(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-505732
(P2025-505732A)
(43)公表日　令和7年2月28日(2025.2.28)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１００	４Ｂ０６３
Ｃ１２Ｎ	*15/11 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/11	Ｚ ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/55 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/55		４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	４Ｃ０８６
Ｃ１２Ｎ	*15/115 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/115	Ｚ	４Ｈ０４５

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全292頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-547600(P2024-547600)
(86)(22)出願日　令和5年2月10日(2023.2.10)
(85)翻訳文提出日　令和6年10月8日(2024.10.8)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/062406
(87)国際公開番号　WO2023/154877
(87)国際公開日　令和5年8月17日(2023.8.17)
(31)優先権主張番号　63/308,830
(32)優先日　令和4年2月10日(2022.2.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/308,834
(32)優先日　令和4年2月10日(2022.2.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/308,837
最終頁に続く

(71)出願人　515158308
ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ レランド スタンフォード ジュニア ユニバーシティー
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４３０５－２０３８，スタンフォード，メイン クワッド ピー．オー．ボックス ２０３８６，オフィス オブ ザ ゼネラル カウンセル ビルディング １７０，サード フロア
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　キロ塩基スケールでのＲＮＡガイドゲノムリコンビニアリング

(57)【要約】
本開示は、ＣＲＩＳＰＲおよび組換え酵素を使用したリコンビニアリング編集系ならびにその方法、ベクター、核酸組成物およびキットを提供する。本方法および系は、宿主細胞中のゲノムＤＮＡを含む標的ＤＮＡを改変するための手段を提供する。高精度でありオフターゲットエラーが少ない、大規模な核酸編集を可能にする方式で核酸編集を促進する系および方法が本明細書中で提供される。これらの系および方法は、組換えタンパク質成分および必要に応じてＣＲＩＳＰＲ成分を用いる。

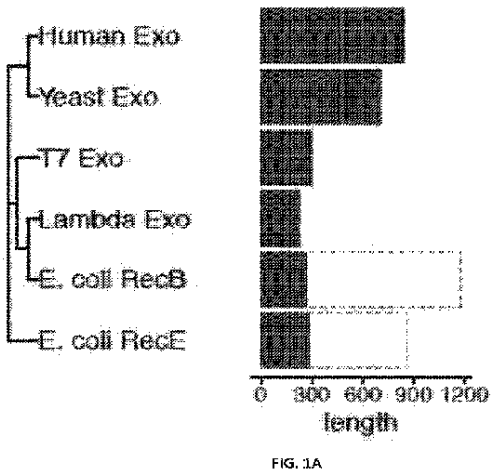


FIG. 1A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
系または組成物であって、
（ｉ）標的ＤＮＡ配列に相補的なガイドＲＮＡ配列を含む核酸分子と、
（ｉｉ）組換えタンパク質であって、
前記組換えタンパク質が、エキソヌクレアーゼ、一本鎖ＤＮＡアニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）、もしくは一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ）、またはそれらの２つもしくはそれより多くの組み合わせを含む、組換えタンパク質、
または、
（ｉｉｉ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉ）および／または（ｉｉ）をコードまたは送達する核酸分子（複数可）、
または、
（ｉｖ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉｉｉ）の前記核酸分子（複数可）を含有するベクターと
を含む、系または組成物。
【請求項２】
前記系が、ＣＲＩＳＰＲタンパク質を含まないか、またはＣａｓタンパク質を含まないか、またはＣａｓ９タンパク質を含まないか、またはＣａｓ１２ａタンパク質を含まない、請求項１に記載の系または組成物。
【請求項３】
少なくとも１つのアプタマーと、
融合タンパク質の一部として前記組換えタンパク質に機能的に連結されたアプタマー結合タンパク質と
を含む、動員系を更に含む、請求項１または２に記載の系または組成物。
【請求項４】
前記少なくとも１つのアプタマーが、ＲＮＡアプタマーまたはペプチドアプタマーを含む、請求項３に記載の系または組成物または組成物。
【請求項５】
前記核酸分子または複数の前記核酸分子が、２つのＲＮＡアプタマー配列を含む、請求項４に記載の系または組成物。
【請求項６】
前記２つのＲＮＡアプタマー配列が、同じ配列を含む、請求項５に記載の系または組成物。
【請求項７】
前記アプタマー結合タンパク質が、ＭＳ２コートタンパク質、またはその機能性誘導体もしくはバリアントを含む、請求項３～６のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項８】
前記アプタマー結合タンパク質が、ファージＮペプチド、またはその機能性誘導体もしくはバリアントを含む、請求項３～６のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項９】
前記少なくとも１つのアプタマーが、前記ガイドＲＮＡに連結されている、請求項３または４に記載の系または組成物。
【請求項１０】
前記ガイドＲＮＡ配列が、１～２４個のアプタマー配列を含む、請求項９に記載の系または組成物。
【請求項１１】
２またはそれを超えるアプタマー配列が、同じ配列を含む、請求項９または１０に記載の系または組成物。
【請求項１２】
前記アプタマー配列が、ＧＣＮ４ペプチド配列を含む、請求項３、４または９～１１の

