される配列を有する血清型AAV2のAAVの3' ITRおよび／もしくは5' ITR、またはそれぞれ配列番号18および／もしくは19と少なくとも80%もしくは少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。

【0094】

ウイルス粒子

本発明は、本明細書に記載の核酸構築物またはウイルスベクターを含むウイルス粒子をさらに提供する。

【0095】

用語「ウイルス粒子」は、（i）（任意に核酸構築物を含む）内にパッケージングされたウイルスベクターと、（ii）カプシドとを含む感染性かつ典型的には複製欠損ウイルス粒子を指す。

【0096】

一実施形態では、カプシドは、アデノ随伴ウイルスのカプシドタンパク質から形成される。

【0097】

アデノ随伴ウイルスのウイルスカプシドのタンパク質には、カプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3が含まれる。様々なAAV血清型のカプシドタンパク質配列間の差は、細胞侵入のための異なる細胞表面受容体の使用をもたらす。代替的な細胞内プロセッシング経路と組み合わせて、これは各AAV血清型に対して異なる組織向性を生じさせる。

【0098】

CNSを標的とするAAV系遺伝子療法は、Pignataro D, Sucunza D, Rico AJ et al., J Neural Transm 2018; 125: 575-589に概説されている。ウイルス粒子は、脳およびCNSの様々な領域内の少なくとも神経細胞を標的とするように選択および／または操作され得る。

【0099】

AAVウイルスは、一般に、それらの血清型に関して言及される。血清型は、カプシド表面抗原の発現のプロファイルに起因して、他の変異体亜種と区別するために使用される特有の反応性を有する、AAVの変異体亜種に対応する。AAV血清型には、AAV1、AAV2、AAV3（AおよびBを含む）AAV-LK03、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10（AAVrh10）もしくはAAV11またはそれらの組合せが含まれる。AAVは、霊長類の脳から同定されたRec2またはRec3などの組換え血清型、およびAAV2-トゥルタイプ（true-type）（AAVtt）であり得る。AAVttは、Tordo et al., Brain. 2018; 141（7）: 2014-2031および国際公開第2015/12150

10

20

30

40

50

1号に詳細に記載されている。AAV血清型の概説は、Choi et al (Curr Gene Ther. 2005; 5 (3); 299-310) および Wu et al (Molecular Therapy. 2006; 14 (3), 316-327) に見出され得る。

【0100】

本発明のウイルス粒子では、カプシドは、任意のAAV血清型、または血清型の組合せに由来し得る（1つのAAV血清型由来のVP1、ならびに異なる血清型由来のVP2および／またはVP3など）。

【0101】

特定の実施形態では、カプシドタンパク質は、AAV2、AAV5、AAV8、AAV9、AAV2-レトロまたはAAVttに由来し得る。

10

【0102】

一実施形態では、ウイルス粒子は、AAV由来のVP1カプシドタンパク質を少なくとも含み、該カプシドタンパク質は、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9（例えば、配列番号21に示されるAAV9.hu14）、AAV10、AAVトゥルータタイプ（配列番号20に示されるAAVtt）またはそれらの組合せに由来する。

【0103】

一実施形態では、ウイルス粒子は、配列番号20に示されるAAVtt由来のカプシドタンパク質を含む。一実施形態では、カプシドタンパク質は、配列番号20と少なくとも98.5%、99%または99.5%同一である。

20

【0104】

一実施形態では、ウイルス粒子は、配列番号21に示されるAAV9由来のカプシドタンパク質を含む。一実施形態では、カプシドタンパク質は、配列番号21と少なくとも98.5%、99%または99.5%同一である。

【0105】

本発明で使用するためのITR配列、rep遺伝子またはcap遺伝子を含むAAVゲノム、またはAAVゲノムのエレメントは、AAV全ゲノム配列に関する以下のアクセッション番号、すなわち、アデノ随伴ウイルス1 NC_002077、AF063497；アデノ随伴ウイルス2 NC_001401；アデノ随伴ウイルス3 NC_001729；アデノ随伴ウイルス3B NC_001863；アデノ随伴ウイルス4 NC_001829；アデノ随伴ウイルス5 Y18065、5AF085716；アデノ随伴ウイルス6 NC_001862；鳥類AAV ATCC VR-865 AY186198、AY629583、NC_004828；鳥類AAV株DA-1 NC_006263、AY629583；ウシAAV NC_005889、AY388617に由来し得る。

30

【0106】

AAVウイルスは、クレードまたはクローンの観点からも言及され得る。これは、天然由来のAAVウイルスの系統的關係を指し、典型的には、共通の祖先に遡ることができ、そのあらゆる子孫を含むAAVウイルスの系統群を指す。さらに、AAVウイルスは、特定の単離体、すなわち、自然界で見出される特定のAAVウイルスの遺伝的単離体に関して言及され得る。

40

【0107】

用語「遺伝的単離体」は、他の天然に存在するAAVウイルスとの限られた遺伝子混合を受け、それによって、遺伝子レベルで認識可能に異なる集団を定義するAAVウイルス集団を表す。本発明で使用され得るAAVのクレードおよび単離体の例には、以下が挙げられる：

・クレードA：AAV1 NC_002077、AF063497、AAV6 NC_001862、Hu. 48 AY530611、Hu 43 AY530606、Hu 44 AY530607、Hu 46 AY530609；

・クレードB：Hu. 19 AY530584、Hu. 20 AY530586、Hu

50

23 AY530589、Hu22 AY530588、Hu24 AY530590、
Hu21 AY530587、Hu27 AY530592、Hu28 AY53059
3、Hu 29 AY530594、Hu63 AYS30624、Hu64 AY53
0625、Hu13 AY530578、Hu56 AY530618、Hu57 AY
530619、Hu49 AY530612、Hu58 25 AY530620、Hu
34 AY530598、Hu35 AY530599、AAV2 NC__001401
、Hu45 AY530608、Hu47 AY530610、Hu51 AY5306
13、Hu52 AY530614、Hu T41 AY695378、Hu S17
AY695376、Hu T88 AY695375、Hu T71 AY695374
、HuT70 AY695373、Hu T40 AY695372、Hu T32 A
Y695371、Hu T17 AY695370、Hu LG15 AY695377；

・クレードC：Hu9 AY530629、HuLO AY530576、HuLL
AY530577、Hu53 AY530615、Hu55 AY530617、Hu5
4 AY530616、Hu7 AY530628、HuL8 AY530583、Hu
L5 AY530580、HuL6 AY530581、Hu25 AY530591、
Hu60 AY530622、Ch5 AY243021、Hu3 AY530595、
HuL AY530575、Hu4 AY530602 Hu2、AY530585、H
u61 AY530623；

・クレードD：Rh62 AY530573、Rh48 AY530561、Rh54
AY530567、Rh55 AY530568、C5 y2 AY243020、AA
V7 AF513851、Rh35 AY243000、Rh37 AY242998、
Rh36 AY242999、Cy6 AY243016、Cy4 AY243018、
Cy3 AY243019、Cy5 AY243017、RhL3 AY243013；

・クレードE：Rh38 AY530558、Hu66 AY530626、Hu42
AY530605、Hu67 AY530627、Hu40 AY530603、Hu4
1 AY530604、Hu37 AY530600、Rh40 10 AY53055
9、Rh2 AY243007、BbL AY243023、Bb2 AY243022
、RhLO AY243015、HuL7 AY530582、Hub AY53062
1、Rh25 AY530557、Pi2 AY530554、PiL AY53055
3、Pi3 AY530555、Rh57 AY530569、Rh50 AY5305
63、Rh49 AY530562、Hu39 AY530601、Rh58 AY53
0570、Rhbl AY530572、Rh52AY530565、Rh53 AY5
30566、Rh51 AY530564、Rh64 AY530574、Rh43 1
5 AY530560、AAV8 AF513852、Rh8 AY242997、Rh
L AY530556；および

・クレードF：Hu 14 (AAV9) AY530579、Hu31 AY53059
6、Hu32 AY530597；クローン単離体AAV5 Y18065、AF085
716、AAV 3 NC__001729、AAV 3B NC__001863、AAV
4 15 NC__001829、Rh34 AY243001、Rh33 AY2430
02、Rh32 AY243003。

【0108】

本発明は、同じベクター内のAAVの異なる血清型、クレード、クローンまたは単離体
由来のカプシドタンパク質配列の使用を包含する。本発明はまた、別の血清型のカプシド
への1つの血清型のゲノムのパッケージング、すなわち、シュードタイピングも包含する
。キメラ誘導体、シャッフルされた誘導体、またはカプシド修飾された誘導体は、1つ以
上の所望の機能を提供するように選択され得る。したがって、これらの誘導体は、天然に
存在するAAVカプシドを含むAAVウイルスベクターと比較して、遺伝子送達の効率の
増加、免疫原性の低下（体液性または細胞性）、向性範囲の変化、および／または特定の
細胞型の標的化の改善を示し得る。遺伝子送達の効率の増加は、細胞表面での受容体結合
もしくは共受容体結合の改善、内在化の改善、細胞内および核内への輸送の改善、ウイル

ス粒子の被覆除去の改善、または二本鎖形態への一本鎖ゲノムの変換の改善によって達成され得る。効率の増加はまた、必要とされない組織への送達によってベクター用量が希釈されないように、特定の細胞集団の向性範囲または標的化の変化に関連し得る。

【0109】

キメラカプシドタンパク質には、天然に存在するAAV血清型の2つ以上のカプシドコード配列間の組換えによって生成されるものが含まれる。これは、例えば、1つの血清型の非感染性カプシド配列を異なる血清型のカプシド配列と同時にトランスフェクトし、所望の特性を有するカプシド配列を選択するために指向性選択を使用するマーカーレスキュー手法によって行われ得る。異なる血清型のカプシド配列は、新規キメラカプシドタンパク質を産生するための細胞内の相同組換えによって変化させることができる。

10

【0110】

キメラカプシドタンパク質には、2つ以上のカプシドタンパク質間、例えば、異なる血清型の2つ以上のカプシドタンパク質間に特定のカプシドタンパク質ドメイン、表面ループまたは特定のアミノ酸残基を移入するようにカプシドタンパク質配列を操作することによって生成されるものが含まれる。シャッフルされたカプシドタンパク質またはキメラカプシドタンパク質は、DNAシャッフルまたはエラープローンPCRによって生成され得る。ハイブリッドAAVカプシド遺伝子は、関連するAAV遺伝子、例えば、複数の異なる血清型のカプシドタンパク質をコードするものの配列をランダムに断片化し、その後、自己プライミングポリメラーゼ反応で断片を再構築することによって作製され得るが、これは配列相同性の領域内で交差を引き起こす可能性もある。いくつかの血清型のカプシド遺伝子をシャッフルすることによってこのようにして作製されたハイブリッドAAV遺伝子のライブラリーをスクリーニングして、所望の機能を有するウイルスクローンを同定することができる。同様に、エラープローンPCRを使用して、AAVカプシド遺伝子をランダムに変異させて変異体の多様なライブラリーを作製してもよく、次いでこれを所望の特性について選択してもよい。

20

【0111】

カプシド遺伝子の配列は、天然の野生型配列に関して特異的な欠失、置換または挿入を導入するように遺伝的に修飾され得る。例えば、カプシド遺伝子は、カプシドコード配列のオープンリーディングフレーム内、またはカプシドコード配列のN末端および／もしくはC末端に、無関係のタンパク質またはペプチドの配列を挿入することによって修飾され得る。無関係なタンパク質またはペプチドは、有利には、特定の細胞型に対するリガンドとして作用し、それによって、標的細胞への改善された結合を付与するか、または特定の細胞集団に対するウイルス粒子の標的化の特異性を改善するものであり得る。無関係なタンパク質は、生成プロセスの一部としてウイルス粒子の精製を補助するもの、すなわち、エピトープまたは親和性タグであり得る。挿入部位は、典型的には、ウイルス粒子の他の機能、例えば、ウイルス粒子の内在化または輸送を妨げないように選択される。好適な挿入部位は、Choi et al (Curr Gene Ther. 2005; 5 (3) ; 299-310) に開示されている。

30

【0112】

一実施形態では、ウイルス粒子は、特定のAAV血清型に由来するAAVウイルスベクターを、同じ血清型のAAVに対応する天然Capタンパク質によって形成されたウイルス粒子にカプセル化することによって調製され得る。

40

【0113】

それでもなお、天然に存在するウイルス粒子の構造的特性および機能的特性を修飾および改善するためのいくつかの技術が開発されている (Bunning et al. J Gene Med 2008; 10: 717-733)。

【0114】

したがって、別の実施形態では、ウイルス粒子は、所与のAAV血清型のITRに隣接し、以下にパッケージングされた、STXB P1をコードする導入遺伝子を含む核酸構築物を含み得る：

50

(a) 異なる AAV 血清型に由来するカプシドタンパク質、例えば、AAV2 ITR および AAV9 カプシドタンパク質、もしくは AAV2 ITR および AAVtt カプシドタンパク質を含むウイルス粒子、または

(b) 異なる AAV 血清型もしくは変異体由来のカプシドタンパク質、例えば、2 つ以上の AAV 血清型のタンパク質によって形成されたカプシドを有する AAV2 ITR の混合物を含むモザイクウイルス粒子、または

(c) 異なる AAV 血清型もしくは変異体間のドメイン交換によって切断されたカプシドタンパク質、例えば、AAV3 ドメインを含む AAV5 カプシドタンパク質を有する AAV2 ITR を含むキメラウイルス粒子、または

(d) 選択的結合ドメインを提示し、標的細胞特異的受容体とのストリンジェントな相互作用を可能にするように操作されたウイルス粒子。

10

【0115】

AAV2 トゥルタイプカプシドとも呼ばれる AAVtt カプシドは、国際公開第 2015/121501 号に記載されている。一実施形態では、AAVtt VP1 カプシドタンパク質は、野生型 VP1 カプシドタンパク質に関して、AAV2 タンパク質配列 (NCBI 参照配列: YP_680426.1) の以下の位置、すなわち、125、151、162、205、312、457、492、499、533、546、548、585、588 および／または 593 のうちの 1 つ以上に対応する位置に、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む。

【0116】

一実施形態では、AAVtt は、野生型 AAV2 VP1 カプシドタンパク質 (NCBI 参照配列: YP_680426.1) に関して、以下のアミノ酸置換、すなわち、V125I、V151A、A162S、T205S、N312S、Q457M、S492A、E499D、F533Y、G546D、E548G、R585S、R588T および／または A593S のうちの 1 つ以上を含む。

20

【0117】

一実施形態では、AAVtt は、野生型 AAV2 VP1 カプシドタンパク質に関して、位置 457、492、499 および 533 に 4 つ以上の変異を含む。

【0118】

組換え AAV ウイルス粒子の構築は、当技術分野で一般的に公知であり、例えば、米国特許第 5,173,414 号明細書；米国特許第 5,139,941 号明細書；国際公開第 92/01070 号；国際公開第 93/03769 号；Lebkowski et al. (1988) Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996；Vincent et al. (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)；Carter, B. J. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3:533-539；Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129；および Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801 に記載されている。

30

【0119】

ウイルス粒子の生成

本明細書に記載のウイルスベクターと核酸構築物とを担持するウイルス粒子の生成は、生成されるウイルス粒子の構造的特徴を考慮して選択される従来の方法およびプロトコルによって行われ得る。

【0120】

要約すると、ウイルス粒子は、宿主細胞内、さらに具体的には、ヘルパーベクターもしくはウイルスまたは他の DNA 構築物の存在下で核酸構築物またはウイルスベクターによってトランスフェクトされる特定のウイルス生成細胞（パッケージング細胞）内で生成され得る。

40

50

【0121】

用語「パッケージング細胞」は、核酸構築物またはウイルスベクターによってトランスフェクトされ得、ウイルスベクターの完全な複製およびパッケージングに必要なあらゆる欠損機能をトランスにおいて提供する細胞または細胞株を指す。パッケージング細胞は、そのような欠損ウイルス機能を構成的または誘導的に発現し得る。パッケージング細胞は、接着細胞または浮遊細胞であり得る。

【0122】

典型的には、ウイルス粒子を生成するプロセスは、以下の工程を含む：

(a) 核酸構築物またはウイルスベクターを含むパッケージング細胞を培養培地中で培養する工程、ならびに

(b) 細胞培養上清から、および／または細胞内でウイルス粒子を採取する工程。

【0123】

STXB P1をコードする導入遺伝子を有する核酸構築物または発現ベクター（例えば、プラスミド）、rep遺伝子およびcap遺伝子をコードするがITR配列を有しない第2の核酸構築物（例えば、AAVヘルパープラスミド）、ならびにAAV複製に必要なアデノウイルス機能を提供する第3の核酸構築物（例えば、プラスミド）による一過性細胞同時トランスフェクションを伴う従来の方法を使用して、ウイルス粒子を生成することができる。

【0124】

AAV複製に必要なウイルス遺伝子は、ウイルスヘルパー遺伝子と呼ばれる。典型的には、AAV複製に必要な該遺伝子は、アデノウイルスヘルパー遺伝子、例えば、E1A、E1B、E2a、E4、またはVA RNAである。一実施形態では、アデノウイルスヘルパー遺伝子は、Ad5またはAd2血清型のものである。

【0125】

あるいは、AAV粒子の生成は、組換えバキュロウイルスの組合せによる昆虫細胞の感染によって行われてもよい（Urabe et al., Hum. Gene Ther. 2002; 13: 1935-1943）。SF9細胞に、パッケージングされるAAV rep、AAV capおよびAAVベクターをそれぞれ発現する2つまたは3つのバキュロウイルスベクターを同時感染させる。組換えバキュロウイルスベクターは、ウイルス複製および／またはパッケージングに必要なウイルスヘルパー遺伝子機能を提供する。Smith et al. 2009 (Molecular Therapy, vol. 17, no. 11, pp 1888-1896) は、昆虫細胞内でのAAV粒子の大規模生成のための二重バキュロウイルス発現系を記載している。

【0126】

好適な培養培地は当業者に公知である。培養培地を構成する成分は、培養される細胞の種類によって変動し得る。栄養組成に加えて、モル浸透圧濃度およびpHが、培養培地の重要なパラメータと考えられる。細胞増殖培地は、アミノ酸、ビタミン、有機塩および無機塩、炭水化物源、脂質、微量元素（いくつか例を挙げると、CuSO₄、FeSO₄、Fe(NO₃)₃、ZnSO₄）を含む、当業者に周知のいくつかの成分を含み、各成分は、インビトロでの細胞の培養（すなわち、細胞の生存および成長）を補助する量で存在する。成分はまた、補助物質、例えば、緩衝物質（例えば、重炭酸ナトリウム、Hepes、Tris、または同様に働く緩衝剤）、酸化安定剤、機械的ストレスに対抗する安定剤、プロテアーゼ阻害剤、動物成長因子、植物加水分解物、凝集防止剤、消泡剤を含み得る。細胞増殖培地の特徴および組成は、特定の細胞要件に応じて変動する。市販の細胞増殖培地の例には、MEM（最小必須培地）、BME（基本培地イーグル）、DMEM（ダルベッコ改変イーグル培地）、Iscoves DMEM（イスコフ改変ダルベッコ培地）、GMEM、RPMI 1640、Leibovitz L-15、McCoy、培地199、Ham（ハム培地）F10および誘導体、Ham F12、DMEM/F12が挙げられる。

【0127】

本開示に従って使用するためのウイルスベクターの構築および生成のさらなる指針は、
Viral Vectors for Gene Therapy, Methods and Protocols. Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 737. Merten and Al-Rubeai (Eds.) ; 2011 Humana Press (Springer) ; Gene Therapy. M. Giacca. 2010 Springer-Verlag ; Heilbronn R. and Weger S. Viral Vectors for Gene Transfer: Current Status of Gene Therapeutics. In: Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology 197 ; M. Schafer-Korting (Ed.) . 2010 Springer-Verlag ; pp. 143-170 ; Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols. R. O. Snyder and P. Moullier (Eds) . 2011 Humana Press (Springer) ; Bunning H. et al. Recent developments in adeno-associated virus technology. J. Gene Med. 2008 ; 10 : 717-733 ; Adenovirus: Methods and Protocols. M. Chillon and A. Bosch (Eds.) ; Third Edition. 2014 Humana Press (Springer) に見出され得る。

10

20

【0128】

宿主細胞

本開示は、本明細書に記載のSTXB P1をコードする核酸構築物またはウイルスベクターを含む宿主細胞をさらに提供する。本開示による宿主細胞は、ヘルパーベクターもしくはウイルスまたは他のDNA構築物の存在下で核酸構築物またはウイルスベクターによってトランスフェクトされ、ウイルス粒子の完全な複製およびパッケージングに必要なあらゆる欠損機能をトランスにおいて提供する、パッケージング細胞とも呼ばれるウイルス生成細胞である。該パッケージング細胞は、接着細胞または浮遊細胞であり得る。

【0129】

パッケージング細胞は、サル細胞、ヒト細胞、イヌ細胞およびげっ歯類細胞を含む哺乳動物細胞などの真核細胞であり得る。ヒト細胞の例には、PER.C6細胞（国際公開第01/38362号）、MRC-5（ATCC CCL-171）、WI-38（ATCC CCL-75）、HEK-293細胞（ATCC CRL-1573）、HeLa細胞（ATCC CCL2）および胎児アカゲザル肺細胞（ATCC CL-160）がある。非ヒト霊長類細胞の例には、Vero細胞（ATCC CCL81）、COS-1細胞（ATCC CRL-1650）またはCOS-7細胞（ATCC CRL-1651）がある。イヌ細胞の例には、MDCK細胞（ATCC CCL-34）がある。げっ歯類細胞の例には、ハムスター細胞、例えば、BHK21-F、HKCC細胞またはCHO細胞がある。

30

【0130】

哺乳動物供給源の代替として、ウイルス粒子を生成するためのパッケージング細胞は、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、ウズラまたはキジなどの鳥類供給源に由来し得る。鳥類細胞株の例には、鳥類胚性幹細胞（国際公開第01/85938号；国際公開第03/076601号）、不死化アヒル網膜細胞（国際公開第2005/042728号）、およびニワトリ細胞（国際公開第2006/108846号）またはアヒル細胞、例えば、EB66細胞株（国際公開第2008/129058号；国際公開第2008/142124号）を含む鳥類胚性幹細胞由来細胞が挙げられる。

40

【0131】

別の実施形態では、宿主細胞は、バキュロウイルスの感染および複製を許容する任意のパッケージング細胞であり得る。一例では、該細胞は、昆虫細胞、例えば、SF9細胞（ATCC CRL-1711）、Sf21細胞（IPLB-Sf21）、MG1細胞（B

50

BTI-TN-MG1) または High Five (商標) 細胞 (BTI-TN-5B1-4) である。

【0132】

一実施形態では、宿主細胞は、以下を含む：

(a) ヒト STXB P1 をコードする導入遺伝子を含む第1の核酸構築物またはウイルスベクター、

(b) AAV rep および／または cap 遺伝子をコードする第2の核酸構築物、例えば、プラスミドであって、該第2の核酸構築物が ITR 配列を有しない第2の核酸構築物、例えば、プラスミド、ならびに任意に、

(c) ウイルスヘルパー遺伝子を含む第3の核酸構築物、例えば、プラスミドまたはウイルス。

【0133】

本開示は、本開示のウイルス粒子を形質導入された宿主細胞をさらに提供し、本明細書で使用される用語「宿主細胞」は、目的のウイルスによる感染に感受性であり、インビトロでの培養に適している任意の細胞株を指す。

【0134】

医薬組成物

本開示は、薬学的な許容される賦形剤、希釈剤または担体と組み合わせて、本開示の核酸構築物、ウイルスベクター、ウイルス粒子を含む医薬組成物をさらに提供する。

【0135】

用語「薬学的に許容される」は、動物および／またはヒトに対する使用について、規制機関または認識された薬局方、例えば、欧州薬局方によって承認されていることを意味する。用語「賦形剤」は、治療剤とともに投与される希釈剤、アジュバント、担体またはビヒクルを指す。

【0136】

任意の好適な薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を医薬組成物の調製に使用することができる（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997 を参照）。医薬組成物は、典型的には、製造および保存の条件下で無菌かつ安定である。医薬組成物は、溶液（例えば、生理食塩水、デキストロース溶液もしくは緩衝溶液または他の薬学的に許容される滅菌流体）、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高い製品濃度に適応するのに適した他の秩序構造（例えば、マイクロ粒子またはナノ粒子）として製剤化され得る。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）およびそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散液の場合に必要な粒径の維持、および界面活性剤の使用によって維持することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マンニトールもしくはソルビトール、または塩、例えば、塩化ナトリウムを組成物中に含めることが好ましい。

【0137】

一実施形態では、医薬組成物は、溶液、例えば、緩衝生理食塩溶液として製剤化される。

【0138】

補足的な活性化合物を本開示の医薬組成物に組み込んでもよい。追加の治療薬の同時投与に関する指針は、Compendium of Pharmaceutical and Specialties (CPS) of the Canadian Pharmacists Associationに見出され得る。

【0139】

一実施形態では、医薬組成物は、実質内、脳内、静脈内または髄腔内投与に適した組成

10

20

30

40

50

物である。これらの医薬組成物は例示にすぎず、他の非経口投与経路および非経口以外の投与経路に適した医薬組成物を限定するものではない。本明細書に記載される医薬組成物は、単一単位投与形態または複数投与形態で包装され得る。

【0140】

医学的使用

本開示の医薬組成物、核酸構築物、ウイルスベクターおよびウイルス粒子は、STXB P1機能活性の喪失に関連する任意の状態、例えば、STXB P1変異に関連する任意の状態を治療または予防するのに使用され得る。

【0141】

そのような状態には、ドラベ症候群、レノックス・ガストー症候群、乳児痙攣、ミオクローヌステんかん、てんかん性脳症、早期ミオクロニー脳症、非症候性てんかん、大田原症候群、早期発症てんかん性脳症、ウエスト症候群、発達遅延、自閉症スペクトラム障害、運動失調－振戦遅延症候群（ataxia-tremor-retardation syndrome）、レット症候群、およびてんかんを伴わない知的障害が含まれる。

【0142】

本開示の医薬組成物、核酸構築物、ウイルスベクターおよびウイルス粒子は、STXB P1遺伝子の遺伝的変異、例えば、大田原症候群、ドラベ症候群およびウエスト症候群などの症候群の発症に寄与する変異に関連する神経発達および／またはてんかん障害を治療または予防するのに特に有用であり得る。

【0143】

したがって、一実施形態では、医薬組成物、核酸構築物、ウイルスベクターまたはウイルス粒子は、治療に使用するために提供される。

【0144】

一実施形態では、医薬組成物、核酸構築物、ウイルスベクターまたはウイルス粒子は、STXB P1遺伝性障害の治療に使用するために提供される。

【0145】

一実施形態では、STXB P1遺伝性障害は、ドラベ症候群、レノックス・ガストー症候群、乳児痙攣、ミオクローヌステんかん、てんかん性脳症、早期ミオクロニー脳症、非症候性てんかん、大田原症候群、早期発症てんかん性脳症、ウエスト症候群、発達遅延、自閉症スペクトラム障害、運動失調－振戦遅延症候群、レット症候群、またはてんかんを伴わない知的障害である。

【0146】

一実施形態では、STXB P1遺伝性障害は、ドラベ症候群、大田原症候群またはウエスト症候群である。

【0147】

一実施形態では、核酸構築物、ウイルスベクターまたはウイルス粒子の使用は、STXB P1遺伝性障害を治療するための医薬品を製造するために提供される。

【0148】

一実施形態では、本開示は、STXB P1遺伝性障害を治療する方法であって、それを必要とする患者に、治療有効量の医薬組成物またはウイルス粒子を投与することを含む方法を提供する。

【0149】

用語「治療有効量」は、患者または対象に投与された場合に所望の治療結果を達成する、いくつかのウイルス粒子、またはそのようなウイルス粒子を含む医薬製剤の量を指す。望ましい治療結果には以下が含まれる：

- ・様々な発作タイプ、例えば、脱力発作（転倒発作）、ミオクローヌス発作、全般発作、部分発作、熱性発作、乳児痙攣の頻度または持続時間の顕著な減少、
- ・持続的な発作からの解放の顕著な達成、
- ・発達遅延、知的障害、言語障害、認知障害、不随意運動、歩行障害、自閉症的特徴などの神経発達症状の進行に対する顕著な影響。

10

20

30

40

50

【0150】

区別なく使用される用語「患者」または「対象」は、哺乳動物を指す。任意の哺乳動物種が治療方法から利益を得ることができる。典型的には、患者はヒトである。患者は、新生児、乳児、小児または青年であり得る。

【0151】

STXB P1 遺伝性障害は、公知の遺伝的変異によって同定され得る。

【0152】

一実施形態では、STXB P1 遺伝性障害は、変異、または変異の組合せを含む病理学的 STXB P1 変異体に関連する。

【0153】

用語「病理学的 STXB P1 変異体」は、患者試料中に見出され、臨床試験または研究を通して同定され、病理学的表現型に関連すると報告されている、STXB P1 の変異体を意味する。病理学的 STXB P1 変異体および可能性のある病理学的 STXB P1 変異体を例 3 に記載し、それぞれ表 5 および表 6 に示す。

【0154】

一実施形態では、病理学的 STXB P1 変異体は、表 5 に列挙される群から選択される 1 つ以上の変異を含む。

【0155】

一実施形態では、病理学的 STXB P1 変異体は、表 6 に列挙される群から選択される 1 つ以上の変異を含む。

【0156】

本明細書に記載の STXB P1 遺伝子療法は、抗てんかん薬または他の神経調節治療と組み合わせて投与され得る。

【0157】

医薬組成物、核酸構築物、ウイルスベクターまたはウイルス粒子は、患者の脳および／または脳脊髄液（CSF）に投与され得る。例えば、それらは注射によって、または目的的特異的投与装置の使用によって投与され得る。脳への送達は、脳内送達、実質内送達、皮質内送達、海馬内送達、被殻内（intrapataminal）送達、小脳内送達およびそれらの組合せから選択され得る。CSF への送達は、大槽内送達、髄腔内送達、脳室内（ICV）送達およびそれらの組合せから選択され得る。

【0158】

治療は単回用量として提供され得るが、例えば、治療が正しい領域を標的としていない可能性がある場合、または将来、および／または異なる AAV 血清型を有する場合、反復用量が考慮され得る。

【0159】

配列

本発明に含まれる配列を表 4 に示す。

【0160】

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 4 : 配列

配列識別子および 名称	配列
配列番号 1 CAG 1.6kb プロモーター	CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCA TTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGAC GTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTAT GCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA TCGCTATTACCATGCGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCC CCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTATGCAGCGAT GGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGG CGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTT CCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGG CG
配列番号 2 hSYN プロモーター	AGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACC GACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCATTCCTCCAAATTGCGCATCCCCAT CAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCCTGAGCTGCGAGCTT ACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCTCAGCACT GAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACCTCCCTTCCCGGCCACCTTG GTCGCGTCCGCGCGCGCGCGGCCAGCCGGACCGCACACGCGAGGCGCGAGATAGG GGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCT

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

	GCGGTGGGCGAGCGGAGGAGTCTGTCTGCTGCCTGAGAGCGCAG
配列番号 3 MECP2 プロモーター	AGCTGAATGGGGTCCGCTCTTTTCCCTGCCTAAACAGACAGGAACCTCTGCCAATTG AGGGCGTACCGCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAGGGTAAT CTCGACAAAGAGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGCTGG TCGGGAGGGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGC
配列番号 4 hNSE プロモーター	ATGCAGCTGGACCTAGGAGAGAAGCAGGAGAGGAAGATCCAGCACAAAAATCCGAAG CTAAAAACAGGACACAGAGATGGGGGAAGAAAAGAGGGCAGAGTGAGGCAAAAAGAGA CTGAAGAGATGAGGGTGGCCGCCAGGCACCTTTAGATAGGGGAGAGGCTTTATTTACCT CTGTTTGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGAGGTAGTCTTGCTTAGT CTCCAGGCTGGAGTGAGTGGCACAATCTCAGCTCACTGCAACTTCCACCTCCTGGGT TCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCATGCAACC AGGCCTGGCTAATTTTTGTATTTTATAGTAGAAACGGGGTTTACCACGTTAGCCAGGA TGGTCTGGATCTCCTGACCTCGTGATCTGCCCCCTCCGCCTTCCAAAGTGCTGGGAT TACAGGGGTGAGCCACAGCGCCTGGTCCCTATTACTTCTGTCTTCTACCTCCAGGAG ATCAAAGACGCTGGCCTTCAGACCTGATCAGACTCCCAGGGGCAGCCACCACATGTAT GACAGAGAACAGAGGATGCCTGTTTTTGCCTCAAGCTGGAATTCATCACAACTGA GGCCCAGGATCTGCTCTGTGCCGGTCTCTGGGCAGTGTGGGGTGCAAGTGGGGTGC CTAGGCCTGAGCGTTGCCTGGAGCCTAGGCCGGGGGCCGCCCTCGGGCAGGCGTGGGT GAGAGCCAAGACCGCTGGGGCGCGGGGTGCTGGTAGGAGTGGTTGGAGAGACTTGCG AAGCGCTGGGTGTTTCGGATTTCGAATAAAGAAACAGAGTGATGCTCTGTGTCTG ACCGGGTTTGTGAGACATTGAGGCTGTCTTGGGCTTCACTGGCAGTGTGGGCCTTCGT ACCCGGGCTACAGGGGTGCGGCTCTGCCTGTTACTGTGAGTGGGTGCGGCCGTGGGT ATGAGCGCTTGTGTGCGCTGGGGCCAGGTCTGTGGGTGCCCCACCCCTTCCCCATCCT CCTCCTTCCCCACTCCACCTCGTCCGTCCCCACCCGCGCTCGTACGTGCGCCTCC GCCGTCAGCTCCTGACTCATCGGGGCTCCGGGTACATGCGGCCGCGCGGCCCTATA GGCGCTCCTCCGCCCGCCCGGGAGCCGCGAGCCGCGCCGCGCCACTGCCACTCCCG CTCTCTCAGCGCCGCGTTCGCCACCGCCACCGCCACCGCCACTACCACCGAGATCTGC GATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCC
配列番号 5 CamKII プロモ ーター	CATTATGGCCTTAGGTCATTCTCATCTCCATGGGGTTCTTCTTCTGATTTTCTAGAAAA TGAGATGGGGGTGCAGAGAGCTTCTCAGTGACCTGCCAGGGTCACATCAGAAATGT CAGAGCTAGAACTTGAACCTCAGATTACTAATCTTAAATTCATGCCTTGGGGGCATGC AAGTACGATATACAGAAAGGATGAATCATTAGGGCAGATGACCAATAGATTTAGGAA AGAAGAGTCCAGGGCAGGGTACATCTACACCACCCGCCAGCCCTGGGTGAGTCCAGC CACGTTACCTCATTATAGTTGCCTCTCTCCAGTCTTACCTTGACGGGAAGCACAGC AGAACTGGGACAGGAGCCCCAGGAGACCAATCTTCATGGTCCCTCTGGGAGGATGG GTGGGGAGAGCTGTGGCAGAGCCTCAGGAGGGGCCCTGCTGCTCAGTGGTGACAGAT AGGGGTGAGAAAGCAGACAGAGTCATTCCGTGAGCATCTGGGTCTGTTTGGTACTTC TTCTCAGCTAAGGTGGCGGTGTGATATGCACAATGGCTAAAAAGCAGGGAGAGCTGG AAAGAAACAAGGACAGAGACAGAGGCCAAGTCAACCAGACCAATTCCCAGAGGAAGCA AAGAAACCATACAGAGACTACAAGGGGAAGGGAAGGAGAGATGAATTAGCTTCCCC TGTAACCTTTAGAACCAGCTGTTGCCAGGGCAACGGGGCAATACCTGTCTCTTACA GGAGATGAAGTTGCCAGGGTAACATACCTGTCTTTCTCAAGGACCATCCAGAATG TGGCACCCACTAGCCGTTACCATAGCAACTGCCTCTTTGCCCCACTTAATCCCATCCC GTCTGTTAAAAGGGCCCTATAGTTGGAGGTGGGGGAGGTAGGAAGAGCGATGATCACT TGTGGACTAAGTTTGTTCGCATCCCCCTTCTCCAACCCCTCAGTACATACCCTGGGG GAACAGGGTCCACTTGTCTCCTGGGCCACACAGTCTGCAGTATGTGTATATAAGGC CAGGGCAAAGAGGAGCAGGTTTAAAGTGAAAGGCAGGCAGGTGTGGGGAGGCAGTT ACCGGGGAACGGGAACAGGGCGTTTCGGAGGTGGTTGCCATGGGGACCTGGATGCTG ACGAAGGCTCGCAGGCTGTGAGCAGCCACAGTGCCTGCTCAGAAGCCCAAGCTCG TCAGTCAAGCCGTTCTCCGTTTGCCTCAGGAGCACGGGCAGGCGAGTGGCCCCTAG TTCTGGGGGCAGC
配列番号 6 内因性 hSTXBP1 プロモーター	TAAAAAGCAATGCCAGTGATTTGGAGGATTTGATGAGATGATGCCCGCAGGTGCTTG GCACGGAGTTTGACACAAGAACTCAGTGTGGTGAATGCACGAATGCAGGTACCCAGC GACAGGGAGGTGCTGTGGGTGGATTACCCCTGGCTTCGCTGCGGCTGGGAGTGGGCGC TGCTAGTAGAGATCTCGCCTCCAAGCTCCTTCCGTGGGCAGGAAAAACGGAAGCTC CCAGAAAGAGAAAGACAGGACCCGAGCGGGGTTTCAGGCAGATGGAGCGCTCGGTA GCCTGTGGCCAGGGATCCCAGCACCGGAAAGAGGAGGCTGGGTACCTTGCGCC CCGGGCGCGCGCGCGCTGAGGTGAGGGGAGGGCGCGGCTCCGCACACGACGAGCGG CCGCTTGGCGCCAGCCGATCTCGGGGGCGGGGTTGAGCTCCGGGCGCAGTGCG ATTGCGGAGGCGAGTGGGTGACGCCAACGGCCGCGCGAGGCCCGCCCCCGGCTTG

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

	CCCCGCCCCCGCGCGCGCGCGGGCGGGGCGAGCCTCGCTCTGGCTCGCGCCGCGCCCC CGCGCCCCAGTCCGCGCGTCACTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGG CTGGCCCGAGCGCGCCACCTGAGGAGGCGGGGGTCCGCGAGCGTTCGCGGGACGAGG AGATCGGAGCGGGGAGACTCGCGCAGCGCC
配列番号 7 ヒト STXBP1	ATGGCCCCATTTGGCTCAAGGCTGTTGTCTGGAGAGAAGATTATGCATGATGTGATAA AGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCATGAG GATGCTGTCTCTCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTG GAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCA CTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGC TAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAAT GAACGTGGTAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTG CATTCTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTCCAAAG CTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCTGGCAGAG CAGATCGCGACCCCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGG AATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCCTATAA AGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATC CTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTA TGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCAT CGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACTGTGGATAGCA CTGCGGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGCTCTCTGAAAGATT TTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCCA GATGCTGAAGAAGATGCCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTG CACCTTGTCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAACTCTGCCGAG TGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCAT GCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTGACGACTTATGACAAAATCCGC ATCATCCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAAAC TGATCCAGCACGCCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTCA CCTCGCGGTGCCCCATCGTACCGATTCCACGCTGCGTCCCGGAGCAAGCCGAGGGG AAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCAGGTGGACTCCGATTATCAAGG ACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAACTACCCTTATATCTC TACCCGTTCTCTGCTCCTTCTCAGCACCACCGCGCTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGG CATAGAACAAGGCCCGAGGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCTCATCATTTTCATCC TTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGG AAAGTGGGAGGTGCTGATAGGTTCTACTCACATTCTTACTCCACCAAAATTTCTCATG GACCTGAGACACCCGACTTCAGGGAGTCTCTAGGGTATCTTTTGAGGATCAGGCTC CAACAATGGAGTGA
配列番号 8 SV40 ポリ A	GATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGT GAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTAT AAGCTGCAATAACAAGTT
配列番号 9 ヒト STXBP1 アイ ソフォーム a	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGEWKVLVVDQLSMRMLSSCKMTDIMTEGITIV EDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFN ELVKSRAAKVIKLTLEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAE QIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTGEGPDKARSQLLI LDRGFDPSSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIA LRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHL HLAEDCMKHQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIR IILLYIFLKNGITTEENLNKLIQHAQIPPEDESEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPER KERISEQTYQLSRWTPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHW HKNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTPTKFLM DLRHPDFRESSRVSFEDQAPTME
配列番号 10 ヒト STXBP1 アイソフォーム b	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGEWKVLVVDQLSMRMLSSCKMTDIMTEGITIV EDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFN ELVKSRAAKVIKLTLEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAE QIATLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTGEGPDKARSQLLI LDRGFDPSSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIA LRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHL HLAEDCMKHQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIR IILLYIFLKNGITTEENLNKLIQHAQIPPEDESEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPER KERISEQTYQLSRWTPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHW HKNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTPQKLLD

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

	TLKKLNKTDEEISS
配列番号 11 ヒト STXBP1 アイソフォーム c	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIV EDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDYALFNELV KSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIA TLCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTGEGPDKARSQLLIILDR GFDPPSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIALRH KHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLA EDCMKHYQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIRIIL LYIFLKNNGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKER ISEQTYQLSRWTPPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHHWN KAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTPQKLLDTLK KLNKTDEEISS
配列番号 12 ヒト STXBP1 アイソフォーム d	MHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVEDINKRREPLPSLE AVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNELVKSRAAKVIKTL TEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLTCATLKEYPA VRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTGEGPDKARSQLLIILDRGFDPPSPVLHE LTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVSQEV RSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHQGT VKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNNGITE ENLNKLIQHAQIPPEDSEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRW TPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHHWNKAPGEYRSGP RLIIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTPKFLMDLRHPDFRESSRVS FEDQAPTME
配列番号 13 ヒト STXBP1 アイソフォーム e	MHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVEDINKRREPLPSLE AVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNELVKSRAAKVIKTL TEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLTCATLKEYPA VRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTGEGPDKARSQLLIILDRGFDPPSPVLHE LTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVSQEV RSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHQGT VKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNNGITE ENLNKLIQHAQIPPEDSEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRW TPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHHWNKAPGEYRSGP RLIIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTPQKLLDTLKLNKTDEEISS
配列番号 14 ヒト STXBP1 アイソフォーム f	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIV EDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFN ELVKSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAE QIATLTCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTGEGPDKARSQLLI LDRGFDPPSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIA LRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHL HLAEDCMKHQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIR IILLYIFLKNNGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPER KERISEQTYQLSRWTPPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHW HKNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIGWPFRTLAR
配列番号 15 ヒト STXBP1 アイソフォーム g	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIV EDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFN ELVKSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAE QIATLTCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTGEGPDKARSQLLI LDRGFDPPSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIA LRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHL HLAEDCMKHQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIR IILLYIFLKNNGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPER KERISEQTYQLSRWTPPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHW HKNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIVPVEAGS
配列番号 16 ヒト STXBP1 アイソフォーム h	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIV EDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFN ELVKSRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAE QIATLTCATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTGEGPDKARSQLLI LDRGFDPPSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRD LSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIK DPMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNNGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEIITN

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

	MAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYP YISTRSSASFSTTAVSARYGHWHKNKAPGEYRSGPRLIIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQ ANGKWEVLIGSTHILTPTKFLMDLRHPDFRESSRVSFEDQAPTME
配列番号 17 AAV9.hu14 DNA 配列	AGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAATTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAAT ACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCAGGCAGTTC CATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATAC AACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGT GACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTCTTTCCAGACTTGTTC ACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCCTCGCATCAACCAAACCGTTATTCA TTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGGCGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACA AACAGGAATCGAGTGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCA CCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAACGCTGTTTTTCCGGGGATCGCAGTGG TGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGTGGCAT AAATTCGTGACGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTA CCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAGCGATAGA TTGTCGCACCTGATTGCGCGACATTATCGCGAGGCCATTTATACCCATATAAATCAGC ATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATATTC TTCCTTTTTCAATATTATGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACA TATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTGAGTGTACAAACCAATTAACC AATTCGACCATTTATCGCGAGGCCATTTATACCTGAATATGGCTCATAAACCCCTTG TTTGCCTGGCGCAGTAGCGCGTGGTCCACCTGACCCCATGCCGAACTCAGAAAGTG AAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGACTCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCC AGGCATCAAAATAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCTTTTCGCCCGGGCTAAT TAGGGGTGTCGCCCTTCGCTGAAGTCTGTATTAGAGGTACGTGAGTGTTTTGCGA CATTTTGGCAGACCATGTGGTCACGCTGGGTATTTAAGCCGAGTGAGCACGCAAGGT CTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGCATGCCGGGTTTTACGAGAT TGTGATTAAGGTCCCCAGCGACCTTGACGAGCATCTGCCCGGCATTTCTGACAGCTTT GTGAACTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGA ATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCGGACTTCTGAC GGAATGGCGCGTGTGAGTAAGGCCCGGAGGCCCTTTTCTTGTGCAATTTGAGAAG GGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGCTCGTGGAACACCGGGGTGAAATCCATGG TTTTGGGACGTTTCTGAGTCAGATTCCGCAAAAACCTGATTACAGAGAATTTACCGCGG GATCGAGCCGACTTTGCCAACTGTTTCGCGGTACAAAGACCAGAAATGGCGCCGGA GGCGGGAACAAGGTGGTGGATGAGTGCTACATCCCAATTACTTGCTCCCCAAACCC AGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAATATGGAACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAA TCTCAGGAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTGCGAGACGCAG GAGCAGAACAAAGAGAATCAGAAATCCCAATTCTGATGCGCCGGTGATCAGATCAAAA CTTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTGGGTGGCTCGTGACAAGGGGATTACCTCGGA GAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCTCATACATCTCCTTCAATGCGGCCCTCAAC TCGCGGTCCCAATCAAGGCTGCCCTTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTA AAACCGCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCAATCG GATTTATAAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCCCAATATGCGGCTTCCGTCTTT CTGGGATGGGCCACGAAAAAGTTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGGCCTG CAACTACCGGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCATAGCCACACTGTGCCCTTCTACGG GTGCGTAAACTGGACCAATGAGAATTTCCCTTCAACGACTGTGTGACAAGATGGTG ATCTGGTGGGAGGAGGGAAGATGACCGCAAGGTCGTGGAGTCCGCCAAAGCCATTCT TCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCAAGTCTCGGCCAGATAGACCC GACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACCTCA ACGACCTTCGAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTCAAATTTGAATCAGCCC GCCGTCTGGATCATGACTTTGGGAAGGTACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCG GTGGGCAAGGATCAGTGGTTGAGGTGGAGCATGAATTTACGTCAAAAAGGGTGGGA GCCAAGAAAAGACCCGCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGCGCG AGTCAGTTGCGCAGCCATCGACGTGACGCGGAAGCTTTCGATCAACTACGCAGACAG GTACCAAAAACAAATGTTCTCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTTCCCTGCAGA CAATGCGAGAGACTGAATCAGAATTCAAATATCTGCTTCACTCAGGTGTCAAAGACT GTTTAGAGTGCTTTCCCGTGTGAGAATCTCAACCCGTTTCTGTGCTCAAAAAGGCGTA TCAGAAACTGTGCTACATTCATCACATCATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGCAGTGTCT TGCGACCTGGTCAATGTGGAATTTGGATGACTGTGTTTCTGAACAATAAATGACTTAAA CCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTTAGTGAAG GAATTCGCGAGTGGTGGGCTTTGAAACCTGGAGCCCTCAACCAAGGCAATCAACA

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

ACATCAAGACAACGCTCGAGGTCTTGTGCTTCCGGGTACAAATACCTTGGACCCGGG AACGGACTCGACAAGGGGAGCCGGTCAACGCAGCAGACGCGCGGCCCTCGAGCAG ACAAGGCTTACGACCAGCAGCTCAAGGCCGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCA CGCCGACGCGAGTTCCAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTC GGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGG AAGCGGCTAAGACGGCTCCTGGAAGAAGAGGCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGAACC GGACTCCTCCGCGGGTATTGGCAAATCGGGTGCACAGCCCGCTAAAAAGAGACTCAAT TTCGGTCAGACTGGCGACACAGAGTCACTCCAGACCTCAACCAATCGGAGAACCTC CCGACGCCCCCTCAGGTGTGGGATCTCTTACAATGGCTTCAAGTGGTGGCGCACCACT GGCAGACAATAACGAAGGTGCGGATGGAGTGGTAGTTCCTCGGGAATTTGGCATTGC GATTCCCAATGGCTGGGGGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGC CCACCTACAACAATCACCTCTACAAGCAAATCTCAACAGCAGATCTGGAGGATCTTC AAATGACAACGCTACTTCCGCTACAGCACCCTCGGGGTATTTTGAATTCACAGA TTCCACTGCCACTTCTCACCAGTGACTGGCAGGACTCATCAACAACAATGGGGAT TCCGGCCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAAGTCAAAGAGGTTACGGA CAACAATGGAGTCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGGTCCAGGTCTTCACG GACTCAGACTATCAGCTCCCGTACGTGCTCGGGTCCGCTCACGAGGGTGCCTCCCGC CGTTCCAGCGGACGTTTTCATGATTCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGG AAGCAGGCGTGGGTGCTTCTGCTCTTTACTGCTGGAATATTTCCGCTCGCAAATG CTAAGAACGGGTAACAATTCAGTTCAAGTACGAGTTTGAAGAGTACCTTTCCATA GCAGTACGCTCACAGCCAAAGCCTGGACCGACTAATGAATCCACTCATCGACCAATA CTTGTAATCTCTCAAAGACTATTAACGGTTCTGGACAGAATCAACAACGCTAAAA TTCAAGTGTGCGCGGACCCAGCAACATGGCTGTCCAGGAAGAAGTACATACCTGGAC CCAGCTACCGACAACAACGTGCTCAACCAGTGTGACTCAAAACAACAACAGCGAATT TGCTTGGCCCTGGAGCTTCTTCTTGGGCTCTCAATGGAGCTAATAGCTTGATGAATCCT GGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAGAAGGAGAGGACCGTTCTTCTCTTGTCTGGAT CTTTAATTTTTGGCAAACAAGGAACCTGGAAGAGACAAGCTGGATGCGGACAAGTCA GATAACCAACGAAGAAGAAATTAAGTACTAACCCTAGCAACGGAGTCCCTATGGA CAAGTGGCCACAAACACAGAGTGCCTAAGCACAGGCGCAGACCGGCTGGGTCAA ACCAAGGAATACCTCCGGGTATGGTTTGGCAGGACAGAGATGTGATCTGCAAGGACC CATTTGGCCAAATTCCTCACAGCGGACGCAACTTTCAACCTTCTCCGCTGATGGGA GGGTTTGAATGAAGCACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTGTACCTG CGGATCCTCCAACGGCCTTCAACAAGGACAAGCTGAACCTTTTCATCACCAGTATTC TACTGGCCAAGTCAAGCTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAAGGAAACAGCAAGCGC TGGAACCCGAGATCCAGTACACTTCCAATATTACAAGTCTAATAATGTTGAATTTG CTGTTAATACTGAAGGTGTATATAGTGAACCCGCCCCATTGGCACCAGATACCTGAC TCGTAATCTGTAATGCTTGTAAATCAATAAACCGTTAATTCGTTTCAGTTGAACTT TGGTCTCTGCGCGTCAAAGGGCGACACAAATTTATCTAATGATGAATAATAACT GATAACATCTATAGTTTGTATTATTTTGTATTATCGTTGACATGTATAATTTGA TATCAAAAACGTGATTTCCCTTATTTATTTTCGAGATTATTTCTTAATCTCTTTA ACAACTAGAAATATTGTATATACAAAAATCATAAATAATAGATGAATAGTTTAATT ATAGGTGTTTCAATCGAAAAAGCAACGTATCTTATTTAAAGTGCCTTGCTTTTTTC TCATTTATAAGGTTAAATAATTCTCATATATCAAGCAAAGTGACAGGCGCCCTTAAAT ATTTGACAAATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCATAAAAAACCCGCGGAGCGGGT TTTTACGTTATTTGCGGATTAACGATTACTCGTTATCAGAACCGCCAGGGGGCCGA GCTTAAGACTGGCCGTCGTTTTACAACACAGAAAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAGGC CATCCGTCAGGGGCTTCTGCTTAGTTTGTGCTGGCAGTTCCCTACTCTCGCCTTC CGTTCTCTGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCA GCTCACTCAAAGGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGA ACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGC GTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCA AGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCC TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCC TTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCTGTTAG GTCGTTCTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCGGACCGCTGCG CCTTATCCGGTAACCTGCTTGTAGTCAACCCGGTAAGACAGACTTATCGCCACT GGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAG TTCTTGAAGTGGTGGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCG CTCTGCTGAAGCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACA AACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACG	10	20	30	40
---	----	----	----	----

【表 4 - 7】

	ACGCGCGCGTAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGCTTGCGCCGTCCCGTCAAG TCAGCGTAATGCTCTGCTT
配列番号 18 3'ITR	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA GGCCGGGCGACAAAGGTGCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGCGGCCCTCAGTGAGC GAGCGAGCGCGC
配列番号 19 5'ITR	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGCGACCTTT GGTCGCCCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCA CTAGGGGTTCCCT
配列番号 20 AAVtt	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWKKLPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLPGPFNG LDKGEFVNEDAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLYKNHADAQERLKEDETSFGGNLGR AVFQAKKRILEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKSGQQPARKRLNFG QTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGGLGTNTMASGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDS TWMGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCH FSPRDWQRLINNNWGFPRKRLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEY QLPYVLGSAHQGLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTG NKFTHSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTMSRLQFSQ AGASDIRDQSRNWLPGCYRQQRVSKTAADNNNSDYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPA MASHKDDEEKYFPQSGVLI FGKQDSGKTNDIEKVMITDEEEIRTNPVATEQYGSVS TNLQSGNTQAATS DVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP I WAKI PHTDGHFHPSPLMGGFG LKHPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWN EIQYTSNYSNVNVDFTVDNNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
配列番号 21 AAV9	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGPNG LDKGEFVNADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYKNHADAQERLKEDETSFGGNLGR AVFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKRLNFG QTGDTESVDPDQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGNSSGNWHCDS QWLGD RVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFH CHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLSTVQVFTDS DYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSAQAVGRSSFYCLEYFSPQMLR TGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTNGSGQNQQT LKFS VAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGP AMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYQV ATNHQSAQAQATGWVQNGILPGMVWQDRDVYLQGP I WAKI PHTDGNFHPSPLMGGF GMKHPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWN PEIQYTSNYKSNNEFAVNTGTVYSEPRPIGTRYLTRNL
配列番号 22 アイソフォーム a をコードするヒト STXBP1 (転写物変 異体 1)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACC TGAGGAGGCGCGGGGTCCGCGAGGCGTGC GGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTGGCCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAAGATTATGCA TGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGATCAG TTAAGCATGAGGATGCTGTCTCCTCCTGTCGAAGATGACAGACATCATGACCGAGGCA TAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCGAGCCTGGAGGCTGT GTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGAC CCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGCTCTTCTCACTGACTCTTGTCCAGATG CCCTGTTTAATGAAC TGGTAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAAACTCTGACGGA AATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGTGAC TCTTTCCAAAGCTTTACAGTCCCAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGC GCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCGGCTGTGCG GTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTC GATGCCATATAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCC AGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGAC TTTTAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCATCGAAAATGATGTATACAAAGTATGAG ACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGAGACC TGTGGATAGCACTGCCCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTC TCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGG GACCTGTCCAGATGTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACT CCACCCACCTGCACCTTGTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAA ACTCTGCCAGTGAGGACGAGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATC AAGGACCTATGCGAGCCATCGTCCCATTTCTGCTGGATGCCAATGTGACACTTATG ACAAAATCCGCATCATCTTCTTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAA CCTGAACAACTGATCCAGCAGCGCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACC AACATGGCTCACCTCGCGGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCGCCGGAGCA

10

20

30

40

【表 4 - 8】

	AGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCC GATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAAACTTGACACCAAACTAC CCTTATATCTCTACCCGTTCCCTGCTCCTTCAGCACCACCGCCGTCAGCGCCGCT ATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCGCTCAT CATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACC CAGGCCAACGGAAGTGGGAGGTGCTGATAGGTTCTACTCACATTCTTACTCCACCA AATTTCTCATGGACCTGAGACACCCCGACTTCAGGGAGTCTCTAGGGTATCTTTTGA GGATCAGGCTCCAACAATGGAGTGAGAGCCAAAGAAACAAAGATCCACACATCCTC ACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAA GCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAAAACACGCCCCCATCCACAGCGCTCCGCA GCTTCCACCACCGCCCGCTCAGTTCCCTTGCGTCTGTTGCCCTCCACAGCCTGCAC GCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTCAGTGATGCCCTCTTCTGTT TGAAACAAAAGAAAATAATGCATGTGTGTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATC CTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTA GGATGAATGGACGCTTCTCCCGTTATTAAAGATTGTGACCTTGTACATAACCCCTG GGTGACGTGCACATTGCTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCT TGTTTTGGGTTTCTGTCCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGT ATTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTG CTCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGG AACAGACCTTGTGCTTCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGACGTGTGGGTGG AGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCACAGCCTGTCACTGCC CCCTCCCCAGCCTGTGTCCACAGTGTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGT CACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTGGAA AAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAAC AGCTCATTTTTCCCTAGTCCGCTTCTGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGG GTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGG ACTCACACAGACCCCTGTACCCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTT CAGATACTTCATAATACCTTGTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTGTTGTAAGAG AAGATGGTCATTTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGC AAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGG TGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTTGTCGTGAATATATAACAGTGAAGTCAC AAAAATGTCCCTGCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGT ATTACTGTCTAGTGATGCTCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCG CCTCCCTTTAGAGCCTGCTCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTT CTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCAGTGAATAGTCTGATCTCTCCCGCTCT CCCTCCCACTTATACGACCTGATTTCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGG GCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCTCTCCCTCGGACCAAAACAGTGCTCATGCT TCAGGACCTTGTGTCGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAAT AATTTATCAAAAGGATATTTTAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACCTGTTTACCTTAA AATTATCAGAACTCAGTGTGTTGAAAGTACTGAAGCACAACATATATCATCTCTGTA CCATTCGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAGAAATCAGCACCCCT	10
	AGTTCGTCCTTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACC TGAGGAGGCGGCGGGTCCGCGAGCGCTGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAAGATTATGCA TGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAG TTAAGCATGAGGATGCTGCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCA TAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCGAGCCTGGAGGCTGT GTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGAC CCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATG CCCTGTTTAACTGAACTGGTAAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGA AATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCCTTGGAATCTGCTGAC TCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCTTATCTGGAGC GCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCG GTATCGGGGGGAATACAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTC GATGCCATATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCC AGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGAC TTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAG ACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACC TGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTC TCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGG	20
配列番号 23 アイソフォーム b をコードするヒト STXBP1 (転写物変 異体 2)	AGTTCGTCCTTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACC TGAGGAGGCGGCGGGTCCGCGAGCGCTGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAAGATTATGCA TGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAG TTAAGCATGAGGATGCTGCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCA TAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCGAGCCTGGAGGCTGT GTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGAC CCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATG CCCTGTTTAACTGAACTGGTAAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGA AATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCCTTGGAATCTGCTGAC TCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCTTATCTGGAGC GCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCG GTATCGGGGGGAATACAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTC GATGCCATATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCC AGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGAC TTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAG ACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACC TGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTC TCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGG	30
	AGTTCGTCCTTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACC TGAGGAGGCGGCGGGTCCGCGAGCGCTGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAAGATTATGCA TGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAG TTAAGCATGAGGATGCTGCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCA TAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCGAGCCTGGAGGCTGT GTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGAC CCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATG CCCTGTTTAACTGAACTGGTAAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGA AATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCCTTGGAATCTGCTGAC TCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCTTATCTGGAGC GCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCG GTATCGGGGGGAATACAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTC GATGCCATATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCC AGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGAC TTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAG ACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACC TGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTC TCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGG	40

【表 4 - 9】

	GACCTGTCCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAAGAGCTCAGCAAGTACT CCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAA ACTCTGCCGAGTGAGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATC AAGGACCCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATG ACAAAAATCCGCATCATCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAA CCTGAACAACTGATCCAGCACGCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACC AACATAGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGCTGCGCGGAGCA AGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCC GATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAAACTTGACACCAAAACACTAC CCTTATATCTCTACCCGTTCCCTTGCCTCCTTCAGCACCACCGCCGTCAGCGCCCGCT ATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCGAGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCTCAT CATTTTCATCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCTACGAGGTGACC CAGGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGGATCCACACACATCCTCACCACACAGA AACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAA AATAAGCTGCCCTCCAAAACAGGCCCCCATCCACAGCGCTCCGAGCTTCCACC ACCGCCCGCCTCAGTTCTTTGCGTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTG GCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTCAGTGATGCCCTCTCTTGTGTTGAAACAAAA GAAAAATAATGCATTGTGTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAG AAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGG ACGCCCTCTGCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTGTACATAACCCGGGTGACGTGC ACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTGTTGGGGT TGTTCTCTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACT GAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCCTGCTCTCATCCA AATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTC TTTGCCCTTTCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGT GTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCCAG CCTGTGTCCACAGTGCTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCT TGACAGGTGAGAAGCAAACTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTTTGGAAAAACAGTTAG TCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTT CCCTAGTCCGCCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGG CCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAG ACCCGTGACCCCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTC ATAATACCTTGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAGATGGTCA TTTTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAATGCAGGA AGGCTCTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACC ATTTGTGCTGCTGCTGTTGTGCTGAAATATAATAACAGTGGAAAGTCACAAAAATGTCC CCTGCCCAGGCCCTCGCGGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCT TAGTGATGTCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCTCCCTTTC AGAGCCTGCTCCCGGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTCTCAAGGCTT TGAAATCTCCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTGAGTCTCTCCCCGTCTCCCTCCCAAC TTATACGACCTGATTTCCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACT CCCGCTGCTTGTCTGTCCCCCTCCCTCGGACCAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTT GTTTGTGCAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAATTTATCAA AAGGATATTTTAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACTTGTGTACCTTAAATATATCAGA ATCTCAGTGTTTGAAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTGTACCATCTGTGA CTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT	10
	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCCAGCGGCCACC TGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCGAGCGTCCGCGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAAGATTATGCA TGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAG TTAAGCATGAGGATGCTGTCCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCA TAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGT GTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGAC CCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACAGTCTTCTTCACTGACTATGCCCTGTTTA ATGAACTGGTAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATAT TGCATTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAA AGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAG AGCAGATCGCGACCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGG GGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCCTAT AAAGCTGATGATCCAACATGGGGGAGGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGA	20
配列番号 24 アイソフォーム c をコードするヒト STXPB1(転写物変 異体 3)		30
		40