いずれかに記載の系または組成物。
【請求項１３】
前記組換えタンパク質のＮ末端が、前記アプタマー結合タンパク質のＣ末端に連結されている、請求項３～１２のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項１４】
前記組換えタンパク質と前記アプタマー結合タンパク質との間にリンカーを更に含む、請求項３～１３のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項１５】
前記リンカーが、配列番号１５のアミノ酸配列を含む、請求項１４に記載の系または組成物。
【請求項１６】
少なくとも１つの核局在化配列（ＮＬＳ）を含み、必要に応じて、前記ＮＬＳ（複数可）が前記組換えタンパク質に連結されている、請求項１～１５のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項１７】
前記核局在化配列が、配列番号１６のアミノ酸配列を含む、請求項１６に記載の系または組成物。
【請求項１８】
前記核局在化配列が、前記組換えタンパク質のＣ末端または組換えＮ末端にある、請求項１６または１７に記載の系または組成物。
【請求項１９】
前記組換えタンパク質が、微生物組換えタンパク質またはその活性部分を含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載の系または組成物。
【請求項２０】
前記組換えタンパク質が、ミトコンドリア組換えタンパク質またはその活性部分を含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載の系または組成物。
【請求項２１】
前記組換えタンパク質が、ウイルス組換えタンパク質またはその活性部分を含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載の系または組成物。
【請求項２２】
前記組換えタンパク質が、真核生物組換えタンパク質またはその活性部分を含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載の系または組成物。
【請求項２３】
前記組換えタンパク質が、表１２の組換えタンパク質、またはその誘導体もしくはバリアントもしくは機能的部分を含む、請求項１～１８のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項２４】
前記組換えタンパク質、またはその誘導体もしくはバリアントが、表１２のアミノ酸配列と少なくとも７０％の類似性または同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項２３に記載の系または組成物。
【請求項２５】
前記融合タンパク質が、ＲｅｃＥ、ＲｅｃＴ、またはそれらの誘導体もしくはバリアントを含む、請求項１９に記載の系または組成物。
【請求項２６】
前記ＲｅｃＥ、ＲｅｃＴ、またはその誘導体もしくはバリアントが、配列番号１～１４からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％の同一性または類似性または同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１９に記載の系または組成物。
【請求項２７】
ドナー核酸を更に含む、請求項１～２６のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項２８】
前記標的ＤＮＡ配列が、宿主細胞中のゲノムＤＮＡ配列である、請求項１～２６のいず

れかに記載の系または組成物。
【請求項２９】
前記アプタマー結合タンパク質と前記組換えタンパク質が、互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する、請求項３～２８のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項３０】
請求項１～２９のいずれか一項に記載の系または組成物を含む、細胞または真核細胞。
【請求項３１】
標的ゲノムＤＮＡ配列を含む細胞中の標的ゲノムＤＮＡ配列を改変させる方法であって、請求項１～２９のいずれか一項に記載の系または組成物を前記細胞に導入するステップを含む、方法。
【請求項３２】
前記細胞または前記真核細胞が、哺乳動物細胞である、請求項３０に記載の細胞もしくは真核細胞、または請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記細胞が、ヒト細胞である、請求項３２に記載の細胞もしくは真核細胞、または方法。
【請求項３４】
前記細胞もしくは前記真核細胞または前記哺乳動物細胞が、幹細胞である、請求項３０～３３のいずれかに記載の細胞もしくは真核細胞、または方法。
【請求項３５】
前記標的ゲノムＤＮＡ配列が、遺伝子産物をコードする、請求項３１～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
細胞に前記導入するステップが、対象に投与するステップを含む、請求項３１～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
前記対象が、哺乳動物の非ヒト動物またはヒトである、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記投与するステップが、インビボ投与を含む、請求項３６または３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記細胞または前記真核細胞または哺乳動物細胞が、エクスビボの細胞またはインビトロの細胞である、請求項３１～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０】
前記導入するステップの後に、前記エクスビボの細胞または前記インビトロの細胞を対象に投与するステップを更に含む、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記対象が、哺乳動物の非ヒト動物またはヒトである、請求項３６に記載の方法。
【請求項４２】
細胞における標的ＤＮＡ配列の改変のための、請求項１～２９のいずれか一項に記載の系または組成物の使用。
【請求項４３】
系または組成物であって、
（ｉ）核酸ポリメラーゼ（複数可）と、
（ｉｉ）標的ＤＮＡ配列に相補的なガイドＲＮＡ配列および逆転写用のＲＮＡを含む核酸分子、または標的ＤＮＡ配列に相補的なガイドＲＮＡ配列および逆転写用のＲＮＡを含む複数の核酸分子と、
（ｉｉｉ）組換えタンパク質であって、
前記組換えタンパク質が、エキソヌクレアーゼ、一本鎖ＤＮＡアニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）、もしくは一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ）、またはそれらの２つもしくはそれより多くの組み合わせを含む、組換えタンパク質、

または、
（ｉｖ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉ）および／もしくは（ｉｉ）および／もしくは（ｉｉｉ）をコードもしくは送達する核酸分子（複数可）、
または、
（ｖ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉｖ）の前記核酸分子（複数可）を含有するベクター
とを含む、系または組成物。
【請求項４４】
（ｉ）、（ｉｉ）および（ｉｉｉ）が、Ｃａｓタンパク質を更に含むか、または（ｉｖ）が、細胞におけるインビボ発現のための（ｉ）および／もしくは（ｉｉ）および／もしくは（ｉｉｉ）および／もしくはＣａｓタンパク質をコードまたは送達する核酸分子（複数可）を含むか、または（ｖ）のベクター（複数可）が、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸分子（複数可）を追加的に含有する、請求項４３に記載の系または組成物。
【請求項４５】
少なくとも１つのアプタマーと、
融合タンパク質の一部として前記組換えタンパク質に機能的に連結されたアプタマー結合タンパク質と
を含む、動員系を更に含む、請求項４３または４４に記載の系または組成物。
【請求項４６】
前記少なくとも１つのアプタマーが、ＲＮＡアプタマーまたはペプチドアプタマーである、請求項４５に記載の系または組成物または組成物。
【請求項４７】
前記核酸分子または複数の前記核酸分子が、２つのＲＮＡアプタマーを含む、請求項４６に記載の系または組成物。
【請求項４８】
前記２つのＲＮＡアプタマー配列が、同じ配列を含む、請求項４７に記載の系または組成物。
【請求項４９】
前記アプタマー結合タンパク質が、ＭＳ２コートタンパク質、またはその機能性誘導体もしくはバリアントを含む、請求項４５～４７のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項５０】
前記アプタマー結合タンパク質が、ファージＮペプチド、またはその機能性誘導体もしくはバリアントを含む、請求項４５～４７のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項５１】
少なくとも１つの前記アプタマー配列が、前記Ｃａｓタンパク質に連結されている、請求項４５に記載の系または組成物。
【請求項５２】
少なくとも１つの前記アプタマー配列が、前記ガイドＲＮＡに連結されている、請求項４５に記載の系または組成物。
【請求項５３】
前記動員系が、１～２４個のアプタマーを含む、請求項４５に記載の系または組成物。
【請求項５４】
２またはそれを超えるアプタマーが、同じ配列を含む、請求項５１～５３のいずれか一項に記載の系または組成物。
【請求項５５】
前記アプタマーが、ＧＣＮ４ペプチド配列を含む、請求項４５、４６または５１～５４のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項５６】
前記組換えタンパク質のＮ末端が、前記アプタマー結合タンパク質のＣ末端に連結されている、請求項４５～５５のいずれかに記載の系または組成物。