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 0】

	TCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGC TATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAGTATGAGACCAGCGGC ATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACACCTGTGGATAG CACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTACCCGGTCTCTGAAAGA TTTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCC CAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACC TGCACCTGTCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAAACTCTGCCG AGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCT ATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACAAAATCC GCATCATCCTTCTCTACATCTTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAA ACTGATCCAGCACGCCCAGATACCCCGAGGATAGTGAGATCATCACCACATGGCT CACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTGCCTGGAGCAAGCCGGAGC GGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAA GGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAACTACCCTTATATC TCTACCGTTCTCTGCTCCTTCAGCACCACCGCGCTCAGCGCCCGCTATGGGCAC GGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCTCATCATTTTCAT CCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCTACGAGGTGACCCAGGCCAAC GGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGGATCCACACACATCTCACCACAGAAACTGCTGG ACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGT GCCCTTCCAAAACACGCCCCCATCCACAGCGCTCCGAGCTTCCACACCGCCCGC CTCAGTTCCCTTGGCTGTGTGCTCCTCCCGAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTG CCGCTGCATTCTCGTGTTCAGTGTGCTCCTCTCTGTTTGAACAAAAGAAAATAAT GCATTGTGTTTTTTAAAAGAGTATCTTATACATGTATCTAAAAAGAGAAGCTCATG TGCAATTGGTGACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTAGGATGAATGGACGCTTCT CCCCGTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAACCTGGGTGACGTGCACATTGCTT GGGTATGGAACGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTGTTTGGGGTGTTCCTGT CCTTGTGAGAATCATAGAGATGCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTGAGGACTAA TCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCAAATAACCT GGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCCTT CCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACG AAGTCAGGCCAGCGTCTCCTCCACAGCTGTCACTGCCCTCCCGAGCTGTGTCC ACAGTGTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCTGACAGGTG AGAAGCAAACTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCC TGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCAGGCATCATCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCC GCCTTCGTTCAAGGGTCAAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTCTGGAGGCCCTGAAC AGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTAC CCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCT TGTGTTGTGTGGGTCATACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCT CTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAATGCAGGAAGGCTGTCT CGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCT GCTGCTGTGTGCTGAAATATAATAACAGTGAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCAG CCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGATTACTTGTCTAGTGATGT CCTCTCAAAGTGTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCTCCCTTTCAGAGCCTGC TCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGTGTTCTCTTCAAGGCTTTGAAATCTC CCCTTGCACTGAGATTAGTCGTGATCTCTCCCGTCTCCCTCCCACTTATACGAC CTGATTTCCCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCT TGTTCTGTGCCCTCCCTCGGACCAACAGTGTCTGCTCAGGACCTTGTGTGTCGA AGATGTGGTTTCCCTTCTCTGTTATTTATATAAAAATAATTTATCAAAGGATATT TTAAAAAGCTAGTCTGTCTGAAACTTGTTTACCTTAAATATCAGAATCTCAGTG TTTGAAAGTACTGAAGCACAACATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCAC TTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT	10
		20
		30
配列番号 25 アイソフォーム d をコードするヒト STXBP1 (転写物変 異体 4)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACC TGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCGAGGCTGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAGAAAGAGAA GACTACCTAGACATGTTGCTCCAGAGCAGAAATTTCCAGCAGTAGATTGAACCTTCGGA GGCCGAGTCCCAGCCAGTGTAAGTGAAGTATGATGATGTGATAAAGAGGTCAA GAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCC TCCTGTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCA ATAAGCGCAGAGCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGA GAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCGCGGACTGCTAAATACCGG	40

10

20

30

40

【表 4 - 1 1】

	GCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTAATGAACTGGTAA AATCCCAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCC GTATGAATCCCAGGTCTATCTCTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGT CCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGA CCCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGA CAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGAT CCAACAATGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAG GCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGA TCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGCATCGGGGAGGCA CGGGTGAAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACA AGCACATCGCAGAGGTGTCCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAG CAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCAGATGCTGAAG AAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTG AGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGA CCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCCTATGCGAGCCATC GTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTC TCTACATCTTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCA CGCCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTG CCCCTCCTCACCGATTCCACGCTGCGTCGCGGAGCAAGCCGAGCGGAAGGAACGCA TCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGA GGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAACTACCCCTTATCTCTACCCGTTC TCTGCCCTCCTCAGCACCCCGCCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACA AGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCGCTCATCTTTTCATCCTTGGGGGTGT GAGCCTCAATGAGATGCGCTGCGCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAGTGGGAG GTGCTGATAGGTTCTACTCACATTCTTACTCCCACTAAATTTCTCATGGACCTGAGAC ACCCCGACTTCAGGGAGTCTCTAGGGTATCTTTTGAAGATCAGGCTCCAACAATGGA GTGAGAGCCAAAGAAACAAAGATCCACACACATCCTACCCACAGAACTGCTGGAC ACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGC CCCTCCAAAACACGCCCCATCCCACAGCGCTCCGCGCTTCCCACCACCGCCCGCT CAGTTCTTTGCGTCTGTGCTCCTCCAGCCCTGCAGCCCTGGCTGGCACTGTGCGC GCTGCATTCTCGTGTTCAGTGATGCCCTCTCTTGTGTTGAAACAAAAGAAAATAATGC ATTGTGTTTTTAAAAAGATATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTG CAATTGGTGACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCTTCTCC CCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTTGTACATAACCCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGG GTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTGTTGGGGTTGTTCTGTCC TTGTTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTGAGGACTAATC TGCTATCTTCAATCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGG AGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCCTTCC CAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGACGTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAA GTCAGGCCAGCGTCTCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCTGTGTCCAC AGTGCTGTGATCCCGAGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAG AAGCAAATCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTG TGGCCCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGC CTTCGTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTCTGGAGGCCCTGAACAG AGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCC TCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTG TGTTGTGTGGGTCATACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCT GTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCG CCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTGTGCTGC TGCTGTTGTGCGTGAATATAATAACAGTGAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCAGCC CCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCC TCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCTCCCTTTAGAGCCTGCTC CCGCGCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCC CTTGCACTGAGATTAGTCGTGATCTCTCCCCGTCTCCCTCCCACTTATACGACCT GATTTCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGCGCTTACTCCGCTGCTTG TTCTGTCCCCCTCCCTCGGACCAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTGTCGAAG ATGTTGTTTCCCTTTCTGTATTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTT AAAAAGCTAGTCTGTCTGAACTTGTGTTTACCTTAAATATCAGAATCTCAGTGTT TGAAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTT GAGTCTAATAATAAAGAAATCAGCACCCCT
--	---

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 2】

配列番号 26 アイソフォーム d をコードするヒト STXBP1 (転写物変 異体 5)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACC TGAGGAGGCGCGGGGTCCGAGGCGTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAGATATATACC TAGGAATGGAGTTGCTGGATCTCTATGTTTGGTTATTTGAGGAGCTGCCGGCCTGTTT TCCACATCAGCTGTACCATTTTACATTCTCACCAGCAGTGCATGACGGTCCAGTGCCT TTTTATCTTACTGCGCTTAAGGTGTAATTCCCTCTTTCTCAGACTGGACTGTAAATTC TTTGAGAGATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGT GCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCTCTGTCGCAAGATGACAGAC ATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCC CCAGCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCAT CAGTGACTTTAAGGACCCGCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACT GACTCTTGTCAGATGCCCTGTTTAAATGAAGTGGTAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCA TCAAACCTCTGACGGAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTTC CTTGAGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAG AATCCTATAGTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTGTGCCACCCGGAAGG AGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCT AATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAACATGGGGGAGGGCCCCA GACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTTG TGCTCCATGCAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGA TGTATACAAGTATGAGACCAGCGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTG GACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAGCACATCGCAGAGGTGTCCC AGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGA GAAGACCACATGCGGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAA GAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACC AAGGCACCGTAGACAACTCTGCGGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGC TGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCC AATGTCAGCTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATG GCATCAGCGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCAGCGCCAGATACCCCCGGAGGA TAGTGAGATCATCACAACATGGCTCACCTCGCGGTGCCCATCGTCACCGATTCCACG CTGCGCTCGCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGC TCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACT TGACACCAACACTACCCCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCTCCTTCAGCACCCACC GCCGTCAGCGCCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCGCA GTGGCCCCCGCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTG CGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGGTTCTACTCAC ATTTCTTACTCCCAAAATTTCTCATGGACCTGAGACACCCCGACTTCAGGGAGTCCT CTAGGGTATCTTTGAGGATCAGGCTCCAACAATGGAGTGAGAGCCAAAGAAACAAAG ATCCACACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAA ACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAAACACGCCCCCAT CCCACAGCGCTCCGAGCTTCCCACACCGCCCGCTCAGTTCCCTTTGCGTCTGTTGC CTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTCACTG ATGCCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTAAAGAGT ATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGACAGCAGGAGA AATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCTTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGAC CTTGATACATAACCCCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTG GGTGTTTTTAAACCTTGTGTTGGGGTGTTCCTGTCTCTGTTGAGAATCATAGAGATG TCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCC TACCCCTCAGTGCTGCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTC AGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTGCCTTTCCAGCGTCTCATACCCCGGTA GTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCTCC ACAGCTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCTGTGTCCACAGTGTGTGATCCCGAGGGAA GTCTCCAGCTTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACTCCGCTGGAAGC CTCCATCTCTTTGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCC CAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCTTCGTTCAAGGGTCAGGAAT GGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAG GTTCTTGGCCCGTTGACTCACACAGACCTGTACCTCTCGGCAAGCATTTTCAGTC AGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGGGGTGCATACATC ATCGTGTTTGAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAG CAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGC TCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTGTGCTGCTGCTGTGTCGTGAAATATAA TAACAGTGGAAGTCACAAAATGTCCCTGCCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCC
---	--

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 3】

	TGCAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAG CTCGGGGCCACCTCCGCCCTCCCTTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTGTGCTCGTGC ATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCAGTATGAGATTAGTCGTC AGATCTCTCCCGTCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTTCCTTAGGACGGAACCG CAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCCCTCCCTCGGACC AAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTTCGCGAAGATGTGGTTTCCCTTCTCTG TTATTTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGA AACTTGTTTACCTTAAAATTATCAGAATCTCAGTGTGAAAGTACTGAAGCACAAC ATATATCATCTCTGTACCATCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAAT CAGCACCCCT
配列番号 27 アイソフォーム e をコードするヒト STXBP1 (転写物変 異体 6)	AGAAAGAGGAAAGACAGGACCCGAGCGGGTTTCAGGCAGATGGAGCGCGTCGGTAGC CTGTGGCCAGGGATCCCAGCACCGACGGGAAAGAGGAGGCTGGGTACCCTGCGCCCC GGGCGCGCGCGCGCGTGAAGATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAG GGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCTCTGCT GCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCG CAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCC GTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCGACTGCTAAATACCGGGCTGCAC ACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTAATGAACCTGGTAAATCCCG AGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTCTCCCGTATGAA TCCAGGCTCTATCTTGGACTCTGTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACA AGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTTG TGCCACCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGAATACAAGGACAATGCC CTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCATATAAGCTGATGATCCAACAA TGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGA CCCCAGCTCCCCGTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGTG CCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGA AGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACAT CGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGA ATGAATCTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGC CTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTG TATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAACTCTGCCGAGTGAGCAGGACCTGGCC ATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGTCAAGGACCCATGCGGAGCCATCGTCCCCA TTCTGCTGGATGCCAATGTGACACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACAT CTTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCAGCGCCAG ATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCG TCACCGATTCCACGCTGCGTGCCTGCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGA CGACACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACT ATTGAGGACAACTTGACACCAACACTACCCCTTATATCTTACCCGTTCCCTCTGCCCT CCTTCAGCACCCCGCCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCC AGGCGAGTACCCAGTGCGCCCCGCCCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTG AATGAGATGCGCTGCGCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGCTGA TAGGATCCACACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAA TAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAAACACGCCC CCATCCACAGCGCTCCGAGCTTCCACACCGCCCGCCTCAGTTCTTTGCGTCTG TTGCCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTC AGTGATGCCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTAAAAA GAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGACAGCAG GAGAAATTTCTGGACTGTAGGATGAATGGACGCCCTCTCCCCGTTATTTAAGATTTG TGACCTTGTACATAACCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAA TTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTGTTGGGGTGTTCCTGTCTTGTGAGAATCATAGA GATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCTATCCAG TCCCTACCCCTCAGTGCTGTCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATA TCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCCTTCCAGCGTCTCATACCCCG GGTAGTGACAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCT CTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCGAGCCTGTGTCCAGATGCTGTGATCCCGAG GGAAGTCCCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACTCCCGCTGG AAGCCTCCATCTCTTTGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTG TCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCTTCGTTCAAGGGTCAG GAATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGA GAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCCTCTCGGCAAGCATCTTC

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 4】

	AGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCATA CATCATCGTGTTTGTAAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAAACTTAGCTCT AAAGCAGAAACTAAAGCAGCAAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAG CAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTGTCTGAAAT ATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGAC CTCCTGCAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCCTCTCAAAGTGCTGTACG CGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCCTCCCTTTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCG CTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCACTGAGATTAGT CGTCAGATCTCTCCCCGTCTCCCTCCCAACTTATACGACCTGATTTCCTTAGGACGGA ACCGCAGGCACCTGCGCGGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCCCTCCCTCG GACCAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTGTTTGTGGAAGATGTTGGTTTCCCTTTC TCTGTTATTTATATAAAAAATAATTTATCAAAGGATATTTTAAAAAGCTAGTCTGTC TTGAACTTGTTTACCTTAAAAATATCAGAATCTCAGTGTGTAAGTACTGAAGCAC AAACATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAG AAATCAGCACCCCT
配列番号 28 アイソフォーム e をコードするヒト STXBP1(転写物変 異体 7)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCCCCACC TGAGGAGGCGGCGGGGTCGCGAGGCGTTCGCGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAGATATATACC TAGGAATGGAGTTGCTGGATCTCTATGTTTGGTTATTTGAGGAGCTGCCGGCCTGTTT TCCACATCAGCTGTACCATTTTACATTCTCACCAGCAGTGATGACGGTCCAGTGCCT TTTTATCTTACTGCGCTTAAGGTGTAATTCCTTCTTCTCAGACTGGACTGTAAATTC TTTGAGAGATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGT GCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCCTGCTGCAAGATGACAGAC ATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCC CCAGCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCAT CAGTGACTTTAAGGACCCGCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGCTCTTCTCACT GACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAATGAAGTGGTAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCA TCAAACCTCTGACGGAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCT TTGGACTCTGTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCAAGGCTCAGATGAAG AATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTGTGCCACCCCTGAAGG AGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCT AATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGAGGGCCCA GACAAGCACAGTCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTGGACCCAGCTCCCTG TGCTCCATGAATTGACTTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCATCGAAAATGA TGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTG GACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCC AGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGA GAAGACCACCATGCGGGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCCTCAGTACCAGAAA GAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGTGAGGACTGTATGAAGCATTACC AAGGCACCGTAGACAACTCTGCGGAGTGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGC TGAGGGGAGAGAAGATCAAGGACCCATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCC AATGTGAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATG GCATCAGGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCCAGATACCCCGGAGGA TAGTGAGATCATCACCACATGGCTCACCTCGGCGTGCCATCGTCACCGATTCCACG CTGCGTCGCGCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGC TCTCAGGTTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACT TGACACCAAAACACTACCCTTATATCTCTACCCGTTCCCTCTGCTCCTTACGACACC GCCGTGAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCGCA GTGGCCCCCGCCTCATATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTG CGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGGATCCACACAC ATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAG AAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCTCCAAACACGCCCCATCCCACAGCGC TCCGCAGCTTCCACACCGCCCGCCTCAGTTCCCTTTCGCTGTGTTGCCCTCCCGAGCC CTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGTGCATTTCTCGTGTTCAGTGATGCCCTCTT CTTGTGTTGAAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACA TGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCATTTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGA CTGTTAGGATGAATGGACGCTTCTCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATA ACCCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTA AAACCTTGTGTTGGGGTTGTTCTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCT TGGAGTATTTCACTGAGGACTAATCTGTATCTTCATTGCAGTCCTACCCCTCAG

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 5】

	TGCCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCA AGGTGGAACAGACCTCTTTGCCCTTTCCCAGCGTCTCATAACCCCGGTAGTGACAGTGT GGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCACAGCCTGTC ACTGCCCCCTCCCAGCCTGTGTCCACAGTGTGTATCCCGAGGGAAGTCTCCAGT CTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAATCCCCTGGAAGCCTCCATCTCT TTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCAGGCATCAT CCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAAC AGATGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCC CGTTGGACTCACACAGACCTGTACCCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCT CAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTG TAAGAGAAGATGGTCATTTTATCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAA AGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTC CAGTGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTTGTCGTGAAATATAATAACAGTGGA AGTCACAAAAATGTCCCCGCCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCAT GTGTGTATTACTGTCTAGTGATGTCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCA CCTCCGCCCTCCCTTTCAGAGCCTGCTCCCGGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGT TCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCCCTGCACTGAGATTAGTCGTGAGATCTCTCC CCGTCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTTCCCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTG CGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCCCTCCCTCGGACCAAACAGTGCT CATGCTTCAGGACCTTGTGTTGTGGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATAT AAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACTTGTTTA CCTTAAATTTATCAGAACTCTCAGTGTGTTGAAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATC TCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAATAAAGAAATCAGCACCCCT	
配列番号 29 アイソフォーム e をコードするヒト STXBP1 (転写物変 異体 8)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACC TGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTCCGCGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAGAAAGAGGAA GACTACCTAGACATGTTGCTCCAGAGCAGAATTTCCAGCAGTAGATTGAACCTTCGGA GGCCGAGTCCCAGCCCAGTGTAAGTGAAGTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAA GAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCC TCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCA ATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGA GAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAAATACCGG GCTGCACAGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAAATGAAGTGGTAA AATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAATCAATATTGCATTCTCCC GTATGAATCCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTCCAAAGCTTCTACAGT CCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCTGGCAGAGCAGATCGCGA CCCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGA CAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGAT CCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAG GCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGA TCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCA CGGGTGAAGGAGGTGCTCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACA AGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCAACCGGTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAG CAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCAGATGCTGAAG AAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTG AGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGA CCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCTATGCGAGCCATC GTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTGACGACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTC TCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCA CGCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATACCAACATGGCTCACCTCGGCGTG CCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTTCGCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCA TCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCAGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGA GGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAACACTACCCTTATATCTTACCCGTTCC TCTGCCCTCTTACGACACCACCGCGTACGCGCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACA AGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCTCATTTTTTCTCCTTGGGGTGT GAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAGTGGGAG GTGCTGATAGATCCACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGA AACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCTCCAAAA CACGCCCCATCCACAGCGCTCCGAGCTTCCACCACCGCCCGCTCAGTTCCTTT GCGTCTGTTGCCCTCCCAGCCCTGCACGCCCTGGGTGGCACTGTTGCGCTGCATTCT	

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 6】

	CGTGTTCAGTGATGCCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTT TTAAAAAGAGTATCTTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGC ACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCCTTCTCCCGTTATTTA AGATTTGTGACCTTGTACATAACCTGGGTGACGTGCACATGCTTGGGTATGGAACG GTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTGTTGGGGTGTTCCTGTCTTGTGAGAA TCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTCACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTC ATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAAT CAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCTTTCCAGCGTCTCA TACCCCGGTAGTGACAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAG CGTCTCTCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCAGCCTGTGTCCACAGTGCTGTGA TCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACTC CCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGA AAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGC CCTTCTGTCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCCCTTCTGTTCAA GGGTACAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGG CTGTGGAGAAGTCTTGGCCCGTGGACTCACACAGACCTGTACCCTCTCGGCAAG CATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGG GGTCATACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACT TAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCTCTCAA GACTCAGCAGCTCTCATCTCCAGTGGTGAGCACACCATTGTGCTGCTGCTGTGTGTC GTGAAATATAATAACAGTGGAAGTCAAAAAATGTCCCTGCCAGCCCCCTCGCCGC CCTTGACCTCTGCAGGCCATGTGTGATTACTTGTCTAGTGATGTCTCTCAAAGTG CTGTACGCGAGCTCGGCCCCACCTCCGCCCTCCCTTTCAGAGCCTGTCCCGGCCCTCT CTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCACTGA GATTAAGTCGTACAGTCTCTCCCGTCTCCCTCCCAACTTATACGACCTGATTCTCTTA GGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCC TCCCTCGGACCAACAGTGCTCATGCTCAGGACCTTGTGTTGTCGAAGATGTGGTTT CCCTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTAAAAAAGCTA GTCTGTCTTGAACCTTGTGTTACCTTAAATATCAGAATCTCAGTGTTTGAAGTACT GAAGCACAACATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATA AATAAAGAAATCAGCACCCCT	10
配列番号 30 アイソフォーム e をコードするヒト STXBP1 (転写物変 異体 9)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGGCTGGCCAGCGCGCCACC TGAGGAGGCGGCGGGGTCCGCGAGCGCTGCGGGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAGAAAGAGGAA GACTACCTAGACATGTTGCTCCAGAGCAGAATTTCCAGCAGTAGATTGAACCTTCGGA GGCCGAGTCCCAGCCCAGTGTAACCTGGTAAAGAAGATTATGCATGATGTGATAAAGA AGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGATCAGTTAAGCATGAGGAT GCTGTCTCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAA GATATCAATAAGCGCAGAGAGCGGCTCCCGAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTC CATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAA ATACCGGGCTGCACACGCTCTTCTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAAATGAA CTGGTAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCAT TTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTT CTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAG ATCGCGACCCTTGTGCGACCCTGAAGGAGTACCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAAT ACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGC TGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCTG GATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGA GTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGG GGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTG CGCCACAAGCAGATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTT CTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCAGAT GCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCAC CTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAACTCTGCGGAGTGG AGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCATGCG AGCCATCGTCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATC ATCCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTGA TCCAGCAGCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATACCAACATGGCTCACCT CGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTGCCTGCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAG GAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACA TCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAAACACTACCCCTTATATCTCTAC	20
		30
		40

	CCGTTCTCTCTGCCTCCTTTCAGCACCACCGCCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCAT AAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCATCATTTTCATCCTTG GGGGTGTGAGCCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAA GTGGGAGGTGCTGATAGGATCCACACATCCTCACCCACAGAAACTGAGGACACA CTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCC TCCAAAACACGCCCCCATCCACAGCGCTCCGCAGCTTCCCACACCGCCCGCCTCAG TTCCTTTGCGTCTGTTGCCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCAGCTGTTGCCGCT GCATTCCTGGTGTTCAGTGGTGCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGAAAATGAGCAT GTGTTTTTTAAAAAGAGTATCTTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAA TTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTAGGATGAATGGACGCCTTCTCCCG TTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAACCTGGGTGACGTGCACATTTGCTTGGGTA TGGAACGCTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTGTTTGGGGTGTGTTCTGCTGCTTG TTGAGAATCATAGAGATGCTGTGTCTTGGAGTATTTACACTGAGGACTAATCTGC TATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGG TGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCCTTTCCAG CGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGTGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTC AGGCGACGCTCTCTCCACAGCCTGTCTACTGCCCCCTCCCGAGCCTGTGTCCAGT GCTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCTTGACAGGTGAGAAG CAAACCTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTTGG CCCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCTCT CGTTCAAGGGTCAAGAAATGACAGACAAGATGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGG GCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCCTCT CGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTT TGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATCTCTGTA TAAACTTTAGCTCTTAAAGCAGAACTTAAAGCAGCAATGCAAGGAGGCTGTCTCGCA TCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTGTGCTGCTGC TGTTGTCTGTGAATATATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCAGCCCG TCGCCGCCCTTGACCTCCTCGAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGATGCTCCT CAAAGTGTGTACGCGAGCTCGCGCCACCTCGCCTCCCTTTAGAGCCTGCTCCCG GCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGTGTTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTT GCACTGAGATTAGTCGTGATCTCTCCCCGCTCTCCCTCCCACTTATACGACCTGAT TTCCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGGCTTACTCCCGCTGCTTGTTC TGTCCTCTCCCTCGGACCAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTGTTTGTGCAAGATG TGGTTTTCTCTCTCTGTTCTTTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGGATTTTTAA AAAGCTAGTCTGTCTTGAACCTTGTTTACCTTAAATTTATCAGAATCTCAGTGTGTA AAGTACTGAAGCACAAACATATATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCATCTGAG TCTAATAAATAAAGAAATCAGACCCCT
配列番号 31 アイソフォーム f をコードするヒト STXB1 (転写物変 異体 10)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGTGCGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACCT TGAGGAGCGCGGGGTCGCGAGGCTGCGGGGACGAGGAGATCGGAGCGGGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAAGATTATGCA TGATGTGATAAAGAGGTCAAGAAGAGGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAG TTAAGCATGAGGATGCTGTCTCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGCA TACAGATTTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGGCGCTCCCGACGCTGCGAGGCTGT GTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGAC CCGCGGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATG CCCTGTTTAATGAACCTGGTAAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAAACTCTGACGGA AATCAATATTGCAATCTCTCCGTATGCAATCCAGGCTTATTCCTTGGACTCTGTGATC TCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGC GCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCG GTATCGGGGGGAATACAAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGTATATCCAGGACAGCTC GATGCCATATAAGCTGATGATCCAAACATGGGGAGGGCCAGACAGGACGCTCC AGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCCGAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGAC TTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAAATGATGTATACAAGTATGAG ACCGAGCGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCTGGACGAGGACGACGACC TGTGGATAGCATCGGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCGAGGAAGTCACCCGGTCT TCTGAAAGATTTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATCATGGAGAGAAGACCCATGCGG GACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACT CCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAA ACTCTGCCGAGTGAGGACGAGCACTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGAGAGGAAGATC AAGGACCTATGCGAGCCATCGTCCCATTTCTGTGGATGCCAATGTGACAGCTATAT

40

【表 4 - 18】

	ACAAAATCCGCATCATCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAA CCTGAACAAACTGATCCAGCACGCCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACC AACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCGCCGGAGCA AGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGAGTCC GATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAAACTTGACACCAAACTAC CCTTATATCTCTACCCGTTCCTCTGCCTCCTCAGCACCACCGCCGTCAGCGCCCGCT ATGGGCACTGGCATAAGAACAAAGGCCCGAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAT CATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACC CAGGCCAACGGAAGTGGGAGGTGCTGATAGGGGAATGGCCCTTCAGAACCTTGGCTA GGTGACATCAGAAGCTGCTTGTGTATGTAAGGAAAATGGGGCTTCCTCCTAAGGATCC ACACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAG ATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAAATAAGTCGCCCTCCAAAACACGCCCCCATCCCA CAGCGCTCCGCAGCTTCCCACCACCGCCCGCCTCAGTTCCTTGCCTGTGTTGCCTCC CCAGCCCTGCACGCCCCTGGCTGGCAGTGTGCGCTGCATTCTCGTGTTCAGTGATGC CTGTTCTTGTGTTTGAACAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTAAAAAGATATCT TATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGACACAGCAGGAGAAATT TCTGGAGTGTAGGATGAATGGACGCTTCTCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTG TACATAACCCCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTG TTTTTAAACCTTGTGTTGGGGTGTCTCTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTG TGTTCCTGGAGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACC CCTCAGTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGA GGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCCTTCCCAGCGCTCATACCCCGGTAGTGC AGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCACAG CCTGCTGAGTCCCTCCAGCCTGTGTCCACAGTGTGTGATCCCGAGGGGAAGTCC TCCAGTCTAAGTCACAGTGCCTGACAGGTGAGAAGCAAACTCCCGCTGGAAGCCTCC ATCTCTTTGGAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCAGG CATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGAC CAGAACAGATGGGTCTGAGGCGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGTTC TTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCCTGTACCCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGAT TATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCATACATCATCG TGTTTTTAAGAGAAGATGGTCATTTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGA AACTAAAGCAGCAAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTC ATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTGTGCTGCTGCTGTTGTGCTGAAATATAATAAC AGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCA GGCCATGTGTGATTACTTGTCTAGTGTGCTCTCAAAGTGTGTACGCGAGCTCG GCGCCACCTCCGCCTCCCTTTGAGAGCCTGCTCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTG TGGTGTCTCTCTTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTGAGAT CTCTCCCGCTCTCCCTCCCAACTTATACGACCTGATTTCCCTTAGGACGGAACCGCAGG CACCTGCGCGGGCGCTTACTCCGCTGCTTGTCTGTCCCTCCCTCGGACCAAAC AGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTGTCGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTAT TTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACCT TGTTTACCTTAAATTTATCAGAATCTCAGTGTGTTGAAAGTACTGAAGCACAAACATAT ATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAGAAATCAGC ACCCCT	10
	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACC TGAGGAGGCGGCGGGTCCGAGGCGTCCGCGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAAGATTATGCA TGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGTTGGTGGATCAG TTAAGCATGAGGATGCTGTCCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCA TAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGT GTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGAC CCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATG CCCTGTTAATGAACTGGTAAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGA AATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGTCTATTCCCTGGACTCTGCTGAC TCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGC GCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTTGTGCCACCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCG GTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTC GATGCCATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAGGCACGCTCCC AGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGAC TTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAG	20
配列番号 32 アイソフォーム g をコードするヒト STXBP1 (転写物変 異体 11)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACC TGAGGAGGCGGCGGGTCCGAGGCGTCCGCGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAAGATTATGCA TGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGTTGGTGGATCAG TTAAGCATGAGGATGCTGTCCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCA TAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGT GTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGAC CCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATG CCCTGTTAATGAACTGGTAAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGA AATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGTCTATTCCCTGGACTCTGCTGAC TCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGC GCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTTGTGCCACCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCG GTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTC GATGCCATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAGGCACGCTCCC AGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGAC TTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAG	30
	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACC TGAGGAGGCGGCGGGTCCGAGGCGTCCGCGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAAGATTATGCA TGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGTTGGTGGATCAG TTAAGCATGAGGATGCTGTCCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCA TAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGT GTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGAC CCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATG CCCTGTTAATGAACTGGTAAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGA AATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGTCTATTCCCTGGACTCTGCTGAC TCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGC GCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTTGTGCCACCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCG GTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTC GATGCCATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAGGCACGCTCCC AGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGAC TTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAG	40

【表 4 - 1 9】

	ACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACC TGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTC TCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGG GACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACT CCACCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAA ACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATC AAGGACCCCTATGCGAGCCATCGTCCCATTTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATG ACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAA CCTGAACAACTGATCCAGCACGCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACC AACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCGCGGAGCA AGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCC GATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAACTACTAC CCTTATATCTCTACCCGTTCCTCTGCGCTCCTTCAGCACCACCGCGCTCAGCGCCCGCT ATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCTCAT CATTTTCTCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACC CAGGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGTGCCCGTGGAGGCGGGAAGCTGAGCCC GGCTCCAGGAAGCACAGTGAGGGCTCAGCCATTGATGATGATGATGATGATGATGAT GATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT CAAGCCTGGGGAGAAAAGAATAAATAGTCTCATAAATTTAAAAAGCCCAATGCTCAT CAAGTAAGACAGATAAACTGTGTATTACCCAATGGTGAGTTTAAAGCAGTTAAAA ATGCATGACACACAGTTGCATATGTCAACATGAATAGATCTCAGACACTTAACAATGA GTGAAAGAGCACATTATGGGAGGACACAGACAGGATAGTGCATTATATAAAGCTTC AATGTTGCAGGCTGAAAGAGTGAGGGTCTGTATCAACTCAGTATCCTGGAGGCTACAT GGGTAAACAGCAAACTGTCTCATAAATGCAGAATGTTGGCAAACCTGACAACTGCAT CTGCCGCCAGAAAGGAATGCGGAGGGCAGCCACTCCCTAAGCGCAGTTTTCTGTGAT TAGGTACATCTGAAGCCTGTAGCAATAATGTGAACCTGTGATCAATTAAGCAGCTGA CCAATCATTACCTCCTCTTCCCTGCTCTTCTACCCAGTAAATACAAAGGGCTGTAGA AGCTCAGAGCTGCTGCTTTTGTCTCAGTAGAAGCAGGGAGTCTCTTCTTCTTCCCGG ACCCCTTCTTTTAAACAGTTTTCTTTAAGTTTTCTTTCTGCGTTTCATCCTCCTTCA TTCAGTCCCGTAGTAACCGTGGCAAACACGGCACTTCAAAACCTCATAAAAGCACC ACATATTGCTTATTTGGATACATATGTTGTAATGTGTGAAACATGCATGGGAATGA CAAATACCAAAGTCAGGATAGTGACTGGCCATGGGGAAGGGATGGTTATTATTGTCGT CTTATATCTTCAATTCCAATGAGCCACGGGCTTAAAAGTACTTCATTGAATAAAAAA AAACCAACAATGTATTAATGCAA	10
配列番号 33 アイソフォーム h をコードするヒト STXBP1 (転写物変 異体 12)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACC TGAGGAGGCGCGGGGTCCGAGGCGTCCGCGGACGAGGAGATCGGAGCGCGGAGACT CGCGCAGCGCCATGGCCCCATTGGCCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAAGATTATGCA TGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGATCAG TTAAGCATGAGGATGCTGTCTCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCA TAACGATTGTGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCGAGCCTGGAGGCTGT GTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGAC CCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATG CCCTGTTTAATGAACTGGTAAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGA AATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGAC TCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGC GCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCG GTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTC GATGCCATATAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCC AGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGAC TTTTAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCTATCGAAAATGATGTATACAAGGAAGTC ACCCGCTCTCTGAAAGATTTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCA CCATGCGGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAG CAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACC GTAGACAAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAG AGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCATTTCTGCTGGATGCCAATGTGCA CACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACG GAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGA TCATCACCACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCG CCGAGCAAGCCGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGG TGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCA	20
		30
		40