【請求項５７】
前記組換えタンパク質と前記アプタマー結合タンパク質との間にリンカーを更に含む、請求項４５～５６のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項５８】
前記リンカーが、配列番号１５のアミノ酸配列を含む、請求項５７に記載の系または組成物。
【請求項５９】
少なくとも１つの核局在化配列（ＮＬＳ）を含み、必要に応じて、前記ＮＬＳ（複数可）が、前記組換えタンパク質もしくは前記Ｃａｓタンパク質もしくは前記逆転写酵素、または前記組換えタンパク質、前記逆転写酵素もしくは前記Ｃａｓタンパク質のうちの少なくとも２つもしくは３つのそれぞれにある少なくとも１つのＮＬＳに連結されている、請求項４３～５８のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項６０】
前記核局在化配列が、配列番号１６のアミノ酸配列を含む、請求項５９に記載の系または組成物。
【請求項６１】
前記組換えタンパク質のＣ末端、前記組換えタンパク質のＮ末端または前記Ｃａｓタンパク質のうちの１つまたはそれより多くにＮＬＳを含む、請求項５９または６０に記載の系または組成物。
【請求項６２】
前記組換えタンパク質が、微生物組換えタンパク質またはその活性部分を含む、請求項４３～６１のいずれか一項に記載の系または組成物。
【請求項６３】
前記組換えタンパク質が、ミトコンドリア組換えタンパク質またはその活性部分を含む、請求項４３～６１のいずれか一項に記載の系または組成物。
【請求項６４】
前記組換えタンパク質が、ウイルス組換えタンパク質またはその活性部分を含む、請求項４３～６１のいずれか一項に記載の系または組成物。
【請求項６５】
前記組換えタンパク質が、真核生物組換えタンパク質またはその活性部分を含む、請求項４３～６１のいずれか一項に記載の系または組成物。
【請求項６６】
前記組換えタンパク質が、表１２の組換えタンパク質、またはその誘導体もしくはバリアントもしくは機能的部分を含む、請求項４３～６１のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項６７】
前記組換えタンパク質、またはその誘導体もしくはバリアントが、表１２のアミノ酸配列と少なくとも７０％の類似性または同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項６６に記載の系または組成物。
【請求項６８】
前記融合タンパク質が、ＲｅｃＥ、ＲｅｃＴ、またはそれらの誘導体もしくはバリアントを含む、請求項６２に記載の系または組成物。
【請求項６９】
前記ＲｅｃＥ、ＲｅｃＴ、またはその誘導体もしくはバリアントが、配列番号１～１４からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％の同一性または類似性または同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項６２に記載の系または組成物。
【請求項７０】
前記Ｃａｓタンパク質が、触媒的に非活性である（前記Ｃａｓタンパク質の野生型または非変異型と比較して５％未満のヌクレアーゼ活性）か、または触媒的に不活性である、請求項４４～６９のいずれかに記載の系または組成物。

【請求項７１】
前記Ｃａｓタンパク質が、Ｃａｓ９またはＣａｓ１２ａを含む、請求項４４～７０のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項７２】
前記Ｃａｓ９タンパク質が、野生型Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９または野生型Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９を含む、請求項７０～７１のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項７３】
前記Ｃａｓタンパク質が、ニッカーゼを含む、請求項４４～６９、７１または７２のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項７４】
前記ニッカーゼが、１０位にＤ１０Ａというアミノ酸置換を伴う野生型Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９を含む、請求項７３に記載の系または組成物。
【請求項７５】
ドナー核酸を更に含む、請求項４３～７４のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項７６】
前記標的ＤＮＡ配列が、宿主細胞中のゲノムＤＮＡ配列である、請求項４３～７５のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項７７】
前記核酸ポリメラーゼが、逆転写酵素活性を含む、請求項４３～７６のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項７８】
前記核酸ポリメラーゼが、レトロンＲＴを含む、請求項４３～７６のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項７９】
前記核酸ポリメラーゼと前記組換えタンパク質が、互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する、請求項４３～７８のいずれか一項に記載の系または組成物。
【請求項８０】
前記核酸ポリメラーゼと前記Ｃａｓタンパク質が、互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する、請求項４４～７８のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項８１】
前記アプタマー結合タンパク質と前記組換えタンパク質が、互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する、請求項４５～７８のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項８２】
前記組換えタンパク質と前記Ｃａｓタンパク質が、互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する、請求項４４～７８のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項８３】
前記ＲＴと、前記Ｃａｓタンパク質と、前記組換えタンパク質が、互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する、請求項４４～７８のいずれかに記載の系または組成物。
【請求項８４】
請求項４３～８３のいずれか一項に記載の系または組成物を含む、細胞または真核細胞。
【請求項８５】
標的ゲノムＤＮＡ配列を含む細胞中の標的ゲノムＤＮＡ配列を改変させる方法であって、請求項４３～８３のいずれか一項に記載の系または組成物を前記細胞に導入するステップを含む、方法。
【請求項８６】
前記細胞または前記真核細胞が、哺乳動物細胞である、請求項８４に記載の細胞もしく