10

20

30

40

50

【表 4 - 20】

	AACACTACCCCTTATATCTCTACCCGTTCCCTCTGCCCTCCTTCAGCACCACCGCCGTCAG CGCCCCGCTATGGGCACCTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCC CGCCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACG AGGTGACCCAGGCCAACGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGGTCTACTCATTCTTTAC TCCCACCAAAATTTCTCATGGACCTGAGACACCCCGACTTCAGGGAGTCCCTCTAGGGTA TCTTTTGAGGATCAGGCTCCAACAATGGAGTGAGAGCCAAAGAAACAAAGATCCACAC ACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGA AGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAAACACGCCCCCATCCACAGC GCTCCGCAGCTTCCCACCACCGCCCGCCTCAGTTCCTTTGCGTCTGTGCTCCCCAG CCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTGCGGCTGCATTCTCGTGTTCAGTGATGCCCTC TTCTTTGTTTGAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTAAAAAGAGTATCTTATA CATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTG GACTGTAGGATGAATGGACGCCCTTCTCCCGTTATTAAAGATTTGTGACCTTGTACA TAACCTTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTT TAAACCTTGTGGGGTGTTCCTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTT CTTGGAGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTC AGTGCTGCTCTCATCCAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTC CAAGGTGGAACAGACCTCTTTCCTTTCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCT GTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCACAGCCTG TCACTGCCCCCTCCCAGCCTGTGTCCACAGTGTGTGATCCCGAGGGAAGTCCCTCA GTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCTGGAAGCCTCCATCT CTTTGGAACAAAGTGTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCGAGGCATC ATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGA ACAGCAGCAAAATGCAGGAAGGCTGTCTGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTC TCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTGTGCTGAAATATAATAACAGTG GAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCC ATGTGTGATTACTTGTCTAGTGATGTCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCCG CACCTCCGCTCCCTTTTCCAGAGCCTGCTCCCGGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGT GTTCTCTTCTCAAGGCTTGAATCTCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTGATCTCTCT CCCCGCTCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTTCTTAGGACGGAACCGCAGGCACC TGCGCGCGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCTCCCTCGGACCAACAGTG CTCATGCTTCAGGACCTTGTGTCGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTAT ATAAAATAAATTTATCAAAAGGATATTTTAAAAAGCTAGTCTGTCTGAAACTTGT TACCTTAAATATATCAGAACTCAGTGTTTGAAGTACTGAAGCACAAACATATATCA TCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAGAAATCAGCACCC CT
配列番号 34 AAVtt DNA 配列	TTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTG AATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTGAGTGTACAAACCAATTAACCAATTCT GAACATTATCGCGAGCCCATTTATACCTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTGGCC TGGCGCGAGTAGCGCGGTGGTCCACCTGACCCATGCCGAACCTCAGAAAGTAAACGC CGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGACTCCCATGCCAGAGTAGGGAACTGCCAGGCAT CAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCCGCCGGGCTAATTAGGGG GTGTGCCCTTCGCTGAAGTCCGTGATTAGAGGTCACGTGAGTGTGTTGCGACATTTT GCGACACCATGTGGTCACGCTGGGTATTTAAGCCCGAGTGAGCACGCAGGGTCTCCAT TTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGCCATGCCGGGTTTTACGAGATTGTGAT TAAGGTCCCCAGCGACCTTGACGAGCATCTGCCCGGCATTTCTGACAGCTTTGTGAAC TGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCTGA TTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGCCGAGAAGCTGCAGCGCGACTTTCTGACGGAATG GCGCCGTGTGAGTAAGGCCCGGAGGCCCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAG AGCTACTTCCACATGCACGTGCTCGTGGAAACACCGGGGTGAAATCCATGGTTTTGG GACGTTTCTGAGTCAGATTGCGGAAAACTGATTCAGAGAATTTACCGCGGATCGA GCCGACTTTGCCAAACTGTTTCGCGGTACAAAGACCAGAAATGGCGCCGGAGGCGGG AACAAGGTGGTGGATGAGTGCTACATCCCAATTACTTGCTCCCCAAAACCCAGCCTG AGCTCCAGTGGCGTGGACTAATATGGAACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCAC GGAGCGTAAACGGTGGTGGCGCAGCATCTGACGCAGTGTGCGAGACGCAGGAGCAG AACAAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGATGCGCCGGTGATCAGATCAAAAACCTTCA

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 1】

	CCAGGTACATGGAGCTGGTCGGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCA GTGGATCCAGGAGGACCAGGCCTCATACATCTCCTTCAATGCGGCCTCCAACCTCGCGG TCCCAAATCAAGGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAGATTATGAGCCTGACTAAAACCG CCCCCTGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTA TAAATTTTGGAACTAAACGGGTACGATCCCCAATATGCGGCCTTCCGTCTTTCTGGGA TGGGCCACGAAAAAGTTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTGGGCCTGCAACTA CCGGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCATAGCCCACTGTGCCCTTCTACGGGTGCGT AAACCTGGACCAATGAGAACTTCCCTTCAACGACTGTGTCGACAAGATGGTGATCTGG TGGGAGGAGGGGAAGATGACCGCCAAGGTGCTGGAGTGGGCCAAAGCCATTCTCGGAG GAAGCAAGGTGCGCTGGACAGAAATGCAAGTCCTCGGCCCAGATAGACCCGACTCC CGTGATCGTCACCTCCAACACCAACATGTGCCCGTGATTGACGGGAACCTAACGACC TTCGAACACAGCAGCCGTTCGAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACTACCCGCGCTC TGGATCATGACTTTGGGAAGGTCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTCCCGTGGGGC AAAGGATCAGCTGGTTGAGGTGGAGCATGAATTTCTACGTCAAAAAGGTTGGAGCCAAG AAAAGACCCCGCCCGAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCAACGGGTGCGCGAGTCAG TTGCGCAGCCATCGACGTGACACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACCA AAACAAATGTTCTCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTCCCTCGACACAATGC GAGAGAATGAATCAGAATTCAAATATCTGCTTCACTCACGGACAGAAAGACTGTTTAG AGTGCTTTCCCGTGCAGAACTCTCAACCCGTTCTGTGCTCAAAAAGGCGTATCAGAA ACTGTGCTACATTATCATATCATGGAAGGTGCCAGACGCTTGCCTGCGTGCAT CTGGTCAATGTGGATTGGATGACTGCATCTTGAACAATAAATGATTAAATCAGGT ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAA GACGTGGTTGGAAGTCAAACTTGGCCACCACCACCAAGCCCGCAGAGCGGCATAA GGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCTGGGTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGA CTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCGCGGCCCTCGAGCACGACAAAG CCTACGACCCGCGAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGA CGCGGAGTTTCAGGAGCGCCTTAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGACGA GCAGTCTTCCAGGCAGAAAAGAGGATCCTTGAACCTCTGGGCCTGGTTGAGGAACCTG TTAAGACGGTCCCGGAAAAAGAGGCGCGGTAGAGCACTCTCCTGCCGAGCCAGACTC CTCCTCGGGAAACCGGAAAGAGCGGCCAGCAGCTGCAAGAAAAAGATTGAATTTGGT CAGCTTGGGTACAGCAGCTCAGTACCTGACCCCGAGCTCTCGGACAGCCACCAGCAG CCCCCTCTGGTCTGGGAACATAACGATGGCTAGCGCGAGTGGCGACCAATGGCAGA CAATAACGAGGGCGCCGACGAGTGGGTAATTCCTCGGGAATTTGGCATTGCGATTCC ACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACCACGACCCGAACTTGGGCCCTGCCACCT ACAACAACCACTCTACAAACAAATTTCCAGCCAATCAGGAGCCTCGAACGACAATCA CTACTTTGGCTACAGCACCCCTTGGGGGTATTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCAC TTTTCAACACGTGACTGGCAAAGACTCATCAACAACAAGTGGGGATTCCGACCCAAGA GACTCAGCTTCAAGCTCTTTAATTCAGTCAAAGAGGTACGCAGAAATGACGGTAC GACGACGATTGCCAATAACCTTACCAGCAGGTTTCAAGTGTCTTACTGACTCGGAGTAC TCGCTCCCGTACGTCTCGGCTCGGCGCATCAAGGATGCTCCCGCCGTTCCAGCAG ACGTCTTCATGGTGCCACAGTATGGATACCTCACCTGAACAACGGGAGTCAGGCAGT AGGACGCTCTCATTTTACTGCTGGAGTACTTCTCTCTCAGATGCTGCGTACCGGA AACAACTTTACCTTCAGCTACACTTTTGGAGACGTTCTCTTCCACAGCAGCTACGCTC ACAGCCAGAGTCTGGACCGTCTCATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACTT GAGCAGAACAAACACTCCAAGTGAACCAACACGATGTCAAGGCTTCAGTCTTCTCAG GCCGGAGCGAGTGACATTCGGGACCAGTCTAGGAACGGCTTCTGGACCCCTGTACC GCCAGCAGCGAGTATCAAAGACAGCCCGGATAACAACAACAGTGACTACTCGTGGAC TGGAGCTACCAAGTACCACCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCGGCC ATGGCAAGCCACAAGGACGATGAAGAAAAGTACTTTCTCAGAGCGGGGTCTCATCT TTGGGAAGCAAGACTCAGGCAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACAGA CGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCCGTGGCTACGGAGCAGTATGGTCTGTATCT ACCAACCTCGAGAGCGGCAACACCAAGCAGTACCAGCGATGTCAACACACAAGGCG TTCTTCCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTTCAAGGGGCCATCTGGGC AAAGATTCCACACACGACGACATTTTACCCCTCTCCCTCATGGTGGATTTCGGA CTTAAACACCTCTCCACAGATTCTCATCAAGAACACCCCGTACCTGCGAATCCTT CGACCACCTTCAGTGGGCAAGGTTTGTCTTCTCATCACAGTACTCCACGGGACA GGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAAACAGCAACGCTGGAATCCC GAAATTCAGTACACTTCCAACATAACAAGTCTGTTAATGTGGAATTTACTGTGGACA CTAATGGCGTGATTACAGAGCCTCGCCCATTTGGCACCAGATACCTGACTCGTAATCT GTAATTGCTTGTAAATCAATAAACCGTTTAAATTCGTTTCAAGTTGAATTTGGTCTCTG CGCGTCAAAAGGGCGACACAAAATTTATTCTAAATGCATAATAAATACAGATAACATC
--	--

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 2】

	TTATAGTTTGTATTATATTTTGTATTATCGTTGACATGTATAATTTTCTAGAGCGGC CGCAGATCTCAGCTGGATATCAAAAACCTGATTTTCCCTTTATTATTTTCGAGATTTAT TTTCTTAATTCCTTTTAAACAACTAGAAATATTGTATATACAAAAAATCATAAATAAT AGATGAATAGTTTAATTATAGGTGTTTCATCAATCGAAAAAGCAACGTATCTTATTTAA AGTGCGTTGCTTTTTTCTCATTTATAAGGTTAAATAATTCATATATCAAGCAAAGT GACAGGCGCCCTTAAATATTCTGACAAATGCTCTTTCCCTAAACCTCCCCCATAAAAA AACCCGCCGAAGCGGGTTTTTACGTTATTTGCGGATTAACGATTACTCGTTATCAGAA CCGCCAGGGGGCCCCGAGCTTAAGACTGGCCGTCGTTTTACAACACAGAAAGAGTTTG TAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGGGCTTCTGCTTAGTTTGATGCCTGGCAGT TCCCTACTCTCGCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTCGCG TGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG GGATAACGCAGGAAAGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAA AAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTTGCAGAGCATCACAAAA ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTGCGCGTTACCGGATAC CTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGT ATCTCAGTTTCGTTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGT TCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAATATCGTCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGA CAGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATG TAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAAC AGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA AAAAGAGTTGGTAGC TCTTGATCCGGCAAAACAAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTGCAAGCAGC AGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTG TGACGCTCAGTGGAACGACGCGCGCTAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAAGAGCT TGCGCGCTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCTTTTAGAAAACTCATCGAGCATC AAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTGA AAAAGCC GTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCAGGCGAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTG GTATCCGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAAATTTCCCTCG TCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGA ATGGCAAAAGTTATGCAATTTCTTTCCAGACTTGTTCACAGGCCAGCCATTACGCTC GTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCG AGGCGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAACAGGAATCGAGTGCAACC GGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCCTTC TAATACCTGGAACGCTGTTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCA GGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCCGAAAGTGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTA GCTTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAA CAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAGCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCG ACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATC GCGGCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATATTCTTCTCT
配列番号 3 5 MYC TAG	GAGCAGAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG
配列番号 3 6 HA TAG	TACCCCTACGATGTACCGGATTACGCA
配列番号 3 7 MECP2 イントロン	GCGCTCCCTCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTAAAACCCGTCCGGAAATTGGCCGCCG CTGCCGCCACCGCCGCCGCCGCCGCGCGGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGCGAGGA GGAGAGACTGTGAGTGGGACCGCCAAGGCCGCGGGCGGGGACCCCTTGCTGGGGGGCGG GTAGGGGCGGGACGTGGCGCGGGAGGGGCCGCGGGGTGCGGGCGACACGGCTGGCGGT TGGCGTCCCTCCTCTCTACCCCTCCCCCTCCCTCTGCCGCCGTGGTGGCTTTCTCCAC TCGTCTCCCGCAATCGCGAGCGACGGTTCTCAGCGCGATCTCCCTGGAGCCACCTTCG ATTGACGCCCTCCCGCTGCCCGCCCCATCTGTGCGCATCCTAGGCCCCAGCTGTGCAA GCGCCCTTGCTGCTTGGGCTTCGCCAGTTGGGGCTGCGCGCGCTCTGCCCTTCTTGG GGCTTTGGGCCCTCGGCACTGTGCGCGCGCCGCGGTCCCGGCTCTCCCTGGATCGCGC TGTCCCTTCTCCCTCGCGCGCCCCACTCCCGTTACTTGCTCCCCCTCACACACAC AGACTGGCGCGGTGCGCAGTCCATCTCCGTTGGGAGAGTGCGCCACAAGGGCTCCT GAGCTCTTACCCCATCTCTGGGTTTTGCTCCCTCCTCCTCTCCCATTCGGTGAC TTTTTGCCCCCACTGCAAGCGAGTCGGTCCATCAGCTCCATTCGCCACTTGGCAGGAA CAAGTTGAGGGTTATTGTCCACCCACAAAAGGACTAGACATTTTGTTCCTAGGTCCC ACAACATCATATAAAGAGTTGGTTGTAGTTCTCATCAGGAACCGTGGGCAAGGGAGCT TGCGTTCCCTCAGCACTCGAAGCTCTTCCGTGAGACCTTGCCCGCAGGGTGCTCTGGTT

10

20

30

40

50

【表 4 - 2 3】

	CTTTGGGGTTGCTGTGCTGTGGCTTCGGAATTTGAGCGTCTTCCCACCCTCCCTCCCC TCCCTTCGCCAGCGTTCTGTCTACAAGAAAGAAATAGGCAGGTGTCCTTGGATATCGTA GTTGCTAATCGCCTATACACTGTTCTATTACACCTTTCTGCTAAGGATAGGGTTTTTG GTTTTGGTTTTGGTTTTGTTCGCCACCCTCCAGTTTGGTTTAGTTTTGGTTTTGGCAT TTAGGGTTTTTTGGGGGGAGTAATATCTTGTGGTAAAGACCCATCTGACCCAAGATA CCTTTTTTCTCATACTGGAACCTTAGGCAGCAGTTGCTATTTCCCTGAGTTAGCAATA GTTTTACAGTATTTTGAGGCCTTTGTCCATAATTCTCACGGAATCCCTCAGGGATCA GATTAGCTGCTGTTGGGATCAGGAAATTTGGTTACACCGCTGAAATCTCTTGCTGGGG CCCTTGTTTTGAATTGGAAAGTCAGGAGGCTGGAACGAAGGCTCACAAGTTAACAGTG CCAGCTGCTCTTCCAGAAGCCCTGGATTGCTCCACCAATCCATCGCGGGTCACAAC CATCTGTAACCTCAGTCCCAAGGGTCCGAAGCCCTCTCTGGCTTTGCCCTATTATT TTATTTATCTTATCTGTTTTTGTCTTGTCTGTCATCTGGCAAGCCAGGGGGCCATTGGGTG CAACTTATAAACTGACTTCTGTATCTTAAGAAGCCAACCATACAGTGCTTACATTCCA GAAAAAAATCTGCCACTTTAACAGCACTAGAACTAGGGTTTAGAGAAGTATCATAAA GGTCAAATATCTTTGACCAATATCACCAGCAACCTAAAGCTGTTAAGAAATCTTTGGG CCCCAGCTTGACCAAGGATACAGTATCCTAGGGAAGTTACCAAAATCAGAGATAGTA TGCAGCAGCCAGGGGTCTCATGTGTGGCACTCAAGCTCACCTATACTCACTACTGTGC AGACAGCTGTGTTCTCTGTAATACTTACATATTTGTTTAATACTTCAGGGAGGAAAAG TCAGAAGACCAGGATCTCCAGGGCCTCA
配列番号 38 Munc18-1a (aa 568～603)	GSTHILTPTKFLMDLRHPDFRESSRVSFEDQAPTME
配列番号 39 Munc18-1b (aa 568～594)	GSTHILTPQKLLDCLKKLNKTDEEISS
配列番号 40 フォワードプライ マー	GATCCAGACATGATAAGATACATTG
配列番号 41 リバープライマ ー	GCAATAGCATCACAAATTTAC
配列番号 42 プローブ 6-Fam/Zen/3'IB FQ	TGGACAAACCACAACTAGAATGCA
配列番号 43 STXBP1 ペプチド	DNALLAQLIQDK
配列番号 44 STXBP1 ペプチド	YETSGIGEAR
配列番号 45 STXBP1 ペプチド	ISEQTYQLSR
配列番号 46 STXBP1 ペプチド (長アイソフォー ム特異的)	WEVLIGSTHILTPTK
配列番号 47 STXBP1 ペプチド (短アイソフォー ム特異的)	WEVLIGSTHILTPQK

10

20

30

40

【実施例】

【0161】

例

以下の例は、本発明を例示する。

【0162】

例 1：構築物の設計、生成およびクローニング

組換え DNA 技術によって、この試験で使用したプラスミドを構築した。AAV C i s 骨格プラスミドをデノボで合成し、2つの AAV 逆方向末端反復 (ITR) と、カナマイシン耐性カセットと、原核生物複製起点と、SV40 ポリアデニル化配列とを含有させ

50

た。簡便なクローニング制限部位を用いて、ヒトSTXBP1（配列番号7を含む）のアイソフォーム変異体X1をコードするDNA配列をデノボで合成した。簡便な制限部位を用いて、個々のプロモーターをデノボで合成した。ヒトインフルエンザヘマグルチニン（HA）またはMycタグ（それぞれ配列番号33および32による）を、Integrated DNA Technologies（商標）（Coralville, IA, USA）製のオリゴヌクレオチドとして合成し、アミノ末端またはカルボキシ末端に挿入した。7つの異なるプロモーター（MECP2-イントロン、MECP2、hNSE、CamKII、hSyn、hSTXBP1p、CAG）をヒトSTXBP1遺伝子について試験した。

【0163】

設計した構築物の概略図を図3に示す。図では、「prom」はプロモーターを意味し、「INT」はイントロンを意味し、「h」はヒトを意味し、SV40はポリアデニル化配列SV40を意味し、「タグ」は、構築物のN末端またはC末端のいずれかに位置するHAタグまたはMycタグを意味する。

【0164】

例2：異なるプロモーター下でのSTXBP1発現の評価

細胞培養

DMEM+10%FBS+1%ペニシリン／ストレプトマイシン（いずれもThermo Fisher Scientific（商標）、Waltham, MA, USA製）中でヒト由来AD-HEK293（Agilent Technologies（商標）、Santa Clara, CA, USA）細胞株およびマウス由来Neuro-2A（ATCC（商標）、Manassas, VA）細胞株を継代した。以前に記載されたように（Tremblay, R. G. et al. 2010）、増殖培地に10μMレチノイン酸（MilliporeSigma（商標）、Burlington, MA, USA）を72時間にわたって補充することによって、Neuro-2A細胞を分化させた。製造業者のプロトコルに従って、X-tremeGene 360 Transfection試薬（Roche, Mannheim, Germany）を使用して細胞をトランスフェクトした。対照プラスミドによる対照トランスフェクションも含めた。

【0165】

免疫蛍光および顕微鏡法

40倍対物レンズおよびHamamatsu Orca 4フラッシュ冷却モノクロカメラ（Hamamatsu Photonics KK（商標）、Hamamatsu City, Japan）を装備したZeiss Axio Observer 7落射蛍光顕微鏡（Carl Zeiss AG（商標）、Oberkochen, Germany）を用いて、イメージング実験を行った。トランスフェクトしたAD-HEK293細胞およびNeuro-2A細胞を4%パラホルムアルデヒド（Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, 19440）を用いて固定し、ウサギポリクローナル抗STXBP1（MilliporeSigma（商標）、Burlington, MA, USA）によって1:500で染色した。次いで、イメージングの前に、Alexa Fluor 488にコンジュゲートしたロバ抗ウサギ二次抗体によって1:1,000で細胞を染色した。

【0166】

図4：（A）抗STXBP1抗体によって検出された、様々なプロモーター（CAG、MECP2およびMECP2-イントロン）によって駆動されるhSTXBP1プラスミドによってトランスフェクトされたAD-HEK293細胞の免疫蛍光イメージング。（B）拡大部分は、STXBP1が細胞膜に局在していることを示す。AD＝接着、NC＝陰性対照。

【0167】

図4に示すように、トランスフェクトした細胞は、遍在性CAGプロモーターまたは神経特異的プロモーター（MECP2およびMECP2-イントロン）の駆動下でヒトST

10

20

30

40

50

XBP1 導入遺伝子の異なるレベルの発現を示した。

【0168】

図5に示すように、遍在性CAGプロモーターおよび神経特異的プロモーター（MECP2およびMECP2-イントロン）によって駆動されるSTXP1プラスミドによってトランスフェクトしたNeuro-2Aトランスフェクト細胞も分析した。

【0169】

図5：（A）抗STXP1抗体によって検出された、様々なプロモーター（CAG、MECP2およびMECP2-イントロン）によって駆動されるhSTXP1プラスミドによってトランスフェクトされたNeuro-2A細胞の免疫蛍光イメージング。（B）拡大は、STXP1が細胞膜に局在していることを示す。NC＝陰性対照。

10

【0170】

STXP1は、一連の膜関連タンパク質と相互作用するサイトゾルタンパク質である。トランスフェクトされたAD-HEK293およびNeuro-2Aの拡大画像は、これらのプラスミドから発現されるSTXP1が、予測されるように原形質膜に局在すること（図4（B））、またはニューロン過程および原形質膜の両方に局在すること（図5（B））を示す。

【0171】

ウエスタンブロット分析

トランスフェクトしたAD-HEK293細胞を、製造業者の指示に従って、1X Halt ProteaseおよびPhosphatase Inhibitor Cocktail（Thermo Fisher Scientific（商標）、Waltham, MA, USA）を含有する1X Cell Lysis Buffer（Cell Signaling Technology（商標）、Danvers, MA, USA）中で採取した。10%還元剤を補充したドデシル硫酸リチウム（LDS）Sample Buffer（いずれもThermo Fisher Scientific（商標）、Waltham, MA, US）をタンパク質溶解物に加えて、最終濃度を1Xにした。1D SDS-PAGEゲル電気泳動によって試料を分離した。各試料について、1レーン当たり30μgのタンパク質をロードした。セミドライ転写装置（Bio-Rad Laboratories（商標）、Hercules CA）を使用して、ニトロセルロースメンブレン（Li-Cor Biosciences（商標）、Lincoln, NE, USA）にタンパク質を転写した。転写後、メンブレンをブロッキング溶液（Li-Cor Biosciences（商標）、Lincoln, NE, USA）中、室温で1時間インキュベートした。次いで、メンブレンを、一次抗体を含有するブロッキング溶液とともに4°Cで一晩インキュベートした。以下の一次抗体をこの分析に使用した：1：1,000でウサギポリクローナル抗STXP1（Millipore Sigma（商標）、Burlington, MA, USA）、1：1,000でヤギポリクローナル抗STXP1（Abnova, Taoyuan, Taiwan）、1,1000でウサギポリクローナル抗c-myc（Millipore Sigma（商標）、Burlington, MA, USA）、1：1,000でウサギモノクローナル抗HA（Cell Signaling Technology（商標）、Danvers, MA, USA）、1：1,000でマウスモノクローナル抗GAPDH（Millipore Sigma（商標）、Burlington, MA, USA）。メンブレンをPBST溶液を用いて3回洗浄し、近赤外スペクトルでの検出に適したIRDye 680RDロバ抗ヤギ二次抗体もしくはIRDye 680RDロバ抗ウサギ二次抗体または800CWロバ抗マウス（1：15,000；Li-Cor Biosciences（商標）、Lincoln, NE, USA）を含有するブロッキング溶液に室温で1時間入れた。Li-Cor Odyssey CLx近赤外イメージャ（Li-Cor Biosciences（商標）、Lincoln, NE, USA）を使用してタンパク質を可視化した。

20

30

40

【0172】

還元条件下でのSTXP1モノマーの分子量は約70kDaと予測され、該タンパク

50

質は、モノマーとしてウエスタンブロットによって検出された。GAPDHの検出をローディング対照として使用した。これらの結果は、分化したNeuro-2Aでは、様々なプロモーターによって堅牢な発現が達成されたことを示す（図6）。

【0173】

図6：様々なプロモーター（CAG、MECP2およびMECP2-イントロン）によって駆動されるhSTXB P1によってトランスフェクトされたNeuro-2A細胞のウエスタンブロット分析。各条件の2つの技術的複製物が示されている。NC＝陰性対照、1＝MECP2-イントロン-hSTXB P1、2＝CAG-hSTXB P1、3＝MECP2-hSTXB P1。

【0174】

これらの結果はまた、CAGプロモーターによって駆動されたN末端およびC末端タグ付き構築物の両方によって堅牢な発現が達成されたことを示す（図7）。

【0175】

図7：（A）抗My c抗体によって検出された、AD-HEK293細胞におけるCAGプロモーターによって駆動されるMy cタグ付きhSTXB P1ならびに（B）抗HA抗体によって検出された、AD-HEK293細胞、SH-SY5Y細胞およびNeuro-2a細胞におけるhSYNプロモーターによって駆動されるHAタグ付きhSTXB P1のウエスタンブロット分析。各条件の2つの技術的複製物が示されている。（C）抗STXB P1抗体を使用して、AD-HEK293細胞内でエピトープタグ付きタンパク質も検出した。NC＝陰性対照、1＝CAG-hSTXB P1-My c、2＝CAG-My c-hSTXB P1、3＝hSYN-HA-hSTXB P1。（A）のNCレーンにおけるバックグラウンドタンパク質バンドは、抗My c抗体による内因性My cの検出に起因する。

【0176】

例3：天然変異体および病理学的変異体の同定および分析

検索語「STXB P1」および「病原性」または「おそらく病原性」を使用して、STXB P1遺伝子変異体を同定するために、裏付けとなる証拠を伴うヒト変異体と表現型との間の関係の報告の自由にアクセス可能な公開アーカイブであるClinVarデータベース（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>）を検索した。病原性変異体の一覧を、科学専門家によって審査された文献で公開された変異によって補完し、検索語「STXB P1、Munc18、変異体、変異」を使用してPubMed（<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>）検索から手動でキュレートし、ClinVarで報告されていない追加のSTXB P1病原性変異体を同定するために著者らによって病原性と定義した。

【0177】

次いで、STXB P1タンパク質の変化をもたらす病理学的変異体および可能性のある病理学的変異体を同定した。（それぞれ表5および表6）。

【0178】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 5 :

病理学的変異体(配列番号 9 を参照) タンパク質変化	
R190Q	Y531*
C516*, C549*, C552*, C538*	M294fs, M316fs, M327fs, M330fs
D371fs, D385fs, D382fs, D349fs	N489fs, N511fs, N522fs, N525fs
D76H, D90H	R278P, R289P, R292P
E12fs	R464fs, R428fs, R450fs, R461fs
E221fs, E218fs, E207fs	R388*
E273*	R100fs
E384*, E406*, E417*, E420*	C354Y
E39*, E53*	S533fs
F115fs	P480L
G193V	H245D
K340fs, K307fs, K329fs, K343fs	A297T
P125Q, P136Q, P139Q	C354R
Q203*	C366fs
R551H	D224fs
S155fs, S141fs, S152fs	E299fs, E302fs, E266fs, E288fs
S89fs	E302*
W478*	E337fs, E304fs, E326fs, E340fs
Y198*, Y209*, Y212*	F237fs
Y198*, Y209*, Y212*	G222fs, G233fs, G236fs
Y266*	G507E, G540E, G543E, G529E
E27*	I393fs
E418*, E407*, E421*, E385*	I490fs
E527*, E516*, E530*, E494*	I50fs
E67*, E81*	I539del
G508C, G530C, G541C, G544C	K196*
G544D	K328fs, K364fs, K350fs, K361fs
H498fs, H462fs, H495fs, H484fs	K447fs, K458fs, K461fs, K425fs
I232fs	K98fs, K84fs
K111fs, K122fs, K125fs	L130fs
M252fs	L36*
M443R	L87fs, L73fs
Q336*	N134fs
S440*, S462*, S473*, S476*	P433fs

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

V84D	Q250*
Y330fs, Y344fs, Y308fs, Y341fs	Q338*
Y519*	Q359*
C180Y	Q558*
R122*	Q576fs
R292H	R157fs, R168fs, R171fs
R190W	R500fs, R522fs, R533fs, R536fs
R406C	R522fs, R500fs, R533fs, R536fs
R235Q	R551L
R235*	R551P
G544V	S292fs, S328fs, S314fs, S325fs
K461fs	S300fs
R551C	S42fs
R367*, R331*, R353*, R364*	T504fs
E470*	W28*
W522*	W563*
A214fs	Y140*
G319fs	Y344*, Y322*, Y355*, Y358*
G544fs	Y402fs
R292L	Y551*, Y554*, Y518*, Y540*
Y250*, Y261*, Y264*	S476*
K120fs	E283K
I88fs	H523fs
	Q229*

10

20

30

【 0 1 7 9 】

40

50

【表 6】

表 6：

可能性のある病理学的変異体(配列番号 9 を参照) タンパク質変化	
G530R, G541R, G508R, G544R	S28Y, S42Y
H311D, H333D, H347D, H344D	Y75C
T129P	R406H, R370H, R403H, R392H
A102del, A88del	L426P
D248Y, D259Y, D262Y	E171G, E182G, E185G
H89P, H103P	E207fs, E218fs, E221fs
K194fs, K205fs, K208fs	L390R, L412R, L423R, L426R
L41Q, L27Q	A517S
P65L, P79L	E487D
Y145H	G236D
W274R, W285R, W288R	H293Y
R406L	I232N
R551S	I390V
P139L	I485N
R403G, R392G, R370G, R406G	L256P
T361I	L291P
K32E, K46E	P335S
E455del, E477del, E488del, E491del	T570A
P444S, P466S, P477S, P480S	N548D
Y358fs	T248I