は真核細胞、または請求項８５に記載の方法。
【請求項８７】
前記細胞が、ヒト細胞である、請求項８６に記載の細胞もしくは真核細胞、または方法。
【請求項８８】
前記細胞もしくは前記真核細胞または前記哺乳動物細胞が、幹細胞である、請求項８４～８７のいずれかに記載の細胞もしくは真核細胞、または方法。
【請求項８９】
前記標的ゲノムＤＮＡ配列が、遺伝子産物をコードする、請求項８５～８８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９０】
細胞に前記導入するステップが、対象に投与するステップを含む、請求項８５～８８のいずれか一項記載の方法。
【請求項９１】
前記対象が、哺乳動物の非ヒト動物またはヒトである、請求項９０に記載の方法。
【請求項９２】
前記投与するステップが、インビボ投与を含む、請求項９０または９１に記載の方法。
【請求項９３】
前記細胞もしくは前記真核細胞または前記哺乳動物細胞が、エクスビボの細胞またはインビトロの細胞である、請求項８５～８８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９４】
前記導入するステップの後に、前記エクスビボの細胞または前記インビトロの細胞を対象に投与するステップを更に含む、請求項９３に記載の方法。
【請求項９５】
前記対象が、哺乳動物の非ヒト動物またはヒトである、請求項９０に記載の方法。
【請求項９６】
細胞における標的ＤＮＡ配列の改変のための、請求項４３～８３のいずれか一項に記載の系または組成物の使用。
【請求項９７】
組換えの方法であって、細胞内に、
（ｉ）標的ＤＮＡ配列に相補的なガイドＲＮＡ配列を含む核酸分子であって、前記標的ＤＮＡ配列が前記細胞におけるゲノムＤＮＡ配列を含む、核酸分子と、
（ｉｉ）組換えタンパク質であって、
前記組換えタンパク質が、エキソヌクレアーゼ、一本鎖ＤＮＡアニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）、もしくは一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ）、またはそれらの２つもしくはそれより多くの組み合わせを含む、組換えタンパク質、
または、
（ｉｉｉ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉ）および／または（ｉｉ）をコードまたは送達する核酸分子（複数可）、
または、
（ｉｖ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉｉｉ）の前記核酸分子（複数可）を含有するベクターと
を含む、系または組成物を提供するステップを含む、
方法。
【請求項９８】
（ｉ）および（ｉｉ）が、Ｃａｓタンパク質もしくは逆転写酵素（ＲＴ）もしくはＣａｓタンパク質およびＲＴを更に含むか、または（ｉｉｉ）が、（ｉ）、および／もしくは（ｉｉ）および／もしくはＣａｓタンパク質および／もしくは前記細胞におけるインビボ発現のための核酸ポリメラーゼをコードまたは送達する核酸分子（複数可）を含むか、または（ｉｖ）のベクター（複数可）が、Ｃａｓタンパク質およびまたはＲＴをコードする

核酸分子（複数可）を追加的に含有する、請求項９７に記載の方法。
【請求項９９】
前記標的ＤＮＡ配列が、アルブミン（ＡＬＢ）、ＡＡＶＳ１、ＨＳＰ９０ＡＡ１、ＤＹＮＬＴ１、ＡＣＴＢ、ＢＣＡＰ３１、ＨＩＳＴ１Ｈ２ＢＫ、ＣＬＴＡ、またはＲＡＢ１１Ａのゲノム配列を含む、請求項９７または９８に記載の方法。
【請求項１００】
少なくとも１つのアプタマーと、
融合タンパク質の一部として前記組換えタンパク質に機能的に連結されたアプタマー結合タンパク質と
を含む、動員系を更に含む、請求項９７～９９のいずれかに記載の方法。
【請求項１０１】
前記少なくとも１つのアプタマーが、ＲＮＡアプタマーまたはペプチドアプタマーである、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０２】
前記核酸分子または複数の前記核酸分子が、２つのＲＮＡアプタマーを含む、請求項１０１に記載の方法。
【請求項１０３】
前記２つのＲＮＡアプタマー配列が、同じ配列を含む、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１０４】
前記アプタマー結合タンパク質が、ＭＳ２コートタンパク質、またはその機能性誘導体もしくはバリアントを含む、請求項１００～１０２のいずれかに記載の方法。
【請求項１０５】
前記アプタマー結合タンパク質が、ファージＮペプチド、またはその機能性誘導体もしくはバリアントを含む、請求項１００～１０２のいずれかに記載の方法。
【請求項１０６】
前記少なくとも１つのアプタマーが、前記Ｃａｓタンパク質に連結されている、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０７】
前記少なくとも１つのアプタマーが、前記ガイドＲＮＡに連結されている、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０８】
前記動員系が、１～２４個のアプタマーを含む、請求項１０６に記載の方法。
【請求項１０９】
２またはそれを超えるアプタマーが、同じ配列を含む、請求項１０６または１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
前記アプタマーが、ＧＣＮ４ペプチドを含む、請求項１００、１０１または１０６～１０９のいずれかに記載の方法。
【請求項１１１】
前記組換えタンパク質のＮ末端が、前記アプタマー結合タンパク質のＣ末端に連結されている、請求項１００～１１０のいずれかに記載の方法。
【請求項１１２】
前記組換えタンパク質と前記アプタマー結合タンパク質との間にリンカーを更に含む、請求項１００～１１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１１３】
前記リンカーが、配列番号１５のアミノ酸配列を含む、請求項１１２に記載の方法。
【請求項１１４】
少なくとも１つの核局在化配列（ＮＬＳ）を含み、必要に応じて、前記ＮＬＳ（複数可）が、前記組換えタンパク質もしくは前記Ｃａｓタンパク質もしくは前記逆転写酵素、または前記組換えタンパク質、前記逆転写酵素もしくは前記Ｃａｓタンパク質のうちの少な