10

20

30

【0180】

S T X B P 1 遺伝子変異体は、アミノ酸置換をもたらすミスセンス変異を含み得る。例えば、表 5 の R 1 9 0 Q は、配列番号 9 を参照して位置 1 9 0 のアルギニンがグルタミンによって置換されていることを意味する。

【0181】

他の変異も起こり得る。同定された変異の 1 つのタイプは、変化した塩基対の数が 3 で割り切れないヌクレオチドの挿入または欠失を伴う変異であり、これは「fs」として示される新しいアミノ酸配列、フレームシフトの生成をもたらす。変異が正しいリーディングフレームを乱すと、変異に続く DNA 配列全体が誤って読み取られる。例えば、表 5 の E 1 2 fs は、配列番号 9 を参照して位置 1 2 のグルタミン酸がヌクレオチドのフレームシフトにより変化し、誤ったアミノ酸配列を有する異常なタンパク質がもたらされることを意味する。

40

【0182】

変異体に見られる別のタイプの変異は、タンパク質内の 1 つ以上のアミノ酸残基を除去する、DNA レベルの変異であった。このタイプの変異は、欠失 (del) として表に示されている。例えば、表 5 の I 5 3 9 del は、配列番号 9 を参照して位置 5 3 9 のイソロイシンが除去されていることを意味する。

【0183】

他の変異には、アスタリスク (*) によって示される終止コドンの導入が含まれ、これは、タンパク質の翻訳がこの位置で終止し、短縮型または切断型タンパク質がもたらされることを意味する。例えば、表 5 の Y 5 3 1 * は、配列番号 9 を参照して、チロシン 5 3

50

1 を通常コードするコドンに終止変異が生じ、この位置でタンパク質の翻訳が終結することを意味する。

【0184】

クエリ用語「STXBP1」を使用して、無関係の個体からの60,146個の試料由来の遺伝情報を含む公的に利用可能な対照データセットであるgnomAD (Genome Aggregation Database-<https://gnomad.broadinstitute.org/v2.1.1>) から、健常な集団の天然変異体を得た。対照データセットから抽出された変異体には、ミスセンス、スタートロスト (start lost)、およびアミノ酸変化をもたらすストップゲインド変異体 (stop gained variant) が含まれる。アミノ酸変化をもたらす天然変異体を表7に報告する。

10

【0185】

【表7】

表7：

天然変異体(配列番号9を参照)				
Ala113Thr	Asp207Asn	Ile289Val	Pro67Leu	Val84Ile
Ala181Asp	Asp210Asn	Ile450Val	Pro94Leu	Val9Ile
Ala389Ser	Asp436Gly	Ile490Thr	Pro95Leu	Ala514dup
Ala430Thr	Asp49His	Leu169Met	Ser149Phe	Phe595LeufsTer30
Ala444Val	Asp586Asn	Leu414Ser	Ser328Thr	Val593TyrfsTer32
Ala514Thr	Asp597Asn	Lys161Arg	Ser533Thr	
Ala527Thr	Gln154His	Lys25Asn	Ser70Thr	
Arg100Gln	Gln338Arg	Lys277Arg	Thr129Ile	
Arg100Trp	Glu12Asp	Lys314Asn	Thr401Ile	
Arg171His	Gly222Ser	Lys364Arg	Thr419Met	
Arg192Gln	Gly520Val	Met15Val	Thr455Met	
Arg305Gln	Gly529Ser	Met38Thr	Thr588Ile	
Arg305Trp	His16Arg	Met602Val	Tyr519Cys	
Arg457Cys	His357Pro	Phe91Leu	Val104Ile	
Arg505Cys	Ile168Val	Pro434Leu	Val448Met	
Arg583Ser	Ile271Val	Pro462Leu	Val451Ile	
Arg64Cys				
Asn398Ser				
Asn548Ser				

20

30

40

【0186】

例4：ウイルス粒子の生成

AAV生成

AAV2 Rep配列とそれに続くAAV9.hu14 (以下、AAV9) またはAAVトゥルータイプ (以下、AAVtt) カプシド配列 (それぞれ配列番号17および34による) とを含むトランスプラスミドをATUM (商標) (Newark, CA, USA) によってデノボで合成した。AAVヘルパープラスミドpALD-X80をAlid

50

evron, LLC (商標) (Fargo, ND, USA) から購入した。

【0187】

トリプルトランスフェクション法によって非複製AAVベクターを生成した。3.0E+05-5.5E+05細胞/mLの播種密度で振盪フラスコ内のExpi293 Expression Media (Thermo Fisher (商標)、Waltham, MA, USA) を使用して、Expi293細胞 (Thermo Fisher (商標)、Waltham, MA, USA) を3~4日ごとに継代した。5%CO₂、37°Cに設定したエッペンドルフインキュベーター内、125rpmのオービタルシェーカー上でExpi293細胞を培養した。生成フラスコを設定するために、トランスフェクションの前日に、1.5E+05細胞/mLで、ウイルス調製物当たり30~66mLの総体積で125mL振盪フラスコを接種した。Vi-Cell Blu (Beckman Coulter (商標)、Pasadena, CA, USA) を使用して生細胞密度を計算した。

10

【0188】

30mLの作業容量を有する生成フラスコでは、以下のように各フラスコについてトランスフェクション複合体を作製した：1mg/mL (Polysciences Inc (商標)、Warrington, PA, USA) のPolyethylenimine (PEI) MAX 180μLを1.5mLのOptiPRO無血清培地 (Thermo Fisher (商標)、Waltham, MA, USA) に希釈し、設定8で4回ボルテックスし、室温で5分間インキュベートした。別個に、20μgのCisプラスミド (表10に示す) と、30μgのRep/Capプラスミド (AAV9またはAAVtt) と、40μgのヘルパープラスミド (pALD-X80) とを1.5mLのOptiPRO無血清培地に希釈し、設定8で4回ボルテックスし、室温で5分間インキュベートした。次いで、これらの2つの混合物を合わせ、設定8で4回ボルテックスし、室温で15分間インキュベートした。次いで、細胞を含有する振盪フラスコに、トランスフェクション複合体を加えた。125rpmで一定に攪拌しながら、37°Cでトランスフェクション混合物とともに細胞を培養した。

20

【0189】

96時間後、フラスコに、濃縮AAV溶解緩衝液を最終濃度1X (150mM NaCl、120mM Tris-HCl [pH=8.0]、2mM MgCl₂、0.1% Triton X-100) まで、およびBenzonase (MilliporeSigma (商標)、Burlington, MA, USA) を最終濃度50U/mLまで添加した。この混合物を125rpmで一定に攪拌しながら37°Cで1時間インキュベートした。2,880×gで10分間、23°Cで遠心分離することによって混合物を清澄化した。試料をその後の分析まで-80°Cで保存した。

30

【0190】

AAV力価決定

各試料を-80°Cから取り出し、室温で15分間解凍した。試料を解凍した後、短時間ボルテックスし、1分間遠心分離した。この後、10X DNase Buffer、50 U DNaseおよびDNase不加水 (いずれもPromega (商標)、Madison, WI, USA製) と組み合わせた96ウェルPCRプレートの個々のウェルに、各ウェル内で総体積100μLになるように、10μLの試料を加えた。

40

【0191】

次いで、プレートをBio-Rad (商標) (Hercules, CA, USA) サーマルサイクラーに移し、37°Cで30分間加熱し、次いで、4°Cに冷却した。次いで、試料を表8に記載されるように段階希釈した。

【0192】

50

【表 8】

表 8：

希釈工程	中間希釈 係数	中間試料	中間体積 (μL)	希釈剤体積 (μL)	総体積 (μL)	総希釈係数
D0	10	DNase 処理 試料	100	NA	100	10
D1	1.5	D0	100	50	150	1.5E+01
D2	10	D1	10	90	100	1.5E+02
D3	10	D2	10	90	100	1.5E+03
D4	10	D3	10	90	100	1.5E+04
D5	10	D4	10	90	100	1.5E+05

10

【0193】

5 μL の希釈物 D2、D3、D4 および D5 を、Supermix for Probes (dUTP なし; Bio-Rad (商標)、Hercules, CA, USA)、フォワードプライマー GATCCAGACATGATAAGATACATTG (配列番号 40)、リバースプライマー GCAATAGCATCACAAATTTTCAC (配列番号 41)、プローブ 6-Fam/Zen/3' IB FQ: TGGACAAACCACAAC TAGAATGCA (配列番号 42) および DNase 不含水から構成される 20 μL の ddPCR マスターミックスと混合して、最終濃度を 1X にした。このプライマーセットは、導入遺伝子の SV40 ポリ A 領域を標的とする。各試料を 96 ウェル PCR プレート内で二連で泳動した。

20

【0194】

プレートを箔カバーによってヒートシールし、パルスボルテックスし、1,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離した。プレートを Bio-Rad (商標) QX-200 液滴発生器に入れ、製造業者の指示に従って液滴を生成した。

30

【0195】

液滴生成後、プレートを箔カバーによってヒートシールし、表 9 に記載のサイクルを実行するようにプログラムした BioRad (商標) サーマサイクラーに入れた。

【0196】

【表 9】

表 9：

PCR 増幅設定 (温度勾配はいずれも 2.5 $^{\circ}\text{C}$ /秒に設定する)			
サイクル工程	温度	持続時間	サイクル数
酵素活性化	90 $^{\circ}\text{C}$	10分	1
変性	95 $^{\circ}\text{C}$	30秒	39
アニーリング/伸長	56 $^{\circ}\text{C}$	1分	
酵素不活性化	98 $^{\circ}\text{C}$	10秒	1
保持	4 $^{\circ}\text{C}$	無限大	1

40

【0197】

完了後、プレートを Bio-Rad (商標) QX200 液滴に入れ、製造業者の指示に

50

従って液滴を読み取った。以下の式を使用して、ベクターゲノムの濃度（VG/mL）を定量した：

$VG/mL : X = [(aY) (1000/b)] D$ 、式中、

XはVG/mLであり、

aは、ddPCR反応の体積（25μL）であり、

Yは、コピー数単位のddPCR読出し／マイクロリットルであり、

bは、ddPCR中の希釈剤ベクターの体積（5μL）であり、

Dは、試験材料に適用された総希釈である。

【0198】

アッセイ許容基準を以下のように定義した：

複製物間の%CVは $\leq 15\%$ でなければならない。 $> 15\%$ の場合、1つの外れ値を省略してもよい。外れ値が省略され、%CVが $> 15\%$ のままである場合、アッセイを繰り返さなければならない。希釈間%CVは $\leq 20\%$ でなければならない。報告される希釈は少なくとも2つの連続希釈でなければならない。%CVが $> 20\%$ である場合、報告される希釈が少なくとも2つの連続希釈である限り、希釈を省略することができる。平均希釈が依然として $> 20\%$ である場合、アッセイを繰り返さなければならない。各反応ウェルは、 $\geq 1,000$ 個の受け入れられた液滴を有しなければならない。 $< 10,000$ の液滴の場合、ウェルは分析から除外される。

【0199】

AAVカプシドELISAによるウイルス粒子定量

製造業者の指示に従って、ELISAキット（PROGEN（商標）Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany）によってウイルス粒子力価を決定した。AAV9については、マウスモノクローナルADK9抗体を捕捉工程および検出工程の両方に使用した。AAVttについては、A20Rモノクローナル抗体を捕捉工程および検出工程の両方に使用した。Molecular Devices（商標）（San Jose, CA, USA）AquaMax 4000マイクロプレート洗浄機を使用して、各工程の合間に、提供された1X Assay Buffer（ASSB）中の洗浄を行った。Molecular Devices（商標）SpectraMax M5eプレートリーダーを用いて試料を検出した。カプシド力価を標準曲線から内挿した。カプシド力価を表10に報告する。

【0200】

【表10】

表10：

Cis プラスミド	カプシド	総ウイルス粒子 (VP)	カプシド力価 (VP/mL)	総ウイルスゲノム (VG)	ウイルスゲノム力価 (VG/mL)
MECP2-hSTXBP1	AAV9	2.15E+13	7.17E+11	7.77E+11	2.59E+10
MECP2-イントロン-hSTXBP1	AAV9	1.94E+13	6.47E+11	6.72E+11	2.24E+10
MECP2-hSTXBP1	AAVTT	6.72E+12	2.24E+11	6.06E+11	2.02E+10
MECP2-イントロン-hSTXBP1	AAVTT	4.38E+12	1.46E+11	5.04E+11	1.68E+10

【0201】

ddPCRによって得られたウイルスゲノム力価と、ELISAによって得られたカプシド力価とは、ヒトSTXBP1導入遺伝子に作動可能に連結された示されたプロモータ

ーを含む核酸を有するウイルスベクターを含む AAV9 ウイルス粒子および AAVtt ウイルス粒子の両方を首尾よく生成することができることを示した。

【0202】

例5：NGN2 分化グルタミン酸作動性ニューロンにおける STXB P1 カセットのレンチウイルス発現

DOX 誘導性 NGN2 発現カセットを有する遺伝子編集 iPSC 株 (EBiSC、参照番号：BIONi010-C-13) を使用して、iPSC 由来グルタミン酸作動性ニューロンを生成した。このプロトコルでは、ニューロン分化をプライミングするために、9 日間にわたってドキシサイクリンによって NGN2 転写因子を誘導した。分裂 (DIV) 21 では、iPSC 由来 NGN2 ニューロンに、hSyn プロモーターまたは MECP2 プロモーターの制御下でヒト STXB P1 (配列番号 9) を発現するレンチウイルスベクターの段階希釈物を形質導入した。安全性を改善するために、第三世代系を使用して HEK 293 細胞でレンチウイルスベクターを生成した。DIV 28 では、免疫細胞化学 (ICC) 分析を以下のように行った：細胞を 2% パラホルムアルデヒドによって固定し、1:250 の希釈で一次ウサギポリクローナル抗 STXB P1 抗体 (Sigma、参照番号：HPA008209) によって染色した。次いで、Alexa Fluor 568 にコンジュゲートしたヤギ抗ウサギ二次抗体によって 1:1000 希釈で細胞を染色した。経験的パラメータを使用して、InCell アナライザー 6000 機器を用いてイメージングを行った。

【0203】

感染多重度 (MOI) 2 を有するレンチウイルスベクターを形質導入した細胞からの代表的な ICC 画像を図 8 に示す。

【0204】

図 8：iPSC 由来グルタミン酸作動性ニューロンにおける SXTPB P1 カセットのレンチウイルスベクター形質導入。画像は、対照条件下 (非形質導入)、および hSyn または MECP2 プロモーターの制御下でのカセットの形質導入後の STXB P1 発現の代表的な写真を示す。

【0205】

いずれの条件についても同じ取得設定を使用して写真を撮影した。シグナルと非形質導入細胞との比較により、ヒト iPSC 由来 NGN2 ニューロンにおける STXB P1 の過剰発現の可視化が可能になった。hSyn プロモーターの制御下の STXB P1 は、MECP2 プロモーターよりも高い発現をもたらした (表 11 に要約)

【0206】

【表 11】

表 11：iPSC 由来グルタミン酸作動性ニューロンにおけるレンチウイルス形質導入後の STXB P1 発現レベル

非形質導入	hSYN-STXBP1	MECP2-STXBP1
検出されず	++	+

(+) ICC 分析によって観察された相対発現レベル

【0207】

例 6：一次マウスニューロンにおける STXB P1 カセットの AAV-9 形質導入

AAV9 ベクターを例 4 に記載されるように生成した。カプシドの特徴を表 12 に列挙する。導入遺伝子は、N 末端で HA タグに融合した STXB P1 タンパク質 (配列番号 9) を発現し、発現は、以下のプロモーター、すなわち、hSyn、MECP2 または MECP2-イントロンによって促進された。HA タグ付きタンパク質を使用して、導入遺伝子発現を内因性 STXB P1 レベルから区別した。形質導入効率のための対照ベクターとして、CAG-eGFP-NLS カセットを有する AAV9 カプシドを使用した。マウス

一次皮質ニューロンを形質導入することによって、STXBP1発現をインビトロで調査した。内因性STXBP1発現の対照として非形質導入細胞を使用した。

【0208】

【表12】

表12：AAV9ウイルスベクターの特性

カセット	カプシド	ウイルス ゲノム力価 (vg/mL)	内毒素 (<10 EU/mL)
hSyn-eGFP	AAV9	1.36E+13	可
MECP2-HA-hSTXBP1	AAV9	1.39E+13	可
MECP2-イントロン-HA-hSTXBP1	AAV9	1.35E+13	可
hSyn-HA-hSTXBP1	AAV9	1.28E+13	可
CAG-HA-hSTXBP1	AAV9	1.22E+13	可
CAG-eGFP	AAV9	1.30E+13	可

10

20

【0209】

E17マウス胚の皮質組織からマウス一次皮質神経細胞を調製した。37°Cで30分間パインを使用して皮質組織を解離させ、B27サプリメント2%、GlutaMAX-I 1mMおよびペニシリン-ストレプトマイシン50単位/mLを補充したNeurobasal (商標) Medium中で培養して維持した。週に1回、半培地交換を行った。

30

【0210】

分裂(DIV)7では、細胞に、2つの異なるMOI (2.5E+6 GC/細胞および5.0E+5 GC/細胞)で異なるAAV9構築物を形質導入した。両MOI条件において高かったhSyn-eGFP-NLS構築物を含めることによって、形質導入のレベルを確認した。DIV13では、細胞を2%パラホルムアルデヒドによって固定し、一次ウサギポリクローナル抗STXBP1抗体(1:250; Sigma、参照番号:HPA008209)および抗HAタグ染色(1:100; 参照番号:2367S、Cell Signaling Technology)によって染色した。経験的パラメータを使用して、InCellアナライザー6000機器を用いてイメージングを行った。

【0211】

図9：マウス一次ニューロンにおけるSTXBP1のAAV9形質導入(A) MOI 5.0E+5 GC/細胞でAAV9ウイルスベクターを形質導入した一次マウス皮質ニューロンにおけるSTXBP1染色の代表的な画像。写真は、hSyn、MECP2またはMECP2-イントロンプロモーターの制御下での対照条件(非形質導入)およびSTXBP1発現を示す(B)同じ一次マウス皮質ニューロンにおけるHA染色(右)とSTXBP1染色(左)との比較。

40

【0212】

同様の取得パラメータを使用して、非形質導入細胞と比較した場合、3つ全部のプロモーターについてSTXBP1発現レベルの増加が確認され(図9A)、AAV9形質導入がベースラインレベルを超えるSTXBP1発現を達成することができることが示唆され

50

た。イントロンプロモーターを有するMECP2は最も高い発現レベルを示し、hSynおよびMECP2がこれに続いた（表13）。さらに、抗HAとSTXBP1染色との共局在が、試験した全ウイルスベクターについて観察された。代表的な画像を図9Bに示す（矢印を参照）。

【0213】

【表13】

表13：異なるニューロンプロモーターの制御下でのマウス一次ニューロンにおけるSTXBP1のAAV9形質導入

	非形質導入	hSyn	MECP2	MECP2-イントロン
STXBP1	-	++	+	+++

10

(+) ICC分析によって観察された相対発現レベル

【0214】

STXBP1形質導入が神経細胞に特異的であることを実証するために、panニューロンマーカーMAP2（1：5000；参照番号：ab5392；Abcam（商標）、Cambridge, MA, USA）に対する抗体によって、マウス初代培養物を対比染色した。

【0215】

図10：MAP2陽性ニューロンにおけるSTXBP1過剰発現の共局在。画像は、AAV9ウイルスベクターの形質導入後のマウス一次ニューロンにおける抗HAタグ染色（左パネル）および抗MAP2染色（右パネル）の代表的な写真である。矢印は、STXBP1（HA）およびニューロンマーカー（MAP2）を発現する細胞の例を示す。

20

【0216】

図10は、形質導入されたマウス一次皮質ニューロンにおけるニューロンマーカー（MAP2）と抗HA染色との共局在を示す（矢印を参照）。このデータから、異なるニューロンプロモーターの制御下でのHAタグ付きSTXBP1導入遺伝子産物のニューロン発現が確認された。HAタグシグナルの強度（表14）はSTXBP1レベルと相関し（表13）、プロモーター強度が以下のようにランク付けされ得ることが示唆される：MECP2-イントロン>hSyn>MECP2。

30

【0217】

【表14】

表14：マウス一次ニューロンにおけるHAタグの発現および局在

	非形質導入	hSyn-HA-STXBP1	MECP2-HA-STXBP1	MECP2-イントロン-HA-STXBP1
HAタグシグナル	-	++	+	+++
共局在		あり	あり	あり

40

(+) ICC分析によって観察された相対発現レベル

【0218】

例7：マウス脳におけるAAV-9媒介形質導入後のSTXBP1のインビボ発現

マウス脳におけるSTXBP1のAAV9媒介形質導入をインビボで調査した。出生後1日齢の新生仔マウス（PND1）の脳への両側性脳室内（ICV）注射によってウイルスベクターを投与した。ICV新生仔注射のための方法は以前に記載されている（Bertrand-Mathon, et al. 2015；Kim, et al. 2014；Hamodi, et al. 2020）。注射した動物を5週間の期間にわたってモニタリ

50

ングし、STXBP1の発現および分布を脳組織に対する生化学的読出しによって分析した。

【0219】

実験には5群を含めた：対照（ビヒクル注射）、対照ウイルス（AAV9／hSyn－EGFP）、AAV9／hSyn－HA－STXBP1、AAV9／MECP2－HA－STXBP1、およびAAV9／MECP2－イントロン－HA－STXBP1。AAV9ベクターは、表12に記載のものと同じであった。インビボ実験条件の要約を表15に示す。

【0220】

【表15】

表15：インビボ実験条件の要約

処置時 日齢	送達経路	ウイルス ベクター カセット	力価	生存中評価	末期評価
出生後 1日目 PND1	ICV 両側注射 2ul/半球	AAV9/hSyn-STXBP1	1,28E+13GC/mL	注射後5週間の臨床徴候、有害作用、体重、死亡率	生化学的分析、病理組織診断、免疫組織化学的検査、導入遺伝子発現のための注射5週間後の脳および器官の収集。
		AAV9/MECP2-STXBP1	1,39E+13GC/mL		
		AAV9/MECP2-イントロンSTXBP1	1,35E+13GC/mL		
		AAV9/hSyn_EGFP	1.36E+13GC/mL		
		ビヒクル	(滅菌リン酸緩衝生理食塩水 1X)		

【0221】

マウスの全体的な健康状態を評価するために、試験の過程（注射後5週間）にわたって体重差をモニタリングした。最後の評価時に、異なるカセット群の体重に有意差はなかった。いずれの群も毒性の臨床徴候を示さなかった。さらに、AAV9／hSyn－HA－STXBP1、AAV9／MECP2－HA－STXBP1、またはAAV9／MECP2－イントロン－HA－STXBP1によって処置した成体野生型マウスでは、罹患、または発達の遅延の明白な徴候はなかった。この実験の結果から、ウイルスベクターカセットが長期忍容性および低毒性を示し、したがって、前臨床環境で安全に使用され得ることが実証された。

【0222】

注射後5週間で、脳組織を収集し、解剖し、生化学的分析に供した。DNA／RNAを左前頭皮質および海馬から抽出し、タンパク質を対応する右前頭皮質から抽出した。製造業者の指示に従ってAllPrepミニキット（Qiagen，80204）を使用し、RNA抽出のためのDNase処理を含めてDNA／RNA抽出を行った。Precellys 24機器（Bertin Technologies）を使用して、RLT Plus緩衝液（β-メルカプトエタノールを補充）中で組織を溶解した。DNA濃度を測定し、全試料について20ng／μlに調整した。次いで、SV40ポリAシグナル（全AAVカセットに存在する）に特異的なプライマー／プローブを使用して、40ngをqPCRに供した。ValidPrime（登録商標）キット（tataabio cent

er, A106P25) を使用してマウスゲノムの量を分析した。ValidPrime (登録商標) 配列は、正常な半数体ゲノム1個当たり正確に1つのコピーで存在する、gDNAの非転写遺伝子座に特異的である。両qPCRについて、標準曲線法を使用してコピー数を決定した。RNA濃度を測定し、キットHigh Capacity cDNA RT Kit+RNase Inhibitor (Applied Biosystems カタログ番号4374966) を使用して、500ngのRNAをRTに供した。ヒトSTXBP1シグナルqPCR、および得られた結果の正規化のための2つの参照遺伝子に、得られたcDNAを供した。相対発現を決定し、全群の平均値にスケールした。タンパク質抽出のために、Precellys 24 機器 (Bertin Technologies) および冷却システムを使用して、2倍濃縮プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテル (Cell Signaling Technology, #5872) を含むRIPA緩衝液 (Pierce, 89900) 中で組織を溶解した。試料を氷上に30分間放置し、遠心分離し、上清を最終タンパク質抽出物として収集した。BCA Protein Assay Kit (Pierce, 23227) を使用してタンパク質濃度を決定し、7.5 μ gのタンパク質をLaemli 緩衝液および β -メルカプトエタノールと混合し、SDS-Pageの前に90°Cで10分間インキュベートした。ゲルをニトロセルロースメンブレンに移し、ウエスタンブロットによって分析した。メンブレンをブロッキング溶液 (参照番号: 927-50000; Li-Cor) 中、4°Cで1時間インキュベートし、続いて、一次抗体のマウスモノクローナル抗HA (1:2000; 参照番号: 2367S、Cell Signaling Technology) およびマウスモノクローナル抗GAPDH (1:10000; 参照番号: G8795、Sigma) とインキュベートした。使用した二次抗体は、IRDye (登録商標) 680R Donkey anti-Mouse IgG Secondary Antibody (1:20000; 参照番号: 926-68072、Li-Cor) およびIRDye (登録商標) 800CW Donkey anti-Rabbit IgG Secondary Antibody (1:20000; 参照番号: 926-32213、Li-Cor) であった。

10

20

30

40

50

【0223】

図11: ウイルスベクターDNAコピー分析。AAV処置後の5週齢マウスの左海馬および左前頭皮質由来の二倍体マウスゲノムの数によって正規化されたSV40pAのqPCRデータ (シミアンウイルス40のポリAシグナル)。ビヒクル群および4つのAAV9形質導入群 (対照ウイルス、hSyn、MECP2、MECP2-イントロン) についてデータを示す。結果を平均 $\pm$ SDとして示す。

【0224】

図12: STXBP1 mRNA発現分析。データは、2つの参照遺伝子に対して正規化され、全群の平均発現 (平均 $\pm$ SD) にスケールされた相対発現として表している。AAV処置後の5週齢マウスの左海馬および左前頭皮質の組織から分析を行った。ビヒクル群および4つのAAV9形質導入群 (対照ウイルス、hSyn、MECP2、MECP2-イントロン) についてデータを示す。

【0225】

図13: ウエスタンブロットによるタンパク質分析。(A) 皮質における様々なカセットに関するHAタグ発現を示すウエスタンブロット (n=5~7/群)。GAPDHをローディング対照として使用した。(B) HAタグバンド強度の定量、各試料をGAPDHローディング対照に対して正規化する。結果を平均 $\pm$ SDとして示す。

【0226】

図11に示すように、DNA抽出物では、二倍体マウスゲノム1個当たりの顕著なベクターDNAコピーが検出され、海馬および皮質における異なるウイルスベクター間の効率的なAAV9形質導入が実証された (N=マウス5~7匹)。ヒトSTXBP1導入遺伝子発現 (mRNA) が3つのカセットいずれにも観察され、hSynおよびMECP2と比較してMECP2-イントロンのカセットでは、はるかに強い発現が観察された (図1

2)。HAタグ付きSTXB P1タンパク質のウエスタンブロット分析により、試験した3つのカセットいずれについても、前頭前皮質内にインビボでの特異的導入遺伝子産物発現が確認された(図13AおよびB)。全体として、データにより、ウイルスベクター間のプロモーター強度の一般的なランク付けが可能になった。MECP2-イントロンは、最も高いHAタグSTXB P1発現を示し、hSynおよびMECP2が続いた。このデータは、同様の相対的なランク付けが観察されたマウス一次皮質ニューロンにおけるインビトロデータと一致していた。

【0227】

例8：マウス脳におけるAAV-9媒介形質導入後のSTXB P1のインビボ分布

免疫組織化学的検査(IHC)によって、AAV9ベクターのPND1注射後のマウス脳内のSTXB P1発現の分布を調査した。例7に記載したのと同じ動物からマウス脳組織を収集した。

【0228】

固定凍結切片(厚さ12 μ m; 矢状切片)をクライオスタット-ミクロトームを用いて生成し、-80°Cで保存した。以下のインキュベーション工程はいずれも、室温で行った。凍結切片をPBS 1X中で10分間すすぎ、次いで、単独で、または二重免疫蛍光のために組み合わせて、以下の一次抗体、すなわち、GFP(1:2,000; #1020, Aves)、HA(ヘマグルチニンタグ; 1:5,000; #3724, Cell Signaling)、NeuN(1:2,000; ab177487, Abcam)、GFAP(1:2,000; #173006, Synaptic Systems)、パルプアルブミン(1:500; PV235, Swant)とインキュベートし、加湿チャンバー内で一晩、0.3% Triton X-100を含有するPBSで希釈した。インキュベーション後、切片をPBSを用いて3回洗浄し、次いで、適切なAlexaコンジュゲート二次抗体(Alexa 488または647にコンジュゲートした抗マウス、抗ウサギ、抗ニワトリ)とともに1時間インキュベートした。次いで、DAPI(300nM希釈)によって対比染色して細胞核を標識し、PBSを用いて3回洗浄した。最後に、切片をProlong Gold退色防止封入剤(Life Technologies)を用いて封入し、カバースリップを適用した。染色した切片のデジタル画像を、20倍対物レンズ(Zeiss)を備えたAxioScan Z1スライドスキャナーを使用して得、Zen 3ソフトウェア(Zeiss)を使用して分析した。

【0229】

ニューロンプロモーター由来の導入遺伝子を発現する脳内の形質導入細胞の分布を試験するために、仔マウスにPND1でAAV9/hSyn-eGFPをicv注射した。ウイルス投与の1ヶ月後に動物を殺処分し、脳を解剖し、免疫組織化学的検査のために処理してGFPを標識した。

【0230】

図14：AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLSウイルス由来のGFPレポーターを使用した、マウス脳における感染細胞の分布。(A) AAV9-hSyn1-NLS-GFP-NLS icvを投与し、1ヶ月後に殺処分し、免疫染色してGFPを標識したマウス脳の矢状切片。GFPを発現する細胞の分布は、脳全体の前部から後部まで観察された。GFP+細胞を示す主な脳領域のいくつかは、長方形によって強調されている。(B~G)：AからのGFP+細胞を示す脳領域の高拡大(矢印はGFP+細胞を指す)。

【0231】

図15：AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLSウイルス由来のGFPレポーターを発現する細胞の特性評価。二重免疫蛍光標識を行って、(A~F) GFPおよびニューロンマーカーNeuN、(G~L) GFPおよび星状膠細胞マーカーGFAPを検出した。(A~C) GFPおよび(D~F) NeuNの両方に関する細胞陽性が全脳領域内で観察され(矢印は二重標識細胞を指す)、ニューロンが形質導入され、レポーター遺伝子を発現したことが示された。反対に、GFP(G~I)シグナルはGFAP陽性細胞(

10

20

30

40

50

J～L)では検出されず、星状膠細胞がレポーター遺伝子を発現していないことが示唆された。

【0232】

図16: AAV9投与後のマウス脳における様々なプロモーター由来のHA-STXB P1融合タンパク質の分布。HAに対する免疫組織化学的検査によって、マウスの脳内の様々なプロモーターから過剰発現されたHAタグ付きSTXB P1の分布を試験した。陰性対照条件として、(A) PBSのみまたは(B) AAV9-hSyn-GFPウイルスi.c.v.を投与した動物では、HAシグナルは観察されなかった。(C) 抗体選択性の陰性対照(NC)として、AAV9-MECP2-イントロン-HA-STXB P1ウイルスを投与したが免疫組織化学的検査手技中の一次HA抗体を省いた動物では、HAシグナルは観察されなかった。(D～F) 様々なプロモーター由来のHA-STXB P1を発現する様々なウイルスを注射した全動物の脳内でHAシグナルが観察された。3つのプロモーターは、脳全体にわたるHA分布の共通のパターンをもたらし、主な発現は、大脳皮質、海馬、線条体、嗅球、黒質、および前脳の繊維路で観察された。プロモーター間のHA分布の顕著な差を表16に報告する。