くとも２つもしくは３つのそれぞれにある少なくとも１つのＮＬＳに連結されている、請求項９７～１１３のいずれかに記載の方法。
【請求項１１５】
前記核局在化配列が、配列番号１６のアミノ酸配列を含む、請求項１１４に記載の方法。
【請求項１１６】
前記系が、前記組換えタンパク質のＣ末端、前記組換えタンパク質のＮ末端または前記Ｃａｓタンパク質のうちの１つまたはそれより多くにＮＬＳを含む、請求項１１４または１１５に記載の方法。
【請求項１１７】
前記組換えタンパク質が、微生物組換えタンパク質またはその活性部分を含む、請求項９７～１１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１８】
前記組換えタンパク質が、ミトコンドリア組換えタンパク質またはその活性部分を含む、請求項９７～１１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１９】
前記組換えタンパク質が、ウイルス組換えタンパク質またはその活性部分を含む、請求項９７～１１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２０】
前記組換えタンパク質が、真核生物組換えタンパク質またはその活性部分を含む、請求項９７～１１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２１】
前記組換えタンパク質が、表１２の組換えタンパク質、またはその誘導体もしくはバリアントもしくは機能的部分を含む、請求項９７～１１６のいずれかに記載の方法。
【請求項１２２】
前記組換えタンパク質、またはその誘導体もしくはバリアントが、表１２のアミノ酸配列と少なくとも７０％の類似性または同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１２１に記載の方法。
【請求項１２３】
前記融合タンパク質が、ＲｅｃＥ、ＲｅｃＴ、またはそれらの誘導体もしくはバリアントを含む、請求項１１７に記載の方法。
【請求項１２４】
前記ＲｅｃＥ、ＲｅｃＴ、またはその誘導体もしくはバリアントが、配列番号１～１４からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％の同一性または類似性または同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１１７に記載の方法。
【請求項１２５】
前記Ｃａｓタンパク質が、触媒的に非活性である（前記Ｃａｓタンパク質の野生型または非変異型と比較して５％未満のヌクレアーゼ活性）か、または触媒的に不活性である、請求項９８～１２４のいずれかに記載の方法。
【請求項１２６】
前記Ｃａｓタンパク質が、Ｃａｓ９またはＣａｓ１２ａを含む、請求項９８～１２５のいずれかに記載の方法。
【請求項１２７】
前記Ｃａｓ９タンパク質が、野生型Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９または野生型Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９を含む、請求項９８～１２６のいずれかに記載の方法。
【請求項１２８】
前記Ｃａｓタンパク質が、ニッカーゼを含む、請求項９８～１２４、１２６または１２７のいずれかに記載の方法。
【請求項１２９】

前記ニッカーゼが、１０位にＤ１０Ａというアミノ酸置換を伴う野生型Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９を含む、請求項１２８に記載の方法。
【請求項１３０】
ドナー核酸を更に含む、請求項９７～１２９のいずれかに記載の方法。
【請求項１３１】
前記標的ＤＮＡ配列が、宿主細胞中のゲノムＤＮＡ配列である、請求項９７～１３０のいずれかに記載の方法。
【請求項１３２】
前記核酸ポリメラーゼが、逆転写酵素活性を含む、請求項９８～１３１のいずれかに記載の方法。
【請求項１３３】
前記核酸ポリメラーゼが、レトロンＲＴを含む、請求項９８～１３１のいずれかに記載の方法。
【請求項１３４】
前記ＲＴと前記組換えタンパク質が、互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する、請求項９８～１３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３５】
前記アプタマー結合タンパク質と前記組換えタンパク質が互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する、請求項１００～１３４のいずれかに記載の方法。
【請求項１３６】
前記ＲＴと前記Ｃａｓタンパク質が互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する、請求項９８～１３５のいずれかに記載の方法。
【請求項１３７】
前記組換えタンパク質と前記Ｃａｓタンパク質が互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する、請求項９８～１３６のいずれかに記載の方法。
【請求項１３８】
前記ＲＴと、前記Ｃａｓタンパク質と、前記組換えタンパク質が、互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する、請求項９８～１３７のいずれかに記載の方法。
【請求項１３９】
前記標的ゲノムＤＮＡ配列が、遺伝子産物をコードする、請求項９７～１３８のいずれかに記載の方法。
【請求項１４０】
前記細胞または前記真核細胞が、哺乳動物細胞である、請求項９７～１３９のいずれかに記載の方法。
【請求項１４１】
前記細胞が、ヒト細胞である、請求項９７～１４０のいずれかに記載の方法。
【請求項１４２】
前記細胞もしくは前記真核細胞または前記哺乳動物細胞または前記ヒト細胞が、幹細胞である、請求項９７～１４１のいずれかに記載の方法。
【請求項１４３】
請求項９７～１４２のいずれかに記載の方法によって産生された組換え細胞または組換え生物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、それぞれ２０２２年２月１０日に出願された米国特許出願第６３／３０８，８３０号、米国特許出願第６３／３０８，８３４号、および米国特許出願第６３／３０８，８３７号、ならびに２０２２年９月１日に出願されたＰＣＴ／ＵＳ２０２２／０７５８５０号に対する３５　Ｕ．Ｓ．Ｃ．§１１９（ｅ）の下での優先権を主張し、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】
２０２０年３月３日に出願された米国特許出願第６２／９８４，６１８号、２０２１年２月５日に出願された米国特許出願第６３／１４６，４４７号、および２０２１年３月２日に出願されたＰＣＴ／ＵＳ２０２１／０２０５１３号を参照されたい。
【０００３】
前述の出願、およびその中でまたはその審査中に引用された全ての文献（「出願引用文献」）、および出願引用文献で引用または参照された全ての文献、および本明細書で引用または参照された全ての文献（「本明細書引用文献」）、および本明細書引用文献で引用または参照された全ての文献は、本明細書で言及された任意の製品または参照により本明細書に組み込まれる任意の文献の製造者の指示、説明、製品仕様、および製品シートと共に、参照により本明細書に組み込まれ、本発明の実施に使用され得る。より具体的には、全ての参照文献は、あたかも各個々の文献が具体的かつ個別に参照により組み込まれることが示されているのと同程度に参照により組み込まれる。
【０００４】
発明の分野
本発明は、ファージ組換え酵素を使用したＲＮＡガイドリコンビニアリング編集系ならびにその方法、ベクター、核酸組成物およびキットに関する。
【０００５】
配列表の記載
ＳＴＤＵ２－４１７２２＿６０１＿ＳＱＬ．ｘｍｌ（サイズ：７５８，６８５バイト；作成日２０２３年２月１０日）と題された電子配列表の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００６】
背景
侵入ウイルスに対して防御するために免疫系の一部として細菌および古細菌に元々見られるクラスター化した規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）系は、正確な位置で編集するためにゲノムまたは他のＤＮＡの特定の一続きの部分を標的とするようにプログラムされ得るゲノム編集技術に対する基礎を形成する。様々なＣＲＩＳＰＲに基づくツールが利用可能であるが、大部分は短い配列の編集に適合している。モデル系の操作、治療用細胞の作製および遺伝子治療において、長い配列の編集が強く求められている。以前の研究では、Ｃａｓ９介在性の相同－５組換え修復（ｈｏｍｏｌｏｇｙ－５ ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｒｅｐａｉｒ）（ＨＤＲ）を改善するための技術（Ｋ．Ｓ．Ｐａｗｅｌｃｚａｋ，ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．１３，３８９－３９６（２０１８））が開発されており、Ｃａｓ９とともに核酸修飾酵素を活用するツール、例えばプライム編集（Ａ．Ｖ．Ａｎｚａｌｏｎｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．５７６，１４９－１５７（２０１９））は、最大８０塩基対（ｂｐ）の長さの編集を実証した。これらの進歩にもかかわらず、高い効率および忠実度を有する大規模な哺乳動物ゲノム操作が引き続き求められている。
本出願における任意の文書の引用または特定は、そのような文書が本発明の先行技術として利用可能であることを認めるものではない。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００７】
【非特許文献１】Ｋ．Ｓ．Ｐａｗｅｌｃｚａｋ，ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．１３，３８９－３９６（２０１８）
【非特許文献２】Ａ．Ｖ．Ａｎｚａｌｏｎｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ．５７６，１４９－１５７（２０１９）
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】