10

【0233】

図17: AAV9投与後の海馬における様々なプロモーター由来のHA-STXB P1融合タンパク質の分布。二重免疫蛍光標識を行って、(A～C) HA、および(D～F) 海馬の異なる部分を同定するために使用したニューロンマーカーNeuNを検出した。3つのプロモーターはいずれも、海馬全体に、主にニューロン投射(Mol、LMolまたはMF)に、時に細胞体にHA発現をもたらした。(F) MECP2-イントロンプロモーターは、他の2つのプロモーターよりも良好なカバレッジおよび高いHAシグナル強度をもたらした(D、E)。LMol: 海馬の網状層(lacunosum)分子層; MF: 苔状線維; Mol: 歯状回の分子層; Or: 多形細胞層。

20

【0234】

図18: 様々なプロモーター由来のHA-STXB P1を発現する細胞の特性評価。二重免疫蛍光標識を行って、(A～C) HAおよび(D～F) ニューロンマーカーNeuNを検出した。HAについて陽性であり、脳の異なる領域で時折観察された細胞体はNeuNについても陽性であり、3つのプロモーターがいずれも、ニューロン内で導入遺伝子発現を促進することが裏付けられた。矢印は二重標識細胞を指す。

30

【0235】

全体として、嗅球から小脳および脳幹まで脳全体にわたってGFP+細胞が観察された(図14A～G)。線条体(図14D)、大脳皮質(図14B)、海馬(図14C)および嗅球では、多数の感染細胞が顕著に観察された。二重免疫標識により、GFPとニューロンマーカーNeuNとの共局在(図15A～F)、およびGFPと星状膠細胞マーカーGFAPとの共局在の非存在(図15G～L)によって証明されるように、GFPがニューロンによってのみ発現されることが確認された。

【0236】

HAに対する免疫組織化学的検査を行うことによって、3つの異なるニューロンプロモーター、hSyn、MECP2またはMECP2-イントロンから過剰発現されたHAタグ付きSTXB P1の組織分布を分析した(図16)。3つのプロモーターは、脳全体にわたってHA発現の共通のパターンをもたらした(図16D～F)。HA染色が観察された主な領域は、大脳皮質、海馬、線条体、嗅球、黒質、および前脳の繊維路であった。MECP2-イントロンプロモーターを含むAAVを注射した動物に限り、HAシグナルが小脳内で検出された(図16F)。MECP2-イントロンプロモーターは、2つの他のプロモーターと比較して、脳全体にわたって最良のHAシグナルカバレッジおよびシグナル強度をもたらした(図16D～F)。3つのプロモーターからのHAの脳分布の要約を表16に提供する。てんかんを治療するための治療手法を開発する目的にとって重要なことに、HA発現は、てんかん発生および発作発生に関与する重要な領域である海馬および皮質に観察された。いずれのプロモーターも、海馬全体(図17)、主にニューロン投射

40

50

（苔状線維、齒状回の分子層、海馬の網状層分子層および多形細胞層）にH A発現をもたらした。最も高いH Aシグナル強度は、MECP2-イントロンプロモーターによって観察された。hSynプロモーターは中間レベルの発現をもたらしたが、MECP2プロモーターは最も弱いシグナル強度をもたらした（図17A～C）。細胞レベルでは、H A発現は、ニューロビルに主に観察され、時折、ニューロンマーカーNeuN（図18D～F）と共局在した細胞体（図18A～C）に観察され、3つのプロモーターがいずれも、ニューロン内で発現を促進することが示唆された。

【0237】

【表16】

表16：マウス脳内の異なるプロモーターに関する
HA-STXB P1導入遺伝子産物の分布の要約

	hSyn	MECP2	MECP2- イントロン
皮質	X	X	X
海馬	X	X	X
嗅球	X	X	X
線条体	X	X	X
視床	X	X	X
繊維路(前脳)	X	X	X
視床下部	X		X
中脳	X		X
黒質	X	X	X
小脳核			X
髄質			X

（x） 確認された組織発現

【0238】

例9：WTおよびヘテロ接合性STXB P1（HET）マウス脳内のSTXB P1変異体発現の特性評価

正常条件および疾患条件におけるSTXB P1タンパク質変異体の発現を評価するために、ヒトSTXB P1ハプロ不全媒介てんかんを再現し、Kovacevic et al.（2018）によって記載されているトランスジェニックマウスモデルを作製した。このマウスモデルは、University of Amsterdamのライセンスによって取得した。Stxbp1遺伝子のエクソン2の両側にloxP部位を有するStxbp1 floxed（Stxbp1 fl/fl）マウスを用いてヘテロ接合性モデルを作製した。Stxbp1 fl/flをEIIa-Cre（Jax：003724）と交配させて、生殖系列においてStxbp1エクソン2を欠失させ、Stxbp1 fl/-ヌル変異マウスを得た。floxed対立遺伝子は、Stxbp1+/-KO HETマウス系統を作製するC57BL/6Jに対する非近交系である。一方の対立遺伝子におけるエクソン2の欠失は、未熟終止コドンをもたらし、切断型および非機能性STXB P1タンパク質を発現させる。インビボ実験はいずれも、ベルギーの法律に従って動物実験倫理委員会によって発行されたガイドラインに従って行った。実験は、欧州委員会指令（20

10 / 63 / EU) に従って行った。動物の苦痛を最小限に抑えるためにあらゆる努力を払った。

【0239】

内因性STXBP1変異体の発現を評価するために、ヘテロ接合性KO (STXBP1 + / -) および野生型(WT) 同腹子(STXBP1 + / +) 雄マウスを出生5~7週間後に殺処分し、脳組織を収集し、解剖し、生化学的読出しによって分析した。後部皮質(右半球) からRNAを抽出し、ウエスタンブロット(WB) 分析のために対応する右前頭(内側) 皮質から、および液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS) 分析のために前頭皮質の外側半分からタンパク質を抽出した。

【0240】

RNA分析

RNA抽出のために、RLT Plus溶解緩衝液(10 μ l / mlの β -メルカプトエタノールを含む)(Precellys Lysing Kit CK14-2ml (VWR、432-3751)) を含有するPrecellysチューブに試料を移した。RNAに対してDNase処理を行った。Mag-Bind Total RNA 96キット(Omega, M6731) を使用して、KingFisher Flex (ThermoFisher) を用いてRNA抽出を行った。Nanodropを用いてRNA濃度を測定し、キットHigh Capacity cDNA RT Kit + RNase Inhibitor (カタログ番号4374966、ThermoFisher) を使用して、500ngのRNAを逆転写に供した。続いて、市販のプライマーおよびプローブ、および特注のプライマーおよびプローブ、マウスSTXBP1、およびマウスおよびヒトSTXBP1-長およびマウスおよびヒトSTXBP1-短アイソフォーム、ならびに2つの参照遺伝子を使用して、qPCRによって、得られたcDNAを三連で分析した。各遺伝子の発現を2つの参照遺伝子の平均に対して正規化した $2^{-\Delta C_t}$ 値を計算することによってmRNA発現レベルを得た。

【0241】

ウエスタンブロット分析

タンパク質抽出のために、Precellys 24機器(Bertin Technologies) および冷却システムを使用して、2 $\times$ プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテル(Cell Signaling Technology #5872) を含有するRIPA緩衝液(Sigma R0278) 中で組織を溶解した。試料を氷上に30分間放置し、遠心分離し、上清を最終タンパク質抽出物として収集した。BCA Protein Assay (Thermo Scientific (商標)) を使用してタンパク質濃度を決定し、10 μ gのタンパク質をLaemmli緩衝液および β -メルカプトエタノールと混合し、SDS-Pageの前に90 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートした。ゲルをニトロセルロースメンブレンに転写し、次いで、標準的なウエスタンブロット手順に供した。最初に、メンブレンをブロッキング溶液(参照番号: 927-50000; Li-Cor) 中で室温で1時間インキュベートした。以下の一次抗体を4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした: ヤギポリクローナル抗STXBP1 (1:1000、参照番号: PAB6504、Abnova) ウサギポリクローナル抗STXBP1 (1:1000、参照番号: 116002、SySy)、ウサギポリクローナル抗STXBP1 (1:1000、参照番号: HPA008209、Sigma)、マウスモノクローナル抗シタキシン-1A (1:2500、参照番号: 110111、SySy)、マウスモノクローナル抗 β -アクチン (1:10000、A2228、Sigma) およびウサギモノクローナル抗 β -アクチン (1:10000、8457P、Cell Signaling Technology)。二次抗体をRTで1時間インキュベートし、以下を使用した: IRDye (登録商標) 680RD口バ抗マウスIgG二次抗体 (1:20000; 参照番号926-68072、Li-Cor)、IRDye (登録商標) 800CW口バ抗ウサギIgG二次抗体 (1:20000; 参照番号: 926-32213、Li-Cor) およびIRDye (登録商標) 800CW口バ抗ヤギIgG二次抗体 (1:20000;

参照番号：926-32214、Li-Cor)。

【0242】

LC-MS分析

LC-MS分析のために、Precellys組織ホモジナイザー (Bertin-Instruments) を使用して、組織試料を5% SDS/50mM TEAB/1xプロテアーゼ阻害剤中でホモジナイズした。その後、タンパク質濃度をBCA (Pierce, A53227) によって決定し、各試料100μgを還元し、アルキル化した。96ウェルプレートS-Trap上で、製造業者の指示に従って (Protifi LLC, Huntington, NY)、トリプシン/Lys-C (Promega, V5072) を使用して、試料の清浄化および消化を行った。消化した試料をプレートから溶出し、真空下で乾燥させた後、LC-MS分析のために再懸濁した。再懸濁緩衝液には、0.1%ギ酸水溶液中50fmol/μlの重標識AQUAペプチド (Thermo, Paisley, UK) を含有させた。溶解物試料全体について、Waters Xevo TQ-XSに接続した、IonKey供給源を有するWaters Acquity UPLC M-Classを使用して、STXB P1ペプチドを測定した。ペプチドをWaters nanoEase M/Z Sym100 C18カラム (5μm、300μm×25mm) 上に捕捉し、Waters Peptide BEH C18 iKey (150μm×100mm、130Å 1.7μm) を用いて分離した。移動相A (0.1%ギ酸/100% H₂O) および移動相B (0.1%ギ酸/100%アセトニトリル) を用いて、3μl/分の流速で17分間の勾配を適用した。使用した勾配は、0~1分間にわたる1.0%B、1~3分間にわたる1.0~25%B、3~6分間にわたる25~40%B、6~9分間にわたる40~99%B、12~13分間にわたる99~1%Bであった。カラム温度は50°Cに設定した。供給源パラメータを以下のようにして、スケジュールされたMultiple Reaction Monitoring (MRM) 法を使用した：毛細管電圧-3.8kV、供給源温度-150°C、コーンガス-150L/時間、ネブライザーガス-5.3bar。NanoFlowガス-0.3bar。全分析について、モニタリングしたペプチドは、DNALLAQLIQDK (配列番号43)、YETSGIGEAR (配列番号44)、ISEQTYQLSR (配列番号45)、WEVLIGSTHILTPTK (配列番号46) (長アイソフォーム特異的)、およびWEVLIGSTHILTPQK (配列番号47) (短アイソフォーム特異的) であった。ペプチド1個当たり3つの遷移をモニタリングした。データ分析をSkyline (MacLean et al., 2010) で行った。各分析には、8点標準曲線およびQC試料 (低、中、高、n=2) を含めた。これらは、大腸菌 (E. coli) での組換え発現から調製した精製HAタグ付きSTXB P1タンパク質を添加したブランクのプールしたマウス肝臓ホモジネートからなった。プールしたマウス脳膜ホモジネート (ブランク、および追加のSTXB P1を添加) からなる内因性QC試料も含めた。この標準曲線に対して、総タンパク質および短アイソフォームの定量を行った。アイソフォーム特異的ペプチドの相対定量を、それぞれの内部標準に対して行った。

【0243】

図19：qPCRによるマウス脳におけるSTXB P1変異体mRNAレベルの分析。WT (野生型) 同腹子およびHET (ヘテロ接合性) マウスの後部皮質 (caudal cortex) (右半球) 由来の脳組織試料のmRNA分析 (n=11~13/群)。(A) 総内因性STXB P1のmRNA発現分析 (あらゆるSTXB P1転写物を認識する共通プローブ)。(B) および (C)：長アイソフォーム (B) または短タンパク質アイソフォーム (C) を特異的に認識する2つの異なるプローブを使用した、STXB P1変異体のmRNA発現分析。データは、 $2^{-\Delta C_t}$ 値を計算することによってmRNA発現レベルとして示しており、ここで、2つの参照遺伝子の平均に対して発現を正規化した。結果を平均±SDとして示す。

【0244】

図20：ウエスタンブロットによるマウス脳におけるSTXB P1タンパク質レベルの

分析。WT（野生型）同腹子およびHET（ヘテロ接合性）マウス（ $n = 11 \sim 13$ / 群）の右前頭（内側）皮質由来の組織試料を分析した。（A）：総STXB P1タンパク質発現を表すウエスタンブロット。（B）（A）のそれぞれのウエスタンブロットの定量データ。正規化のために、 β -アクチンをローディング対照として使用した。スケールンク群として「WT」群を使用した。結果を平均 $\pm$ SDとして示す。

【0245】

図21：LC-MSによるマウス脳におけるSTXB P1変異体タンパク質レベルの分析。WT（野生型）同腹子およびHET（ヘテロ接合性）マウス（ $n = 11 \sim 13$ / 群）の前頭皮質の外側半分由来の組織試料を分析した。（A）総STXB P1ペプチド対STXB P1長アイソフォーム対STXB P1短アイソフォームの定量。結果を平均 $\pm$ SDとして示す。（B）：STXB P1短アイソフォームおよび長アイソフォームを表すウエスタンブロット。（C）：（B）のそれぞれのウエスタンブロットの組み合わせた定量データ。 β -アクチンをローディング対照として使用した。データは、各STXB P1アイソフォームのバンド強度とそれぞれの β -アクチンバンドとの比として示している。結果を平均 $\pm$ SDとして示す。

10

【0246】

図22：ウエスタンブロットによるマウス脳におけるシンタキシン-1A（STX1A）タンパク質レベルの分析。マウス脳組織試料におけるSTX1Aタンパク質発現の定量（ $n = 11 \sim 13$ / 群）。正規化のために、 β -アクチンをローディング対照として使用した。スケールンク群として「WT」群を使用した。結果を平均 $\pm$ SDとして示す。

20

【0247】

WTおよびヘテロ接合性（+ / -）KOマウス（図ではHETと呼ぶ）におけるRNA転写物分析の結果を図19（A～C）に示す。HETマウスでは、総STXB P1の内因性マウスmRNA転写物レベルが低下する（図19（A））。また、STXB P1の短アイソフォームおよび長アイソフォームが、WT同腹子と比較した場合、HETマウスでは減少する（37～43%）ことが観察された（図19（B、C））。総STXB P1のウエスタンブロット分析により、WT動物と比較した場合、HETマウスでは60～70%のタンパク質減少が確認された（図20）。

【0248】

LC-MSによるSTXB P1タンパク質アイソフォームの定量（図21）は、短STXB P1変異体が、長アイソフォームの全体レベルと比較した場合、WTおよびHET動物のマウス脳内では最も豊富であることを示した（図21（A））。HET動物におけるSTXB P1ペプチドの定量は、総STXB P1、STXB P1の短変異体および長変異体が、WT同腹子と比較した場合、約60%減少することを示した。また、ウエスタンブロットデータにより、WT動物と比較した場合、HET動物におけるSTXB P1の短アイソフォームおよび長アイソフォームの同じ全体的な減少が確認された（図21、パネルBおよびC）。

30

【0249】

STXB P1は、シンタキシン-1Aタンパク質（STX1A）のシャペロンとして作用し、シナプス小胞の輸送、ドッキングおよび放出を確実にすることが報告されている（Dulubova I. et al. 2007, Saitsu H. et al. 2008）。図22に示すように、STXB P1のハプロ不全是、WT同腹子と比較した場合、HETマウスではSTX1Aタンパク質レベルを50～60%低下させる。

40

【0250】

全体として、データは、マウス脳におけるSTXB P1アイソフォーム発現レベルの広範囲な特性評価と、ヒトSTXB P1ハプロ不全を再現するトランスジェニックマウスモデルにおける内因性STXB P1変異体mRNAおよびタンパク質レベルの低下の検証とを初めて提供する。

【0251】

例10：ハプロ不全マウスモデルにおけるSTXB P1変異体のAAV媒介過剰発現

50

例 7 に記載するように、出生後 1 日齢の新生仔マウス（PND 1）の脳への両側性脳室内（ICV）注射によってウイルスベクターを投与した。ICV 新生仔注射のための方法は以前に記載されている（Bertrand-Mathon, et al. 2015; Kim, et al. 2014; Hamodi, et al. 2020）。注射した動物を 7 週間の期間にわたってモニタリングし、STXBP1 の発現および分布を脳組織に対する生化学的読出しによって分析した。実験には以下の群を含めた：

- ・ヘテロ接合性 KO（STXBP1 + / -）（HET と呼ばれる）
- ・野生型同腹子（STXBP1 + / +）雄マウス（WT と呼ばれる）
- ・表 17 に記載の 2 つのウイルスベクターの一方を両側注射した HET マウス

【0252】

【表 17】

10

表 17：AAV9 ウイルスベクターの特性

ベクターID	プロモーター	STXBP1 変異体	カプシド	ウイルス ゲノム力価 (vg/mL)	内毒素 (<10 EU/mL)
AAV9(L)	Mecp2_イントロン (配列番号 3+ 配列番号 37)	長変異体 (配列番号 9)	AAV9	9.43E12	可
AAV9(S)	Mecp2_イントロン (配列番号 3+ 配列番号 37)	短変異体 (配列番号 10)	AAV9	6.91E12	可

20

【0253】

WT および HET マウスの 1 つの追加の群に、対照として使用するためにビヒクルー PBS を注射した。インビボ実験条件の要約を表 18 に示す。

【0254】

注射後 7 週間で、脳組織を収集し、解剖し、生化学的分析に供した。DNA / RNA を後部皮質（右半球）から抽出し、タンパク質を対応する右前頭（内側）皮質から抽出した。例 7 に記載されているように、DNA および RNA の両方を同じ溶解緩衝液組成物によって抽出した。プロテイナーゼ K および RNase 処理を DNA に対して行った。Mag-Bind（商標）HDQ Blood DNA & Tissue 96 Kit（Omega, M6399）を使用して DNA を抽出した。Qubit（商標）dsDNA BR Assay Kit（ThermoFisher, Q32853）を備えた Qubit（商標）Flex Fluorometer（ThermoFisher）を使用して DNA 濃度を測定し、同じ総 DNA 量を全試料について調整し、SV40 20 ポリ A シグナル（全 AAV カセットに存在する）に特異的なプライマー／プローブを用いた qPCR に 40 ng を使用した。ValidPrime（登録商標）キット（tataa bio center, A106P25）を使用してマウスゲノムの量を分析した。ValidPrime（登録商標）配列は、正常な半数体ゲノム 1 個当たり正確に 1 つのコピーで存在する、gDNA の非転写遺伝子座に特異的である。SV40p および ValidPrime（登録商標）の両方について、標準曲線法を使用して絶対コピー数を決定した。

30

40

【0255】

RNA 抽出工程、および cDNA への変換を例 7 に記載する。市販のプライマーおよびプローブ、および特注のプライマーおよびプローブ、例えば、SV40 ポリ A、ヒト STXBP1、マウス STXBP1、マウス STX1A、マウスおよびヒト STXBP1-長アイソフォーム、およびマウスおよびヒト STXBP1-短アイソフォーム、ならびに 2 つの参照遺伝子を使用して、qPCR によって、得られた cDNA を三連で分析した。各遺伝子の発現を 2 つの参照遺伝子の平均に対して正規化した $2^{-\Delta C_t}$ 値を計算すること

50

によってmRNA発現レベルを得た。例7に記載されるように、タンパク質抽出およびウエスタンブロット分析を行った。

【0256】

図23：qPCRによるマウス脳におけるAAV形質導入効率の分析（注射7週間後）（A）ビヒクル-PBSを注射したWTマウス（WT）、ビヒクル-PBSを注射したHETマウス（HET）、STXB P1長変異体を注射したHETマウス（HET-AAV9（L））、およびSTXB P1短変異体を注射したHETマウス（HET-AAV9（S））におけるウイルスゲノムコピーのqPCRによる絶対定量。試料を後部皮質（右半球）から収集し、二倍体マウスゲノムの絶対数に対して正規化したSV40pAを使用して定量した。結果を平均±SDとして示す。1群当たりn=14~15の動物を分析し、ノンパラメトリック一元配置ANOVA（Kruskal-Wallis検定）、続いてDunnの事後多重比較検定を適用した。形質導入群間に有意差は認められなかった。（B）SV40ポリAおよび（C）ヒト特異的STXB P1のmRNA発現分析。データは、 $2^{-\Delta C_t}$ 値を計算することによってmRNA発現レベルとして示しており、ここで、2つの参照遺伝子の平均に対して発現を正規化した。結果を平均±SDとして示す。1群当たりn=14~15の動物を分析し、ノンパラメトリック一元配置ANOVA（Kruskal-Wallis検定）、続いてDunnの事後多重比較検定を適用した。形質導入群間に有意差は認められなかった。

10

【0257】

図24：qPCRによるマウス脳におけるAAV処置後のSTXB P1変異体発現の分析（注射7週間後）。短変異体（A）または長変異体（B）の総（マウスおよびヒト）レベルを特異的に測定するプローブを使用して、STXB P1変異体mRNA発現の分析を行った。データは、 $2^{-\Delta C_t}$ 値を計算することによってmRNA発現レベルとして示しており、ここで、2つの参照遺伝子の平均に対して発現を正規化した。結果を平均±SDとして示す。1群当たりn=14~16の動物を分析した。

20

【0258】

図25：ウエスタンブロットによるマウス脳におけるAAV処置後のSTXB P1変異体発現の分析（注射7週間後）。ビヒクル-PBSを注射したWTマウス（WT）、ビヒクル-PBSを注射したHETマウス（HET）、STXB P1長変異体を注射したHETマウス（HET-AAV9（L））、およびSTXB P1短変異体を注射したHETマウス（HET-AAV9（S））における右前頭（内側）皮質由来の試料のウエスタンブロットによるタンパク質分析

30

（A）総STXB P1（長変異体および短変異体）タンパク質発現に関するウエスタンブロットデータの定量。

（B）長STXB P1変異体タンパク質発現に関するウエスタンブロットデータの定量。

（C）短STXB P1変異体タンパク質発現に関するウエスタンブロットデータの定量。

（D）シンタキシン-1Aタンパク質発現に関するウエスタンブロットデータの定量

各STXB P1およびSTX1Aバンド強度の正規化のために、 β -アクチンをローディング対照として使用した。スケール群としてビヒクルWT群（WT）を使用した。結果を平均±SDとして示す。ノンパラメトリック一元配置ANOVA（Kruskal-Wallis検定）、続いてDunnの事後多重比較検定を使用して、データを分析した（* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ ；**** $p < 0.0001$ ）。

40

【0259】

図26：免疫組織化学的検査による、マウス脳におけるAAV処置後のHAタグ付きSTXB P1発現の脳分布（注射7週間後）。HAタグ付きSTXB P1長変異体を注射したHETマウス由来の矢状切片に対してHAタグ染色を行い、ビヒクル（PBS）処置マウスと比較した。AAV処置群（動物6023）およびビヒクル処置群（動物6009）

50

の代表的な脳切片の例を示す。動物 6023 (AAV 処置) では主要な脳領域内で強い HA 染色が観察されるが、PBS 処置群 (動物 6009) では HA 染色は観察されない。

【0260】

図 23 (A) に示すように、AAV 処置群から得られたマウス脳では、二倍体マウスゲノム 1 個当たりの顕著なウイルスゲノムコピーが検出され、STXB P1 の長変異体および短変異体をコードする 2 つのカセットを用いた効率的なウイルス形質導入が実証された。ヒト STXB P1 導入遺伝子 (図 23 (B)) および SV40 pA 発現 (mRNA) (図 23 (C)) の両方は、ウイルスベクターによって形質導入された群でのみ検出され、注射したウイルス DNA 量によって同様の発現傾向が示された。

【0261】

HET 動物の AAV9 形質導入は、内因性マウス変異体発現レベルに影響を及ぼすことなく、短 STXB P1 変異体および長 STXB P1 変異体の堅牢かつ選択的な過剰発現をもたらした (図 24)。

【0262】

ウエスタンブロット分析により、図 25 (A) に示すように、ビヒクルー PBS を注射した HET マウスと比較した場合、両 AAV 処置群では総 STXB P1 レベルの有意な過剰発現が確認された。STXB P1 長アイソフォームを特異的に認識する抗体を使用したウエスタンブロット定量は、STXB P1 長カセットを用いた AAV 処置群でのみ長変異体の有意かつ特異的な過剰発現を示した (図 25 (B))。同様に、STXB P1 短アイソフォームに対する特異的抗体を使用すると、HET-PBS 注射動物と比較して、STXB P1 短カセットを形質導入した群でのみ有意かつ特異的なタンパク質過剰発現が観察された (図 25 (C))。さらに、短変異体または長変異体のいずれかによる AAV 処置は、シンタキシン-1A (STX1A) タンパク質レベルを部分的に救済し、シンタキシン-1A (STX1A) タンパク質レベルは、図 25 (D) に示すように、ビヒクルー PBS を注射した HET マウスと比較した場合に有意に増加した。AAV 処置群における STX1A レベルの増加により、ヒト STXB P1 導入遺伝子産物発現の機能的影響がさらに確認される。

【0263】

全体として、短変異体または長変異体のいずれかによって処置した HET 動物は、ヒト STXB P1 導入遺伝子産物の効率的な過剰発現を示し、このマウスモデルに対して STXB P1 ハプロ不全の同様の救済をもたらした。

【0264】

STXB P1 長変異体との HA タグ付き融合物をコードするウイルスカセットを注射した追加の動物群を使用して、免疫組織化学的検査 (IHC) によって、AAV9 ベクターの PND1 注射後のマウス脳内の STXB P1 導入遺伝子産物発現の分布を調査した (例 7 に記載)。固定凍結切片 (厚さ 12 μm ; 矢状切片) をクライオスタット-ミクロトームを用いて生成し、 -80°C で保存した。染色手順および検出方法は例 8 に記載される通りであった。

【0265】

図 26 に示すように、AAV 媒介導入遺伝子 STXB P1 タンパク質発現は、7 週間後に、脳全体 (動物 6023) にわたって、矢状切片、主に線条体、海馬、大脳皮質、視床下部、淡蒼球および中隔内で HA タグ標識を通じて検出された。PBS のみを投与した HET 動物 (動物 6009) では、これらの脳領域にわたって主要な HA シグナルは観察されなかった。IHC データにより、Mecp2 __イントロン__ STXB P1 (長) カセットの AAV 媒介形質導入が STXB P1 タンパク質の広い脳発現をもたらすことが確認される。

【0266】

例 11: STXB P1 ヘテロ接合性疾患モデルにおける発作表現型を救済するための AAV 遺伝子療法

正常条件および疾患条件における AAV ベクターの有効性を評価するために、ヒト ST

10

20

30

40

50

XBP1ハプロ不全媒介てんかんを再現し、Kovacevic et al. (2018)によって記載されているトランスジェニックマウスモデルを作製した。このマウスモデルは、University of Amsterdamのライセンスによって取得した。Stxbp1遺伝子のエクソン2の両側にloxP部位を有するStxbp1^{fl}/lox^{ed} (Stxbp1^{fl}/fl)マウスを用いてヘテロ接合性モデルを作製した。Stxbp1^{fl}/flをEIIa-Cre (Jax: 003724)と交配させて、生殖系列においてStxbp1エクソン2を欠失させ、Stxbp1^{fl}/−ヌル変異マウスを得た。fl^{oxed}対立遺伝子は、Stxbp1⁺/−KO HETマウス系統を作製するC57BL/6Jに対する非近交系である。一方の対立遺伝子におけるエクソン2の欠失は、未熟終止コドンをもたらし、切断型および非機能性STXP1タンパク質を発現させる。インビボ実験はいずれも、ベルギーの法律に従って動物実験倫理委員会によって発行されたガイドラインに従って行った。実験は、欧州委員会指令(2010/63/EU)に従って行った。動物の苦痛を最小限に抑えるためにあらゆる努力を払った。

10

20

【0267】

ヘテロ接合性(HET)KOおよび野生型同腹子(WT)雄マウスの側脳室に、出生後1日目に、長または短STXP1変異体をコードする2つのウイルスベクターのうちの1つ(表17を参照)を両側注射した。実験条件を表18に要約する。各遺伝子型からのマウスの1つの追加の群に、対照として使用するためにビヒクル-PBSを注射した。マウスの全体的な健康状態を評価するために、注射後3週間にわたって週に1回、および注射後3~7週間にわたって連日、臨床徴候をモニタリングした。方法論的手順および攻撃的行動に関連する群にわたって限られた死亡率が観察されたが、治療または遺伝子型に関連するものではなかった。

【0268】

【表18】

表18：インビボ実験条件の要約

遺伝子型	処置時 日齢	送達 経路	処置	力価	試料 サイズ	生存中評価	発作 モニタリング	末期評価
HET	出生後 1日目	ICV 両側性 2μl/ 半球	AAV9(L)*	9.43 E12 GC/mL	N=15	注射後7週 間の臨床徴 候、有害作 用、体重増 加および死 亡率	インビボ無線 EEGビデオ 遠隔測定記録 (注射後6~7 週間)	生化学的分析、 病理組織診断、 免疫組織化学的 検査、導入遺伝 子発現のための 注射7週間後の 脳、血漿および 器官の収集。
			AAV9(S)*	6.91 E12 GC/mL	N=16			
			ビヒクル- PBS	--	N=19			
WT	出生後 1日目	ICV 両側性 2μl/ 半球	ビヒクル- PBS	--	N=10			

30

*表17に記載

40

【0269】

注射6週間後、インビボ無線EEG(脳波図)ビデオ遠隔測定記録を1週間行って、発作の発生を評価した。注射5週間後に、STXP1⁺/−マウスに皮下遠隔測定送信機および皮質EEG電極を外科的に埋め込んだ。手術は滅菌/無菌条件下で行った。麻酔したマウス(酸素導入時のイソフルラン: 2l/分で5%、1.5l/分で2.5~1.5%を維持)を、加熱パッドを備えた定位固定フレームに入れ、記録電極については前頭前皮質の頭蓋骨表面(十字縫合上)に、参照電極については小脳の頭蓋骨表面(人字縫合の後ろ)に穴を開けた。その後、Open Source Instruments(OSI)A3028S2 ECoG送信機を背側の皮下に埋め込み、取り付けられたワイヤを

50

頭蓋まで皮下に延ばし、記録電極および参照電極を各穴を通して脳実質内に約 0.5 mm 配置した。ねじ (Plastics One) によって各電極を定位置に固定した。アセンブリ全体をシアノアクリレートおよび歯科用セメントを用いて定位置に保持し、小さな円形のヘッドピースを形成し、背側をナイロン吸収性縫合糸材料によって閉じた。術後の薬物療法および疼痛管理には、手術前投与 24 時間後の 2 回目のカルプロフェン投与 (10 mg / kg) を含めた。手術後、マウスは 2 ~ 3 時間かけて加温チャンバー内で回復していた。インビボ無線 EEG ビデオ遠隔測定記録のために、マウスを集団飼育した (マウス 2 ~ 3 匹 / ケージ)。記録を容易にするために、マウスのケージをファラデー筐体に入れた。埋込みを行ったマウスの福祉モニタリングを 2 週間にわたって 1 日 1 回行った。マウスの体重を 4 日間連日測定し、その後、週に 1 回測定した。周囲の干渉を減少させ、送信信号の受信を改善するために、温度および湿度制御を備えた意図的に設計された記録室であらゆる記録を行った。信号は、埋め込まれた送信機からファラデー筐体内に配置されたアンテナに無線送信された。一方の記録チャンネルからの EEG 信号を 256 Hz でデジタル化した (バンドパスフィルタ: 0.3 ~ 80 Hz)。社内の自動化された発作検出ソフトウェアを用いて、欠神発作に典型的な棘徐波発射 (SWD) を分析した。SWD 検出アルゴリズムは、事象持続時間分析 (> 2 秒)、帯域周波数分析 (5 ~ 9 Hz)、および特定の基本高調波周波数の同定に基づくものであった。アルゴリズムによって検出された各 SWD は、少なくとも 1 人の経験豊富な観察者によって盲検様式で確認された。その結果、異なるカセットベクターおよびビヒクル群について、この期間中に EEG 分析を行った。ベクター処置群では、EEG シグナルにおける技術的アーチファクトの発生のために、合計 4 匹の動物を分析から除外した: (AAV9-MECP2+イントロナー-STXB P1 (長変異体) (17 匹中 2 匹)、および AAV9-MECP2+イントロナー-STXB P1 (短変異体) (18 匹中 2 匹))。

10

20

30

40

50

【0270】

図 27: 注射 (6 ~ 7 週間後) (A、B) および 24 週間後 (C、D) の EEG による、STXB P1 HET マウス脳における AAV 処置後の棘徐波発射 (SWD) の分析。

(A) ビヒクル-PBS を注射した WT マウス (WT、n = 10)、ビヒクル-PBS を注射した HET マウス (HET、n = 19)、STXB P1 長変異体を注射した HET マウス (HET-AAV9 (L)、n = 15)、および STXB P1 短変異体を注射した HET マウス (HET-AAV9 (S)、n = 16) における SWD の平均数。注射 6 ~ 7 週間後、24 時間にわたって 7 日間連続して SWD を分析した。(B) 「無発作」動物 (記録中に SWD が検出されなかった) および 「発作がある」動物 (記録中に SWD が検出された) の数の分析。(C) ビヒクル-PBS を注射した WT マウス (WT、n = 5)、ビヒクル-PBS を注射した HET マウス (HET、n = 12)、STXB P1 長変異体を注射した HET マウス (HET-AAV9 (L)、n = 9)、および STXB P1 短変異体を注射した HET マウス (HET-AAV9 (S)、n = 11) における SWD の平均数。注射 24 週間後、24 時間にわたって 7 日間連続して SWD を分析した。(D) 注射 24 週間後の 「無発作」動物 (記録中に SWD が検出されなかった) および 「発作がある」動物 (記録中に SWD が検出された) の数の分析。ノンパラメトリック一元配置 ANOVA (Kruskal-Wallis 検定)、続いて Dunn の事後多重比較検定 (***p < 0.0001)、(***p < 0.001) によって群間差を分析し、無発作分析ではカイ二乗分割検定を使用した。

【0271】

図 27 (A) に示すように、24 時間にわたって 7 日間連続して記録された 1 日当たりの SWD の平均数は、ビヒクル群と比較して、長変異体 (HET-AAV9 (L)) および短変異体 (HET-AAV9 (S)) のいずれかによって処置された HET マウスでは 70% および 65% 有意に減少した。長変異体によって処置された HET マウスでは、26% の無発作動物が示された (図 27 (B)、短変異体と比較した有意差)。詳細な EEG 分析では、記録中に処置動物における痙攣発作の発生は検出されなかった (1 週間 24 / 7)。

【0272】

ノンパラメトリック一元配置ANOVA、続いて事後多重比較検定（**** $p < 0.0001$ ）によってSWD頻度に関する群間差を分析し、無発作分析ではカイ二乗分割検定を使用した。

【0273】

さらに、様々な群を用いて、注射した動物の脳および器官組織に対して生化学的および組織病理学的分析を行った。導入遺伝子発現評価のために、例7に記載されるのと同じ方法に従って、注射7週間後にマウスを殺処分した。後部皮質を収集し、DNA/RNA抽出に供し、例7に記載したのと同じ方法を使用して、対応する半内側前頭皮質をタンパク質抽出に使用した。

10

【0274】

同じ実験デザインを使用してSTXBP1遺伝子療法処置の効果の持続性を測定するために、別個の動物群を対象として6ヶ月間の長期試験を行った。注射24週間後、インビボ無線EEG（脳波図）ビデオ遠隔測定記録を1週間行って、発作の発生を評価した。図27（C）に示すように、24時間にわたって7日間連続して記録された1日当たりのSWDの平均数は、ビヒクル群と比較して、長変異体（HET-AAV9（L））または短変異体（HET-AAV9（S））のいずれかによってそれぞれ処置されたHETマウスでは95%および92%有意に減少した。長変異体または短変異体によって処置されたHETマウスでは、それぞれ78%および64%の無発作動物が示された（図27（D））。詳細なEEG分析では、記録中に処置動物における痙攣発作の発生は検出されなかった（1週間24/7）。

20

【0275】

例12：STXBP1ヘテロ接合性疾患モデルにおける行動表現型を救済するためのAAV遺伝子療法

ヘテロ接合性STXBP1 KO（HET）雄マウスならびにその性別および年齢を一致させた野生型（WT）同腹子における異なる行動疾患表現型に対するAAV媒介遺伝子療法の有効性を評価するために、Mecp2__イントロンプロモーターの制御下でヒトSTXBP1の長変異体または短変異体をコードするウイルスベクター（表17を参照）を側脳室に両側注射した。これらの動物群は、例11で使用したものとは別であった。

【0276】

処置した動物を、4週齢から22週齢まで一連の行動試験に供した。各遺伝子型からのマウスの1つの追加の群に、対照として使用するためにビヒクル-PBSを注射した。行動実験はいずれも、ベルギーの法律に従って動物実験倫理委員会によって発行されたガイドラインに従って行った。実験は、欧州委員会指令（2010/63/EU）に従って行った。動物の苦痛を最小限に抑えるためにあらゆる努力を払った。

30

【0277】

図28：STXBP1 HETマウス（注射1～22週間後）におけるAAV処置後の体重の分析（A）ビヒクル-PBSを注射したWT（ $n = 17$ ）およびHETマウス（ $n = 16$ ）における週齢の関数としての平均体重。二元配置反復測定ANOVA、続いて補正されていないFisherのLSD事後多重比較検定によって群間差を分析した（* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ ；**** $p < 0.0001$ ）。（B）ビヒクル-PBSを注射したWTマウス（WT、 $n = 17$ ）、ならびにビヒクル-PBSを注射したHETマウス（HET、 $n = 16$ ）、STXBP1長変異体を注射したHETマウス（HET-AAV9（L）、 $n = 10$ ）、およびSTXBP1短変異体を注射したHETマウス（HET-AAV9（S）、 $n = 13$ ）において22週齢で測定した平均体重。パラメトリック一元配置ANOVA、続いて補正されていないFisherのLSD事後多重比較検定によって群間差を分析した** $p < 0.01$ ；**** $p < 0.0001$ ；ns、有意でない）。棒グラフは平均±SEMである。

40

【0278】

図29：STXBP1 HETマウス（注射4～22週間後）におけるAAV処置後の

50

後肢抱擁 (hind limb clasping) の分析 (A) ビヒクルーPBSを注射したWTマウス (WT、 $n=17$)、ならびにビヒクルーPBSを注射したHETマウス (HET、 $n=16$)、STXB P1長変異体を注射したHETマウス (HET-AAV9 (L)、 $n=10$)、およびSTXB P1短変異体を注射したHETマウス (HET-AAV9 (S)、 $n=13$) における週齢の関数としての平均後肢抱擁スコア。(B) ビヒクルーPBSを注射したWTマウス ($n=17$)、ならびにビヒクルーPBS ($n=16$)、AAV9/MECP2-int-STXB P1-L ($n=10$) およびAAV9/MECP2-int-STXB P1-S ($n=13$) を注射したHETマウスにおいて22週齢で記録した平均後肢抱擁スコア。ノンパラメトリック一元配置ANOVA (Kruskal-Wallis検定)、続いて補正されていないDunnの事後多重比較検定によって群間差を分析した ($* < p . 0 . 0 5$; $** p < 0 . 0 1$; $*** p < 0 . 0 0 1$; ns、有意でない)。棒グラフは平均±SEMである。

10

【0279】

図30：AAV処置後（注射8週間後）のワイヤーハンギング試験におけるSTXB P1 HETマウスの分析。ビヒクルーPBSを注射したWTマウス (WT、 $n=17$)、ビヒクルーPBSを注射したHETマウス (HET、 $n=16$)、STXB P1長変異体を注射したHETマウス (HET-AAV9 (L)、 $n=10$)、およびSTXB P1短変異体を注射したHETマウス (HET-AAV9 (S)、 $n=13$) において、8週齢での四肢ワイヤーハンギング試験で測定した落下するまでの時間。パラメトリック一元配置ANOVA、続いて補正されていないFisherのLSD事後多重比較検定によって群間差を分析した ($**** p < 0 . 0 0 0 1$; ns、有意でない)。棒グラフは平均±SEMである。

20

【0280】

図31：AAV処置後（注射10週間後）の恐怖条件付け試験におけるSTXB P1 HETマウスの分析 (A) ビヒクルーPBSを注射したWTマウス (WT、 $n=17$)、ならびにビヒクルーPBSを注射したHETマウス (HET、 $n=16$)、STXB P1長変異体を注射したHETマウス (HET-AAV9 (L)、 $n=10$)、およびSTXB P1短変異体を注射したHETマウス (HET-AAV9 (S)、 $n=13$) における、恐怖条件付け訓練段階の24時間後に10週齢で行った文脈的恐怖記憶試験中の平均すくみ行動。パラメトリック一元配置ANOVA、続いて補正されていないFisherのLSD事後多重比較検定によって群間差を分析した ($* < p . 0 . 0 5$; $**** p < 0 . 0 0 0 1$)。 (B) 文脈的恐怖記憶試験の1時間後に (A) と同じ動物に対して行った合図恐怖記憶試験 (cued fear memory test) 中の平均すくみ行動。パラメトリック一元配置ANOVA、続いて補正されていないFisherのLSD事後多重比較検定によって群間差を分析した ($* p < 0 . 0 5$; $*** p < 0 . 0 0 1$; $**** p < 0 . 0 0 0 1$)。棒グラフは平均±SEMである。

30

【0281】

体重

注射1～22週間後、動物の体重を週に1回追跡した。図28 (A) に示すように、ビヒクルーPBSを注射したHETマウスは、ビヒクルーPBSを注射したWT同腹子と比較した場合、1～22週齢まで一定した有意な体重減少を示した。この体重不足は、22週目にHETビヒクルーPBS群との有意差を示す、STXB P1長変異体 (HET-AAV9 (L)) によるAAV処置によって救済することができた (図28 (B))。STXB P1短変異体群は、22週齢で体重増加の傾向を示した。

40

【0282】

後肢抱擁

後肢抱擁 (Guyenet et al., 2010) を4～10週齢まで週に1回、および10～22週齢まで3週に1回記録した。マウスを尾によって吊るし、後肢の位置を10秒間観察した。後肢が腹部から離れて外向きに一定に広がっている場合、スコア0を割り当てた。吊るした時間の50%を超えて後肢1本が腹部に向かって引っ込められた

50

場合、スコア 1 とした。吊るした時間の 50 % を超えて両後肢が腹部に向かって部分的に引っ込められた場合、スコア 2 とした。両後肢が完全に引っ込められ、吊るした時間の 50 % を超えて腹部に触れた場合、スコア 3 とした。各マウスを 3 回観察し、平均スコア値を統計分析に使用した。

【0283】

図 29 (A) は、4 ~ 22 週目の 4 つの動物群における後肢抱擁スコアの進行を示す。対照 WT 同腹子 (WT-v eh) と比較した場合、ビヒクル処置 HET マウス (HET-v eh) は 5 週齢で後肢抱擁を示し始め、これは 7 週齢で安定し、STXB P1 ハプロ不全モデルにおけるジストニアの発症が示された。HET マウスに対する長 STXB P1 変異体または短 STXB P1 変異体のいずれかによる AAV 処置は、5 ~ 22 週間にわたって HET ビヒクル群と比較して後肢抱擁の進行を減弱させた。22 週齢では、STXB P1 長変異体によって処置した HET マウスに記録された後肢抱擁の程度は WT 対照群と同様であり (有意差なし、ns)、ジストニア表現型の救済が示された (図 29 (B))。STXB P1 短変異体は、22 週齢の HET マウスでは、後肢抱擁重症度スコアを有意に低下させたが、ジストニア表現型を WT レベルまで回復させなかった (図 29 (B))。

10

【0284】

ワイヤーハンギング試験

AAV 処置の 8 週間後、マウスを四肢ワイヤーハンギング試験 (Klein et al., 2012) に供して、筋力を評価した。マウスをワイヤーメッシュ上に置き、次いで、これを逆さにして穏やかに振り、マウスがワイヤーを握るようにした。落下するまでの時間を記録し、カットオフ時間は 90 秒とした。図 30 に示すように、ビヒクル-PBS を注射した HET マウスは、ビヒクル-PBS によって処置した WT 同腹子と比較した場合、8 週齢で、落下するまでの時間の有意な増加を示した。長ヒト STXB P1 変異体または短ヒト STXB P1 変異体のいずれかをコードする AAV によって処置した HET マウスでは、落下するまでの時間の増加が消失し、ハプロ不全モデルにおける表現型の完全な救済が示唆された (図 30)。

20

【0285】

恐怖条件付け試験

AAV 処置の 10 週間後、Pavlovian 恐怖条件付けパラダイム (Curzon et al., 2009) を使用して、連想学習および記憶を評価した。連想学習および記憶では、マウスは、特定の環境 (すなわち、文脈) および音 (すなわち、合図) を、電気足ショックと関連付けるように学習する。恐怖記憶はマウスのすくみによって現れ、その後、電気ショックを用いず、マウスはこの特定の文脈または合図にさらされる。電気ショックをもたらすための格子床を有するチャンバー (Ugo Basile) 内で恐怖条件付け試験を行った。チャンバーの上のカメラを使用してマウスをモニタリングした。6 分間の訓練段階中、ベースラインのすくみを評価するためにマウスを 2 分間の順応期間にわたってチャンバー (114 ~ 116 ルクス光強度、灰色の壁 1 枚、グリッド床が見える) に入れ、次いで、音 (78 ~ 80 dB、4 kHz) を 30 秒間オンにし、直ちに軽度の足ショック (2 秒、0.5 mA) を与えた。同じ音-足ショック関連付けを最初のものの後に 1 分間の間隔時間を置いてさらに 2 回繰り返した。訓練段階の後、マウスはホームケージに戻った。24 時間後、文脈的恐怖記憶についてマウスを試験した。そのために、マウスを同じ訓練チャンバーに入れ、音または足ショック刺激を用いず、そのすくみ行動を 5 分間モニタリングした。次いで、マウスをホームケージに戻した。1 時間後、格子縞の壁 3 つ (金属グリッドは見えず、白色の 1 階) および 14 ~ 16 ルクス光強度によって変化した後のチャンバーにマウスを移して、合図恐怖記憶試験のための新たな文脈を作り出した。ベースラインすくみを測定するために、チャンバー内の 2 分間の順応期間の後、足ショックを用いず、訓練段階で使用したのと同じ音合図を 30 秒間 4 回オンにし、7.5 分間の試験時間中にすくみ行動をモニタリングした。Ethovision ソフトウェア (Noldus) を使用した自動ビデオベースシステムを使用してすくみ時間を決定した。

30

40

50

【0286】

図31は、4つの動物群に関する文脈的試験（図31（A））および合図試験（図31（B））の結果を示す。ビヒクルーPBSによって処置したSTXBP1 HETマウスは、WT同腹子と比較した場合、文脈および合図によって誘導されたすくみ行動の著しい減少を示し、STXBP1ハプロ不全モデルにおける連想学習および記憶の障害が示された（図31（A、B））。長STXBP1変異体および短STXBP1変異体によるAAV処置は、文脈的および合図試験では、すくみ行動の増加をもたらした（図31（A、B））。長変異体処置の効果は、HETビヒクル処置群とは有意に異なり、文脈および合図によって誘導されたすくみ行動の救済が示された。短STXBP1変異体処置は、HETビヒクル処置動物と比較した場合、合図試験では有意な増加をもたらした（図31（B））、文脈的試験では、すくみを増加させる傾向を示した（図31（A））。全体として、STXBP1変異体によるAAV処置は、STXBP1ハプロ不全マウスモデルでは、観察された連想学習および記憶の障害を救済する可能性を有した。

【0287】

表19：STXBP1ハプロ不全マウスモデルにおける行動疾患症状の概要

HET STXBP1マウスにおける観察結果をWT同腹子と比較し、減少（↓）または増加（↑）として分類した。STXBP1の長変異体過剰発現または短変異体過剰発現のいずれかを含む、AAV処置の効果を、「回復」（HETビヒクル処置マウスに対する統計的に有意な変化）または「傾向」（観察されたが統計的に有意でない変化）として標識した。

【表19】

			AAV処置群	
症状	試験	HETにおける 観察結果 (対WT)	長変異体	短変異体
成長不足	体重	↓	回復	傾向
てんかん	発作(SWD)	↑	回復	回復
運動機能障害	後肢抱擁(ジストニア)	↑	回復	回復
	ワイヤーハンギング(筋力)	↑	回復	回復
精神障害	恐怖条件付け (連想学習記憶)	↓	回復	傾向

【0288】

参考文献

10

20

30

40

50

Abramov D, Guiberson NGL, Burre J (2020). STXBP1 encephalopathies: Clinical spectrum, disease mechanisms, and therapeutic strategies. *Journal of neurochemistry*.

Bertrand-Mathon et al. (2015). Increasing the effectiveness of intracerebral injections in adult and neonatal mice: a neurosurgical point of view. *Neuroscience Bulletin*, Springer Verlag, 2015, 31 (6), pp.685-696. hal-01196282.

Chen W, Cai ZL, Chao ES, Chen H, Longley CM, Hao S, et al. (2020). Stxbp1/Munc18-1 haploinsufficiency impairs inhibition and mediates key neurological features of STXBP1 encephalopathy. *eLife* 9.

Curzon et al. (2009) *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, Chapter 2.

Dulubova I et al. (2007) Munc18–1 binds directly to the neuronal SNARE complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 2697–2702.

Guyenet et al. (2010) A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia, *J Vis Exp*. 21:1787.

Hamada N, Iwamoto I, Tabata H, Nagata KI (2017). MUNC18-1 gene abnormalities are involved in neurodevelopmental disorders through defective cortical architecture during brain development. *Acta Neuropathol Commun* 5: 92.

10

20

30

40

50

Hamodi, A. et al. (2020). Transverse sinus injections drive robust whole-brain expression of transgenes. *eLIFE* . DOI: 10.7554/eLife.53639.

Kalidas S, Santosh V, Shareef MM, Shankar SK, Christopher R, Shetty KT (2000). Expression of p67 (Munc-18) in adult human brain and neuroectodermal tumors of human central nervous system. *Acta Neuropathol* 99: 191-198.

Kim, J.Y et al. (2014). Intracerebroventricular Viral Injection of the Neonatal Mouse Brain for Persistent and Widespread Neuronal Transduction. *J. Vis. Exp.* (91), e51863, doi:10.3791/51863 (2014).

10

Klein et al. (2012) Noninvasive in vivo assessment of muscle impairment in the mdx mouse model – a comparison of two common wire hanging methods with two different results, *J Neurosci Methods* 203:292-7.

Kovacevic J, Maroteaux G, Schut D, Loos M, Dubey M, Pitsch J, et al. (2018). Protein instability, haploinsufficiency, and cortical hyper-excitability underlie STXBP1 encephalopathy. *Brain : a journal of neurology* 141(5): 1350-1374.

20

MacLean B, et al. (2010). Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26(7) 966-968.

Meijer M, Cijssouw T, Toonen RF, Verhage M (2015). Synaptic Effects of Munc18-1 Alternative Splicing in Excitatory Hippocampal Neurons. *PloS one* 10: e0138950.

Orock A, Logan S, Deak F (2018). Munc18-1 haploinsufficiency impairs learning and memory by reduced synaptic vesicular release in a model of Ohtahara syndrome. *Molecular and cellular neurosciences* 88: 33-42.

30

Patzke C, Han Y, Covy J, Yi F, Maxeiner S, Wernig M, et al. (2015). Analysis of conditional heterozygous STXBP1 mutations in human neurons. *The Journal of clinical investigation* 125: 3560-3571.

Ramos-Miguel A, Hercher C, Beasley CL, Barr AM, Bayer TA, Falkai P, et al. (2015). Loss of Munc18-1 long splice variant in GABAergic terminals is associated with cognitive decline and increased risk of dementia in a community sample. *Molecular neurodegeneration* 10: 65.

40

Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, et al. (2008). De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nature Genetics* 40(6): 782-788.

Stamberger H, Nikanorova M, Willemsen MH, Accorsi P, Angriman M, Baier H, et al. (2016). STXBP1 encephalopathy: A neurodevelopmental disorder including epilepsy. *Neurology* 86: 954-962.

10

Swanson DA, Steel JM, Valle D (1998). Identification and characterization of the human ortholog of rat STXBP1, a protein implicated in vesicle trafficking and neurotransmitter release. *Genomics* 48: 373-376.

Toonen RF, Wierda K, Sons MS, de Wit H, Cornelisse LN, Brussaard A, et al. (2006). Munc18-1 expression levels control synapse recovery by regulating readily releasable pool size. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18332-18337.

20

Tremblay, R.G. et al. (2010). Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *J Neurosci Methods* 186, 60-67, doi:10.1016/j.jneumeth.2009.11.004.

Uriguen L, Gil-Pisa I, Munarriz-Cuezva E, Berrocoso E, Pascau J, Soto-Montenegro ML, et al. (2013). Behavioral, neurochemical and morphological changes induced by the overexpression of munc18-1a in brain of mice: relevance to schizophrenia. *Translational psychiatry* 3: e221.

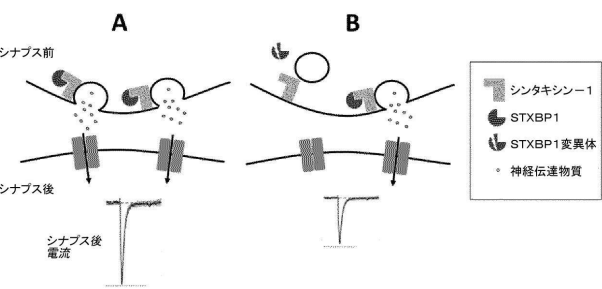
30

Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, et al. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287: 864-869.

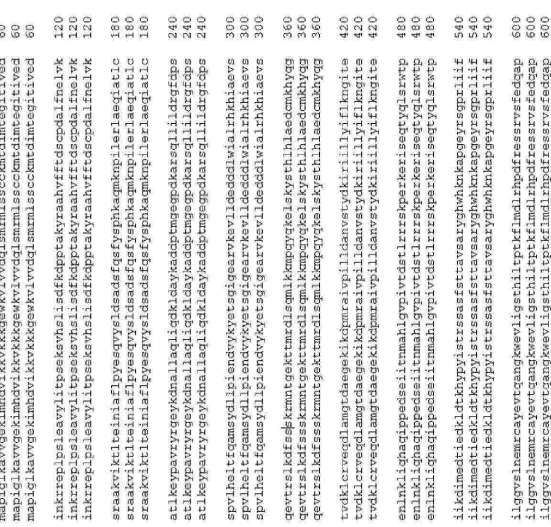
40

50

【図面】
【図 1】



【図 2】

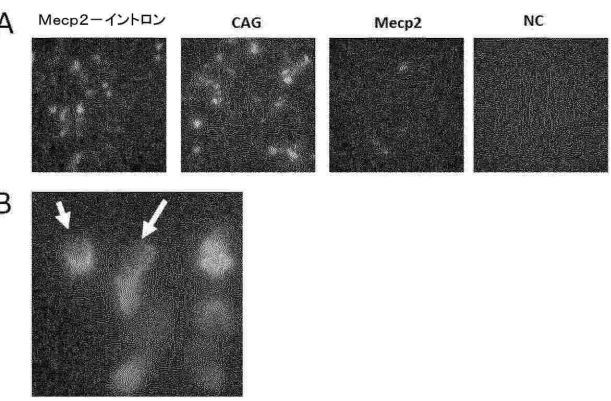


10

【図 3】



【図 4】

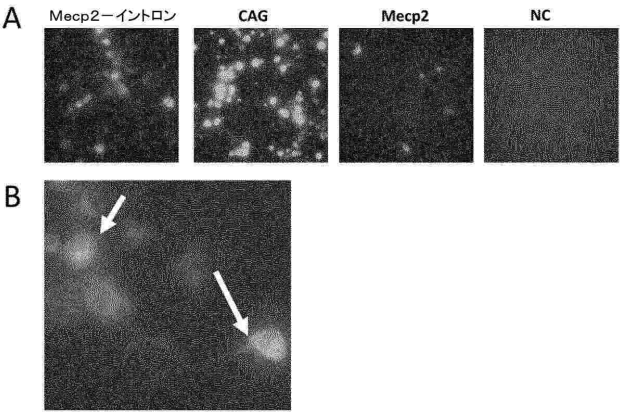


30

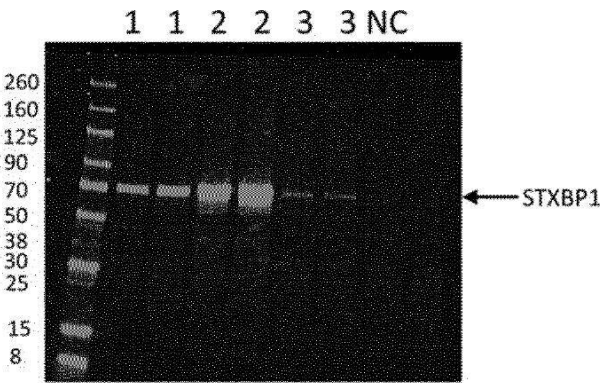
40

50

【図 5】

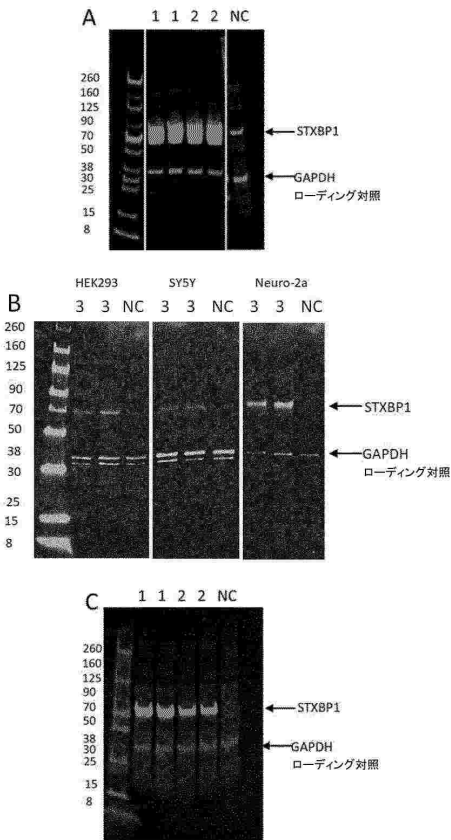


【図 6】



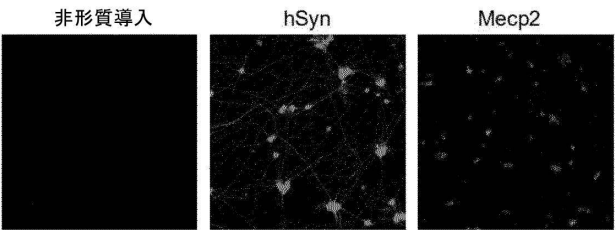
10

【図 7】



20

【図 8】

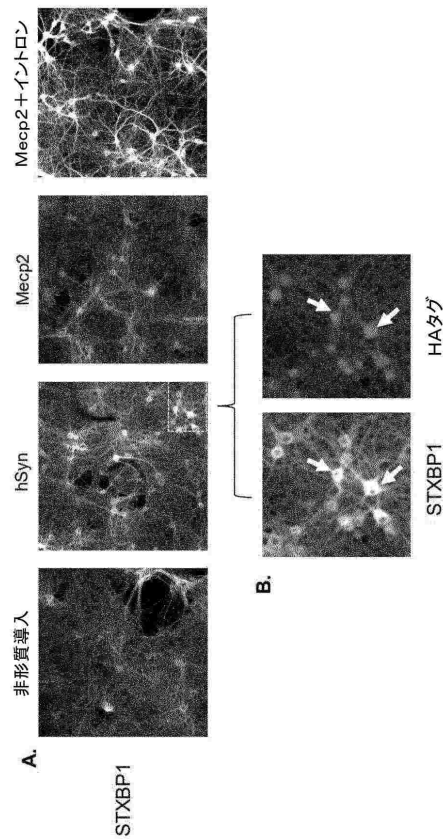


30

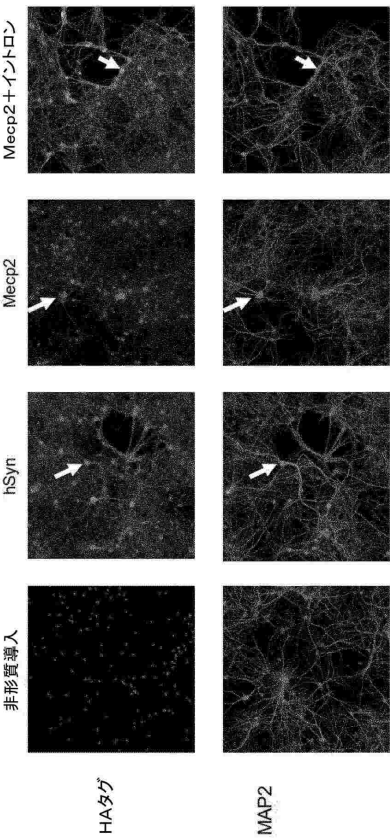
40

50

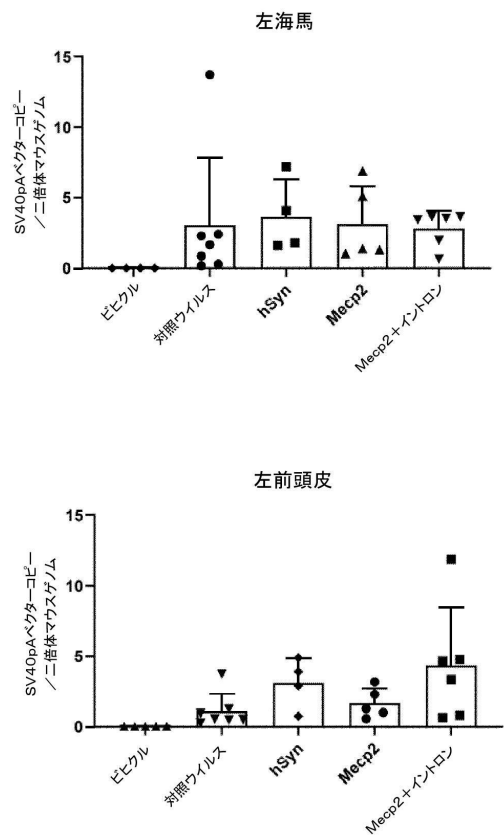
【 図 9 】



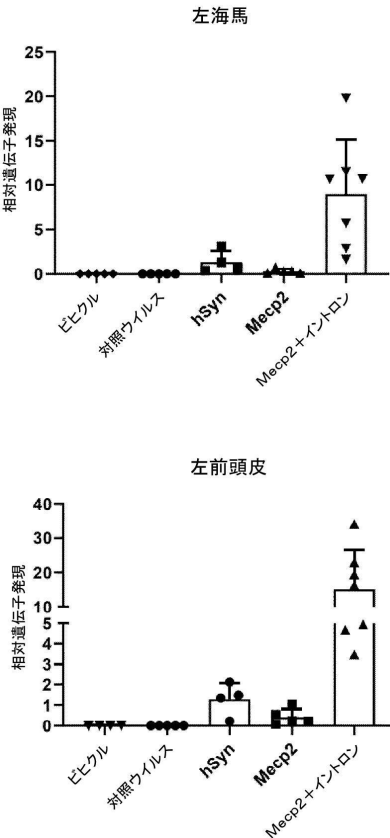
【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