【０００８】
概要
高精度でありオフターゲットエラーが少ない、大規模な核酸編集を可能にする方式で核酸編集を促進する系および方法が本明細書中で提供される。これらの系および方法は、組換えタンパク質成分および必要に応じてＣＲＩＳＰＲ成分を用いる。
【０００９】
例えば、結合タンパク質、標的ＤＮＡ配列に相補的なガイドＲＮＡ配列を含む核酸分子、および組換えタンパク質を含む系が本明細書に開示される。組換えタンパク質は、微生物組換えタンパク質、例えば、ＲｅｃＥ、ＲｅｃＴ、ラムダエキソヌクレアーゼ（Ｅｘｏ）、Ｂｅｔタンパク質（ｂｅｔＡ、ｒｅｄＢ）、エキソヌクレアーゼｇｐ６、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質ｇｐ２．５、またはその誘導体もしくはバリアントを含むがこれらに限定されない一本鎖ＤＮＡアニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ：ｓｉｎｇｌｅ ｓｔｒａｎｄｅｄ ＤＮＡ ａｎｎｅａｌｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ）であり得る。いくつかの実施形態では、系は、ドナーＤＮＡを更に含む。いくつかの実施形態では、標的ＤＮＡ配列は、宿主細胞中のゲノムＤＮＡ配列である。特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ成分は、存在しない。特定の実施形態では、系は、組換えタンパク質と、組換えタンパク質を標的に指向させる核酸とを動員する動員系を含む。特定の実施形態では、動員系は、組換えタンパク質、組換えタンパク質を指向させる核酸、およびＣＲＩＳＰＲ成分を動員する。
【００１０】
一態様では、本発明は、ＳＳＡＰを含み、ＣＲＩＳＰＲ成分を欠く組換え系を提供する。特定の実施形態では、本発明は、系または組成物であって、（ｉ）標的ＤＮＡ配列に相補的なガイドＲＮＡ配列を含む核酸分子と、（ｉｉ）組換えタンパク質であって、組換えタンパク質が、エキソヌクレアーゼ、一本鎖ＤＮＡアニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）、または一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ）、またはそれらの２つもしくはそれより多くの組み合わせを含む、組換えタンパク質、あるいは、（ｉｉｉ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉ）および／または（ｉｉ）をコードまたは送達する核酸分子、あるいは、（ｉｖ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉｉｉ）に記載の核酸分子を含有するベクターとを含む、系または組成物を提供する。特定の実施形態では、系または組成物は、ＣＲＩＳＰＲタンパク質を含まないか、またはＣａｓタンパク質を含まないか、またはＣａｓ９タンパク質を含まないか、またはＣａｓ１２ａタンパク質を含まない。
【００１１】
特定の実施形態では、系または組成物は、ガイド核酸および組換えタンパク質を動員するための動員系を含む。特定の実施形態では、動員系は、少なくとも１つのアプタマー配列と、融合タンパク質の一部として組換えタンパク質に機能的に連結されたアプタマー結合タンパク質とを含む。特定の実施形態では、少なくとも１つのアプタマー配列は、ＲＮＡアプタマー配列またはペプチドアプタマー配列である。特定の実施形態では、核酸分子または複数の核酸分子は、少なくとも１つのＲＮＡアプタマー配列を追加的に含むか、または１、２、３もしくはそれを超えるＲＮＡアプタマー配列を含む。特定の実施形態では、２つのアプタマー配列は、同じ配列を含むか、または同じアプタマー結合タンパク質に結合する配列を含む。
【００１２】
特定の実施形態では、アプタマー結合タンパク質は、ＭＳ２コートタンパク質、またはその機能性誘導体もしくはバリアントを含む。特定の実施形態では、アプタマー結合タンパク質は、ファージＮペプチド、またはその機能性誘導体もしくはバリアントを含む。特定の実施形態では、少なくとも１つのペプチドアプタマー配列は、ガイドＲＮＡにコンジュゲートされる。特定の実施形態では、少なくとも１つのペプチドアプタマー配列は、１～２４のペプチドアプタマー配列を含む。特定の実施形態では、２またはそれを超えるアプタマー配列が、同じ配列を含む。特定の実施形態では、アプタマー配列は、ＧＣＮ４ペプチド配列を含む。
【００１３】

特定の実施形態では、組換えタンパク質のＮ末端は、アプタマー結合タンパク質のＣ末端に連結されている。特定の実施形態では、組換えタンパク質およびアプタマー結合タンパク質は、リンカーによって作動可能に連結されている。

【００１４】

特定の実施形態では、組換え系または組換え組成物は、少なくとも１つの核局在化配列（ＮＬＳ：ｎｕｃｌｅａｒ　ｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ）を含み、必要に応じて、ＮＬＳ（複数可）は、組換えタンパク質に連結されている。特定の実施形態では、ＮＬＳは、組換えタンパク質のＣ末端または組換えタンパク質のＮ末端に位置する。

【００１５】

特定の実施形態では、組換えタンパク質は、微生物組換えタンパク質もしくはその活性部分、ミトコンドリア組換えタンパク質もしくはその活性部分、ウイルス組換えタンパク質もしくはその活性部分、または真核生物組換えタンパク質もしくはその活性部分を含み、表１２に示される組換えタンパク質、またはその誘導体もしくはバリアントもしくは機能的部分を含むが、これらに限定されない。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、表１２に示される組換えタンパク質、またはその誘導体もしくはバリアントもしくは機能的部分と少なくとも７０％の同一性、または少なくとも７５％の同一性、または少なくとも８０％の同一性、または少なくとも８５％の同一性、または少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９２％の同一性、または少なくとも９５％の同一性、または少なくとも９６％の同一性、または少なくとも９７％の同一性、または少なくとも９８％の同一性、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００１６】

特定の実施形態では、系または組成物は、ドナー核酸を含む。特定の実施形態では、ドナー核酸は、相同アームを含む。

【００１７】

特定の実施形態では、組換え系は、細胞、例えば、真核細胞、哺乳動物細胞、動物細胞、ヒト細胞または植物細胞に含まれる。

【００１８】

動員系は、組換えタンパク質の多数の組み合わせおよび構成に適合可能である。例えば、複数の核酸アプタマーを選択して組み込むことにより、系は、同じであっても異なっていてもよい複数の組換えタンパク質を様々な比率で含むことができる。特定の実施形態では、系は、エキソヌクレアーゼを含む。特定の実施形態では、系は、ＳＳＡＰを含む。特定の実施形態では、系は、ＳＳＢを含む。特定の実施形態では、系は、エキソヌクレアーゼおよびＳＳＡＰを含む。特定の実施形態では、系は、エキソヌクレアーゼおよびＳＳＢを含む。特定の実施形態では、系は、ＳＳＡＰおよびＳＳＢを含む。特定の実施形態では、系は、エキソヌクレアーゼおよびＳＳＡＰを含み、ＳＳＢを含まない。特定の実施形態では、系は、エキソヌクレアーゼおよびＳＳＢを含み、ＳＳＡＰを含まない。特定の実施形態では、系は、ＳＳＡＰおよびＳＳＢを含み、エキソヌクレアーゼを含まない。特定の実施形態では、系は、エキソヌクレアーゼ、ＳＳＡＰ、およびＳＳＢを含む。

【００１９】

一態様では、本発明は、ＳＳＡＰおよび逆転写酵素（ＲＴ）を含む組換え系を提供する。特定の実施形態では、本発明は、系または組成物であって、（ｉ）逆転写酵素（複数可）（ＲＴ）と、（ｉｉ）標的ＤＮＡ配列に相補的なガイドＲＮＡ配列および逆転写用のＲＮＡを含む核酸分子、または標的ＤＮＡ配列に相補的なガイドＲＮＡ配列および逆転写用のＲＮＡを含む複数の核酸分子と、（ｉｉｉ）組換えタンパク質であって、組換えタンパク質が、エキソヌクレアーゼ、一本鎖ＤＮＡアニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）、もしくは一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ）、またはそれらの２つもしくはそれより多くの組み合わせを含む、組換えタンパク質、あるいは、（ｉｖ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉ）および／もしくは（ｉｉ）および／もしくは（ｉｉｉ）をコードもしくは送達する核酸分子（複数可）、あるいは、（ｖ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉ

ｖ）の前記核酸分子（複数可）を含有するベクターとを含む、系または組成物を提供する。

【００２０】

特定の実施形態では、系または組成物は、Ｃａｓタンパク質を更に含むか、または（ｉｖ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉ）および／もしくは（ｉｉ）および／もしくは（ｉｉｉ）および／もしくはＣａｓタンパク質をコードまたは送達する核酸分子（複数可）を含むか、または（ｖ）のベクター（複数可）が、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸分子（複数可）を追加的に含有する。

【００２１】

特定の実施形態では、成分のうちの１つまたはそれより多くは、複合体として提供される。例えば、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）として、タンパク質または融合タンパク質と核酸が提供される。ＲＮＰの非限定的な例としては、ＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡ複合体およびＳＳＡＰガイドＲＮＡ複合体が挙げられる。特定の実施形態では、融合タンパク質は、１またはそれを超える成分を含む。非限定的な例としては、Ｃａｓ９－ＳＳＡＰ融合物、Ｃａｓ９－ＲＴ融合物、およびＳＳＡＰ－ＲＴ融合物が挙げられる。

【００２２】

特定の実施形態では、系または組成物は、ガイド核酸および組換えタンパク質を動員するための動員系を含む。特定の実施形態では、動員系は、少なくとも１つのアプタマー配列と、融合タンパク質の一部として組換えタンパク質に機能的に連結されたアプタマー結合タンパク質とを含む。特定の実施形態では、少なくとも１つのアプタマー配列は、ＲＮＡアプタマー配列またはペプチドアプタマー配列である。特定の実施形態では、核酸分子または複数の核酸分子は、少なくとも１つのＲＮＡアプタマー配列を追加的に含むか、または１、２、３もしくはそれを超えるＲＮＡアプタマー配列を含む。特定の実施形態では、２つのアプタマー配列は、同じ配列を含むか、または同じアプタマー結合タンパク質に結合する配列を含む。

【００２３】

特定の実施形態では、アプタマー結合タンパク質は、ＭＳ２コートタンパク質、またはその機能性誘導体もしくはバリアントを含む。特定の実施形態では、アプタマー結合タンパク質は、ファージＮペプチド、またはその機能性誘導体もしくはバリアントを含む。特定の実施形態では、少なくとも１つのペプチドアプタマー配列は、ガイドＲＮＡにコンジュゲートされる。特定の実施形態では、少なくとも１つのペプチドアプタマー配列は、１～２４のペプチドアプタマー配列を含む。特定の実施形態では、２またはそれを超えるアプタマー配列が、同じ配列を含む。特定の実施形態では、アプタマー配列は、ＧＣＮ４ペプチド配列を含む。

【００２４】

特定の実施形態では、組換えタンパク質のＮ末端は、アプタマー結合タンパク質のＣ末端に連結されている。特定の実施形態では、組換えタンパク質およびアプタマー結合タンパク質は、リンカーによって作動可能に連結されている。

【００２５】

特定の実施形態では、組換え系または組換え組成物は、少なくとも１つの核局在化配列（ＮＬＳ）を含み、必要に応じて、ＮＬＳ（複数可）は、組換えタンパク質に連結されている。特定の実施形態では、ＮＬＳは、組換えタンパク質のＣ末端または組換えタンパク質のＮ末端に位置する。

【００２６】

特定の実施形態では、組換えのタンパク質は、微生物組換えタンパク質もしくはその活性部分、ミトコンドリア組換えタンパク質もしくはその活性部分、ウイルス組換えタンパク質もしくはその活性部分、または真核生物組換えタンパク質もしくはその活性部分を含み、表１２に示される組換えタンパク質、またはその誘導体もしくはバリアントもしくは機能的部分を含むが、これらに限定されない。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、表１２に示される組換えタンパク質、またはその誘導体もしくはバリアントもしくは機

能的部分と少なくとも７０％の同一性、または少なくとも７５％の同一性、または少なくとも８０％の同一性、または少なくとも８５％の同一性、または少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９２％の同一性、または少なくとも９５％の同一性、または少なくとも９６％の同一性、または少なくとも９７％の同一性、または少なくとも９８％の同一性、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００２７】

特定の実施形態では、系または組成物は、ドナー核酸を含む。特定の実施形態では、ドナー核酸は、相同アームを含む。

【００２８】

特定の実施形態では、組換え系は、細胞、例えば、真核細胞、哺乳動物細胞、動物細胞、ヒト細胞または植物細胞に含まれる。

【００２９】

一態様では、本発明は、組換えの方法であって、細胞において、系または組成物、（ｉ）標的ＤＮＡ配列に相補的なガイドＲＮＡ配列を含む核酸分子であって、標的ＤＮＡ配列が細胞中のゲノムＤＮＡ配列を含む、核酸分子、ならびに（ｉｉ）組換えタンパク質であって、組換えタンパク質が、エキソヌクレアーゼ、一本鎖ＤＮＡアニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）、もしくは一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ）、またはそれらの２つもしくはそれより多くの組み合わせを含む、組換えタンパク質、あるいは、（ｉｉｉ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉ）および／または（ｉｉ）をコードまたは送達する核酸分子（複数可）、あるいは、（ｉｖ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉｉｉ）の核酸分子（複数可）を含有するベクターを提供することを含む方法を提供する。

【００３０】

特定の実施形態では、（ｉ）および（ｉｉ）は、Ｃａｓタンパク質または核酸ポリメラーゼ（逆転写酵素（ＲＴ）またはＣａｓタンパク質およびＲＴ等の逆転写酵素活性を有する天然または操作されたポリメラーゼを含むが、これらに限定されない）を更に含むか、または（ｉｉｉ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉ）および／もしくは（ｉｉ）および／もしくはＣａｓタンパク質および／もしくはＲＴをコードもしくは送達する核酸分子を含むか、または（ｉｖ）のベクター（複数可）は、Ｃａｓタンパク質および／またはＲＴをコードする核酸分子（複数可）を追加的に含有する。

【００３１】

特定の実施形態では、成分のうちの１つまたはそれより多くは、複合体として提供される。例えば、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）として、タンパク質または融合タンパク質と核酸が提供される。ＲＮＰの非限定的な例としては、ＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡ複合体およびＳＳＡＰガイドＲＮＡ複合体が挙げられる。特定の実施形態では、融合タンパク質は、１またはそれを超える成分を含む。非限定的な例としては、Ｃａｓ９－ＳＳＡＰ融合物、Ｃａｓ９－ＲＴ融合物、およびＳＳＡＰ－ＲＴ融合物が挙げられる。

【００３２】

特定の実施形態では、標的ＤＮＡ配列は、アルブミン（ＡＬＢ）、ＡＡＶＳ１、ＨＳＰ９０ＡＡ１、ＤＹＮＬＴ１、ＡＣＴＢ、ＢＣＡＰ３１、ＨＩＳＴ１Ｈ２ＢＫ、ＣＬＴＡ、またはＲＡＢ１１Ａのゲノム配列を含む。

【００３３】

特定の実施形態では、系または組成物は、ガイド核酸および組換えタンパク質を動員するための動員系を含む。特定の実施形態では、動員系は、少なくとも１つのアプタマー配列と、融合タンパク質の一部として組換えタンパク質に機能的に連結されたアプタマー結合タンパク質とを含む。特定の実施形態では、少なくとも１つのアプタマー配列は、ＲＮＡアプタマー配列またはペプチドアプタマー配列である。特定の実施形態では、核酸分子または複数の核酸分子は、少なくとも１つのＲＮＡアプタマー配列を追加的に含むか、または１、２、３もしくはそれを超えるＲＮＡアプタマー配列を含む。特定の実施形態では、２つのアプタマー配列は、同じ配列を含むか、または同じアプタマー結合タンパク質に結合する配列を含む。

【００３４】
特定の実施形態では、アプタマー結合タンパク質は、ＭＳ２コートタンパク質、またはその機能性誘導体もしくはバリアントを含む。特定の実施形態では、アプタマー結合タンパク質は、ファージＮペプチド、またはその機能性誘導体もしくはバリアントを含む。特定の実施形態では、少なくとも１つのペプチドアプタマー配列は、ガイドＲＮＡにコンジュゲートされる。特定の実施形態では、少なくとも１つのペプチドアプタマー配列は、１～２４のペプチドアプタマー配列を含む。特定の実施形態では、２またはそれを超えるアプタマー配列が、同じ配列を含む。特定の実施形態では、アプタマー配列は、ＧＣＮ４ペプチド配列を含む。
【００３５】
特定の実施形態では、組換えタンパク質のＮ末端