10

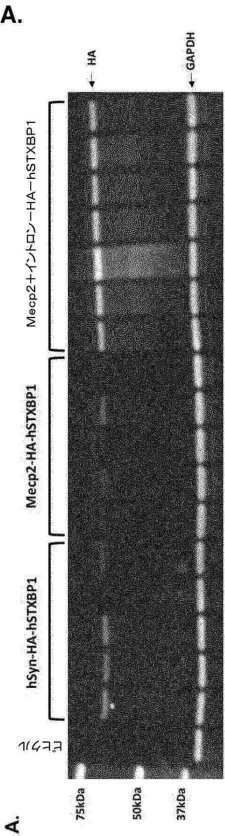
20

30

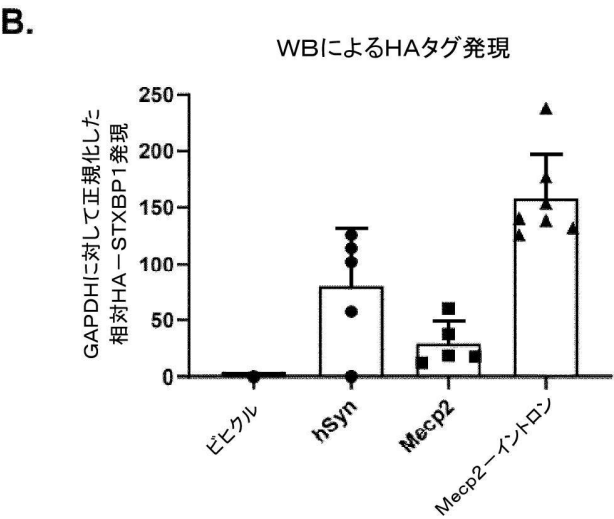
40

50

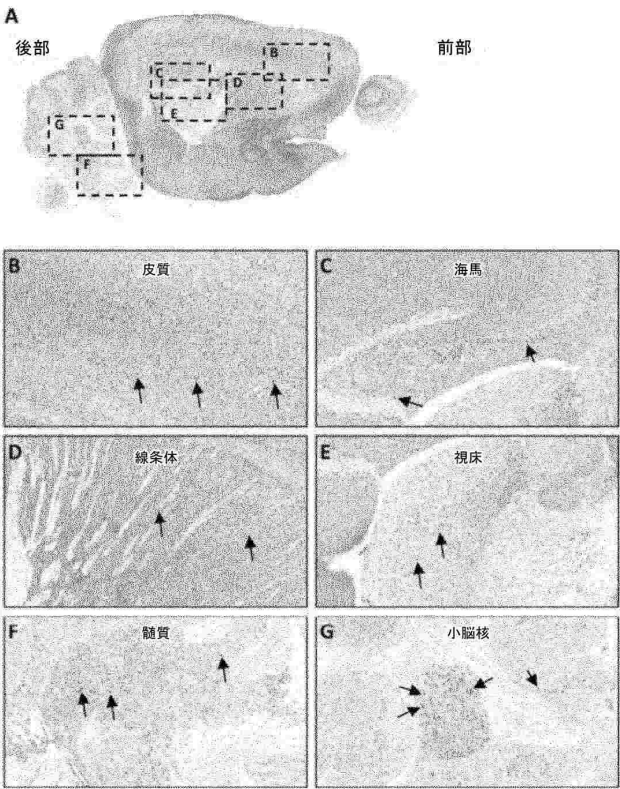
【図 13-1】



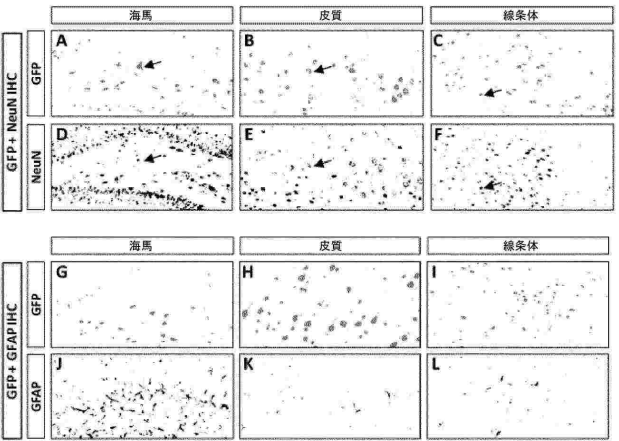
【図 13-2】



【図 14】



【図 15】



10

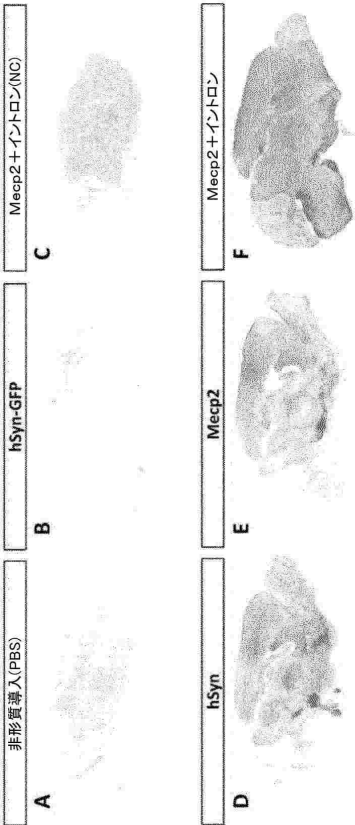
20

30

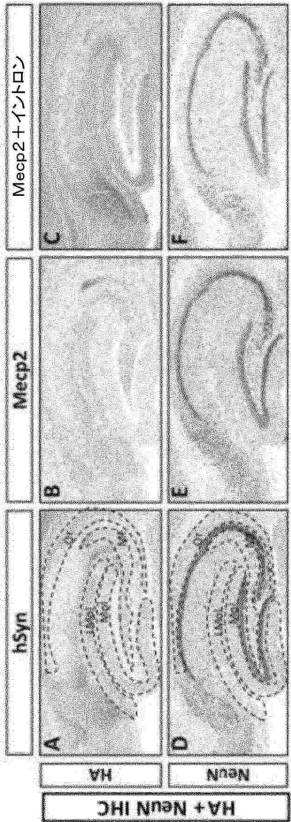
40

50

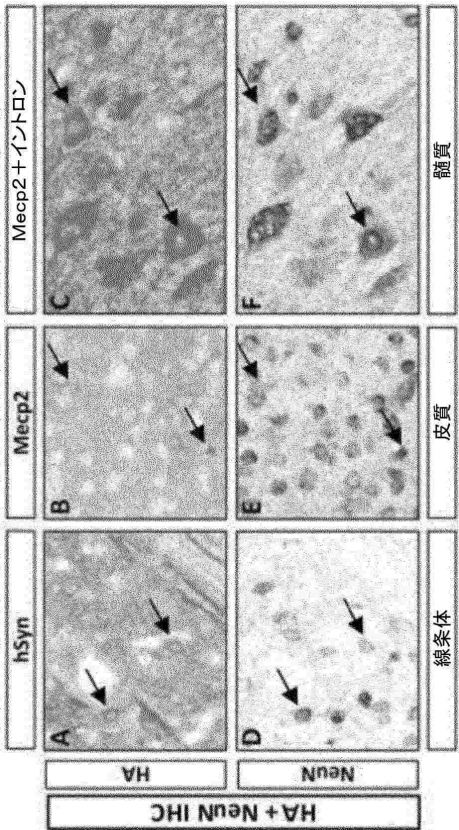
【図 1 6】



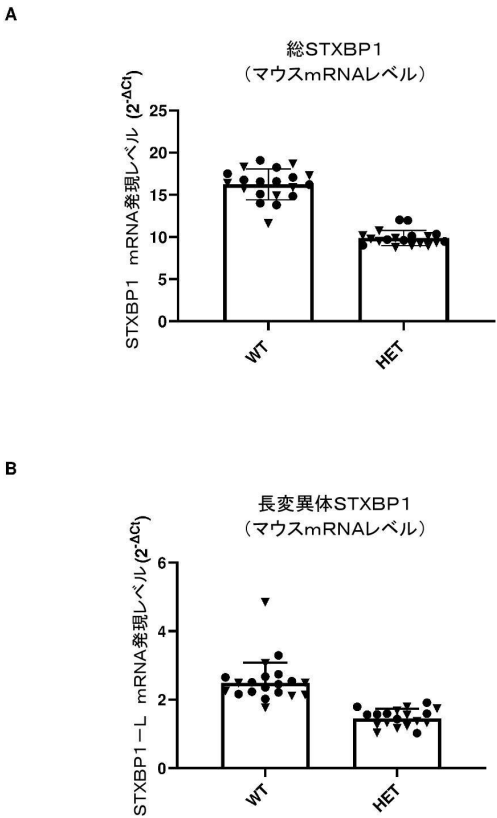
【図 1 7】



【図 1 8】



【図 1 9 - 1】



10

20

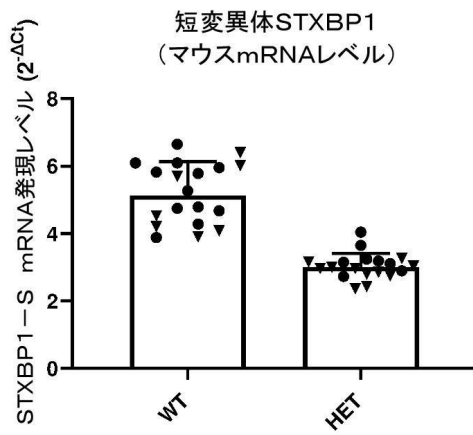
30

40

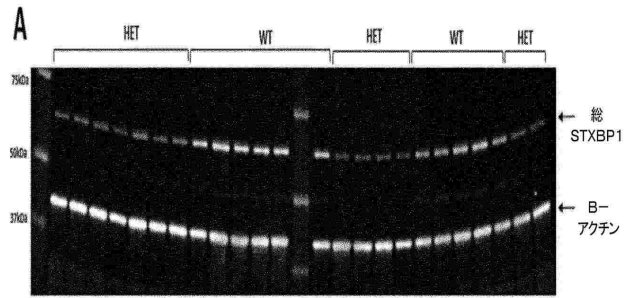
50

【図 19 - 2】

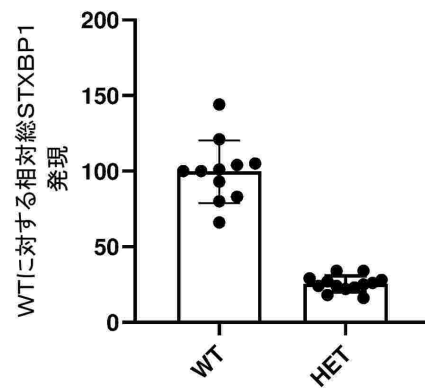
C



【図 20】



B

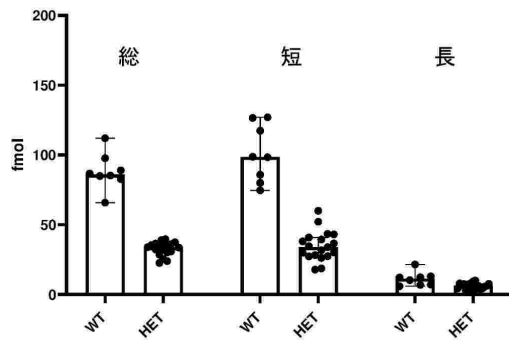


10

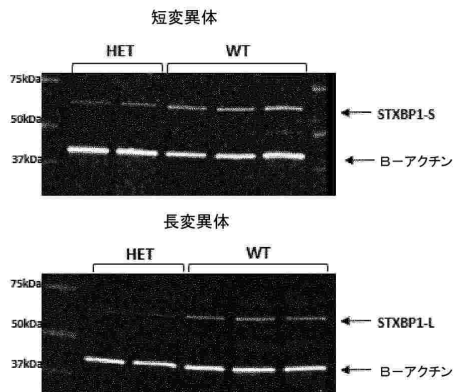
20

【図 21 - 1】

A

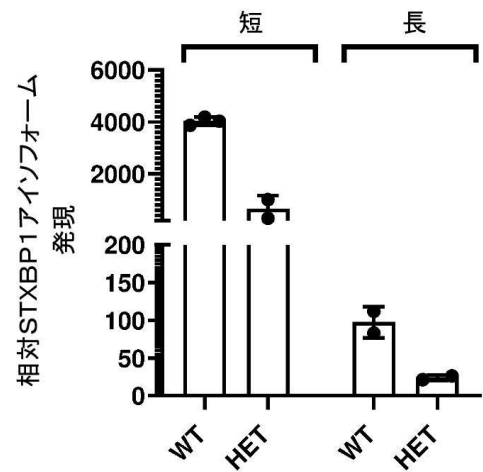


B



【図 21 - 2】

C

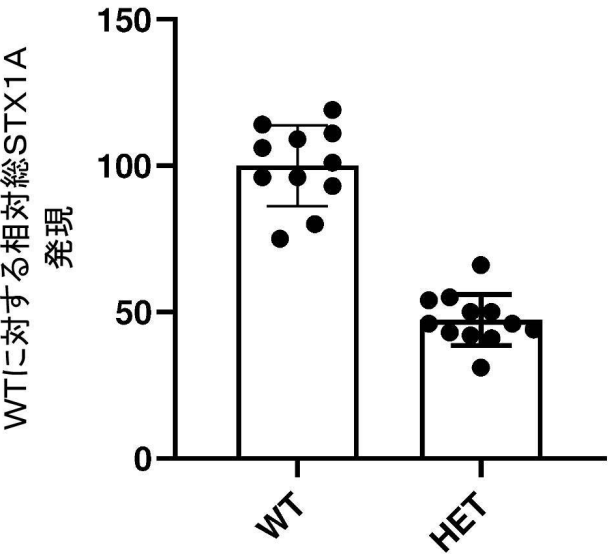


30

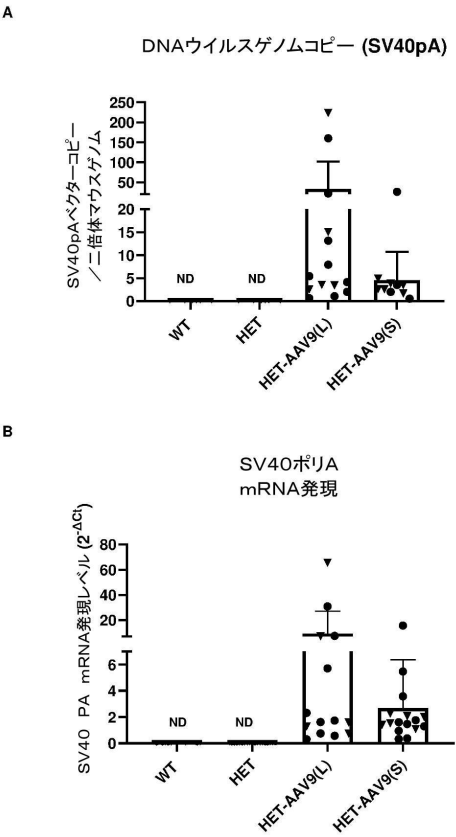
40

50

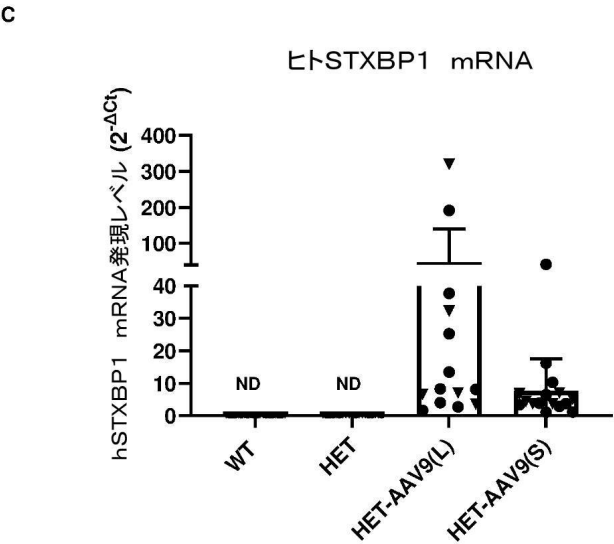
【 図 2 2 】



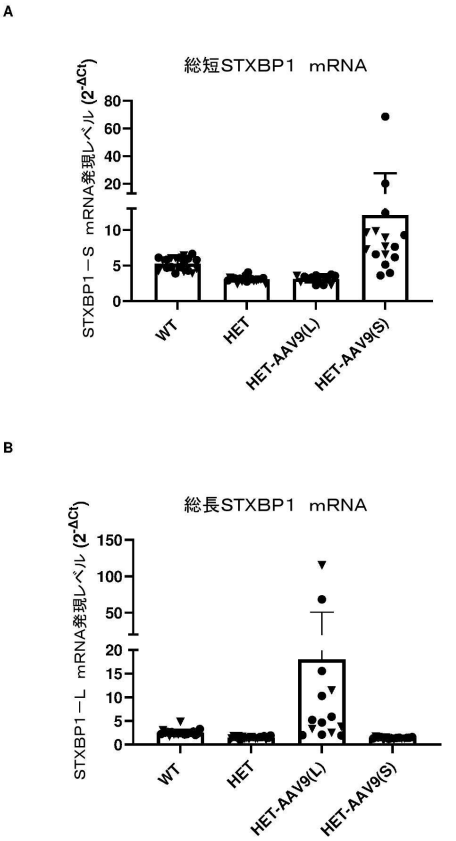
【 図 2 3 - 1 】



【 図 2 3 - 2 】



【 図 2 4 】



10

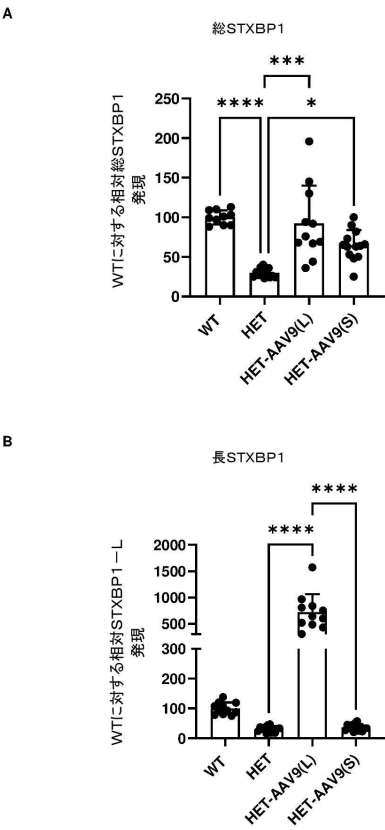
20

30

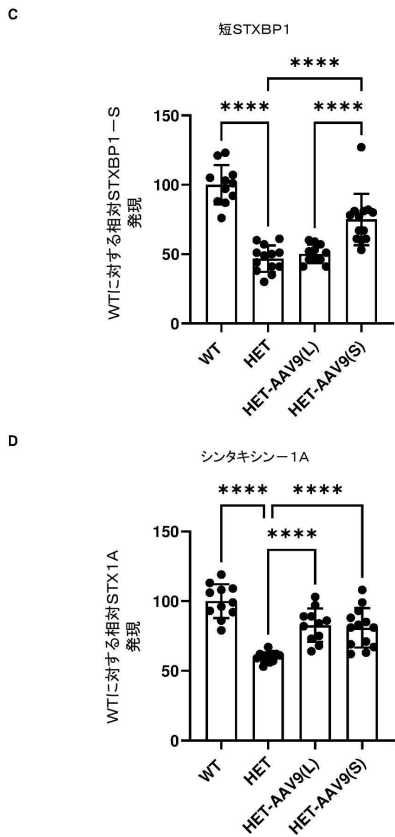
40

50

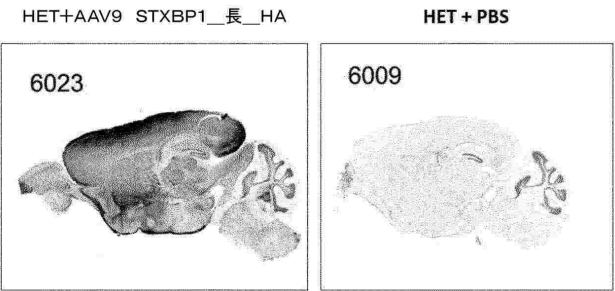
【図 2 5 - 1】



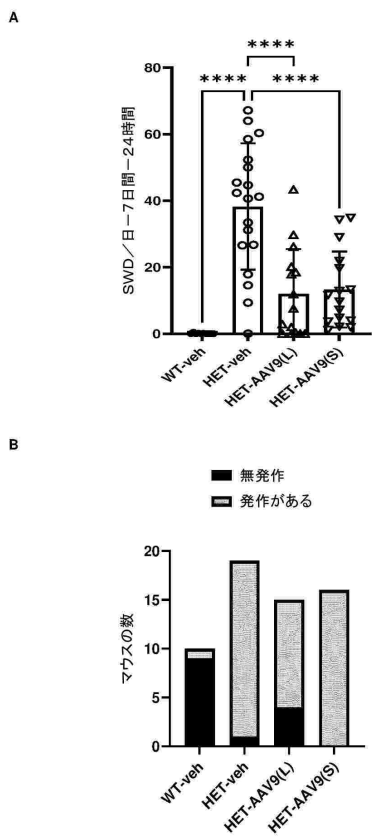
【図 2 5 - 2】



【図 2 6】



【図 2 7 - 1】



10

20

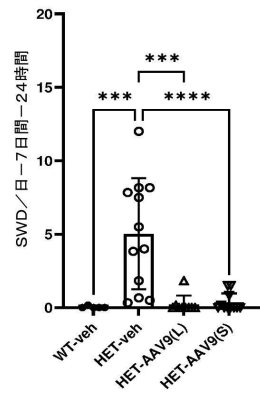
30

40

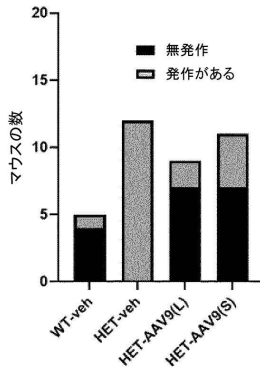
50

【図 27-2】

C

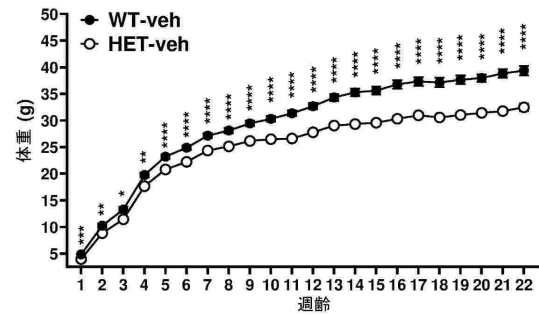


D

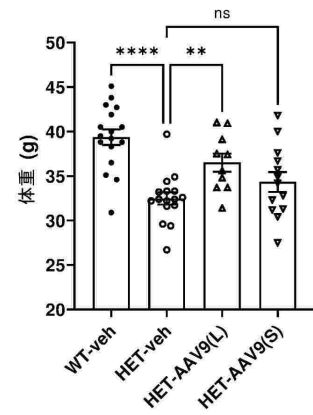


【図 28】

A

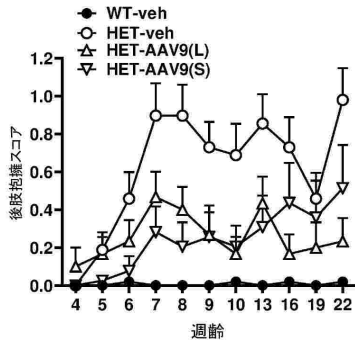


B

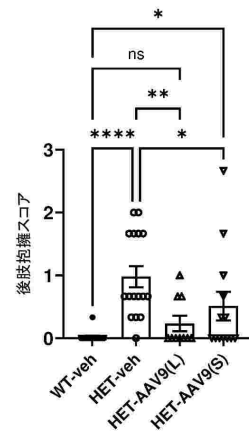


【図 29】

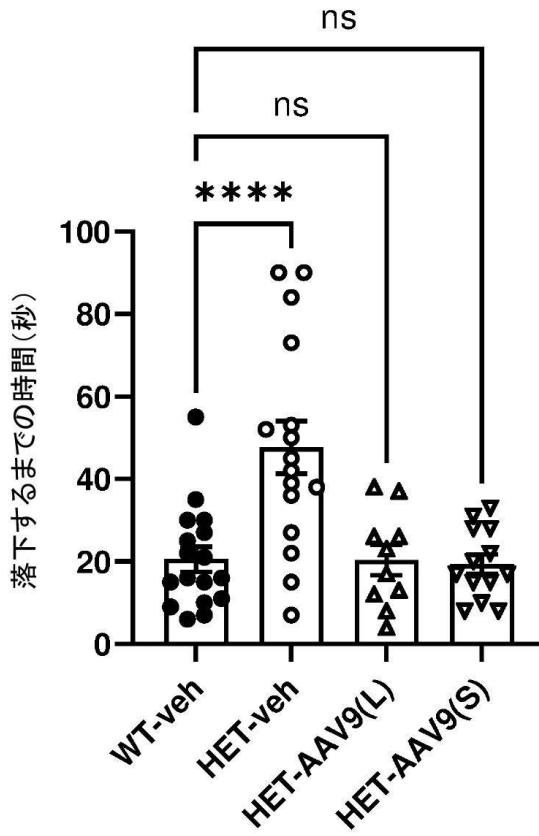
A



B



【図 30】



10

20

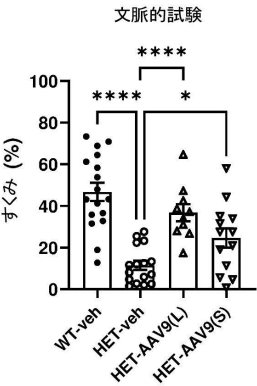
30

40

50

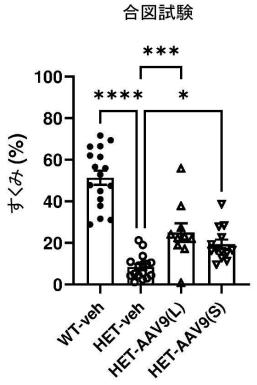
【図 3 1】

A



10

B



20

【配列表】

2024543001000001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/080020

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/86 A61P1/00 ADD.		
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) C12N A61P C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/187363 A1 (ENCODED THERAPEUTICS INC [US]) 11 October 2018 (2018-10-11)	1, 4-16
Y	claims; examples; sequence 40 -----	1-16
X	WO 2010/020642 A1 (BRAINCO BIOPHARMA S L [ES]; GUERRERO MARTINEZ MARIA JOSE [ES] ET AL.) 25 February 2010 (2010-02-25)	1-3, 5
Y	claims; examples; sequences -----	1-16
X	WO 2009/084472 A1 (PUBLIC UNIVERSITY CORP YOKOHAM [JP]; MATSUMOTO NAOMICHI [JP] ET AL.) 9 July 2009 (2009-07-09)	1-3, 5
Y	claims; examples; sequences -----	1-16
X,P	WO 2022/011390 A1 (BAYLOR COLLEGE MEDICINE [US]) 13 January 2022 (2022-01-13)	1-16
	claims; examples; sequences ----- -/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 February 2023		Date of mailing of the international search report 24/02/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sommer, Birgit

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/080020

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2022/214635 A1 (STICHTING VU [NL]) 13 October 2022 (2022-10-13) claims; examples; sequences -----	1-16
Y	WO 2021/089856 A1 (HORAMA [FR]) 14 May 2021 (2021-05-14) page 32, line 1 - line 16; claims; examples -----	1-16

1

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/080020**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:

see additional sheet

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 an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2022/080020

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-16

a nucleic acid construct comprising a transgene encoding a syntaxin binding protein 1 (STXBP1) as well as subject-matter related thereto;

1.1. claims: 1-16(partially)

a nucleic acid construct comprising a transgene encoding a STXBP1 having SEQ ID NO: 9 as well as subject-matter related thereto;

1.2. claims: 1-16(partially)

a nucleic acid construct comprising a transgene encoding a STXBP1 having SEQ ID NO: 10 as well as subject-matter related thereto;

1.3. claims: 1-16(partially)

a nucleic acid construct comprising a transgene encoding a STXBP1 having SEQ ID NO: 11 as well as subject-matter related thereto;

1.4. claims: 1-16(partially)

a nucleic acid construct comprising a transgene encoding a STXBP1 having SEQ ID NO: 12 as well as subject-matter related thereto;

1.5. claims: 1-16(partially)

a nucleic acid construct comprising a transgene encoding a STXBP1 having SEQ ID NO: 13 as well as subject-matter related thereto;

1.6. claims: 1-16(partially)

a nucleic acid construct comprising a transgene encoding a STXBP1 having SEQ ID NO: 14 as well as subject-matter related thereto;

1.7. claims: 1-16(partially)

a nucleic acid construct comprising a transgene encoding a STXBP1 having SEQ ID NO: 15 as well as subject-matter related thereto;

1.8. claims: 1-16(partially)

a nucleic acid construct comprising a transgene encoding a STXBP1 having SEQ ID NO: 16 as well as subject-matter

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/EP2022/080020

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

related thereto;

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2022/080020

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:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/080020

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018187363 A1	11-10-2018	AU 2018250161 A1	17-10-2019
		BR 112019020777 A2	28-04-2020
		CA 3058189 A1	11-10-2018
		CL 2019002805 A1	06-03-2020
		CN 110730823 A	24-01-2020
		CO 2019011450 A2	31-10-2019
		EA 201992358 A1	24-03-2020
		EP 3607073 A1	12-02-2020
		IL 269767 A	28-11-2019
		JP 2020515292 A	28-05-2020
		KR 20190137126 A	10-12-2019
		SG 11201909203W A	28-11-2019
		TW 201842185 A	01-12-2018
		US 2019024118 A1	24-01-2019
		US 2019024119 A1	24-01-2019
		US 2019024120 A1	24-01-2019
		US 2019024121 A1	24-01-2019
		US 2020165628 A1	28-05-2020
		WO 2018187363 A1	11-10-2018
WO 2010020642 A1	25-02-2010	EP 2321417 A1	18-05-2011
		ES 2546732 T3	28-09-2015
		US 2011268747 A1	03-11-2011
		WO 2010020642 A1	25-02-2010
WO 2009084472 A1	09-07-2009	JP 5608863 B2	15-10-2014
		JP WO2009084472 A1	19-05-2011
		WO 2009084472 A1	09-07-2009
WO 2022011390 A1	13-01-2022	NONE	
WO 2022214635 A1	13-10-2022	NONE	
WO 2021089856 A1	14-05-2021	AU 2020378643 A1	02-06-2022
		CA 3160619 A1	14-05-2021
		CN 114929869 A	19-08-2022
		EP 4055151 A1	14-09-2022
		IL 292814 A	01-07-2022
		KR 20220094216 A	05-07-2022
		US 2021162072 A1	03-06-2021
		US 2022323610 A1	13-10-2022
		WO 2021089856 A1	14-05-2021

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/08 (2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	

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,N
E,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,I
T,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

- (72)発明者 ヴァレット、ブリタニー ニコール
英国 エスエル1 3ダブリューイー バークシャー、スラウ、バス ロード 2 0 8、ユーシービー
、アイピーディー 気付
- (72)発明者 ウルフ、クリスチャン ギルバート ジョセフ
英国 エスエル1 3ダブリューイー バークシャー、スラウ、バス ロード 2 0 8、ユーシービー
、アイピーディー 気付
- (72)発明者 シュー、メイユウ
英国 エスエル1 3ダブリューイー バークシャー、スラウ、バス ロード 2 0 8、ユーシービー
、アイピーディー 気付

F ターム (参考) 4B065 AA93X AA93Y AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 BB25 BB37 BC03
BC07 BC09 BC26 BD15 CA24 CA44
4C084 AA02 AA13 BA02 NA14 ZA06
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA06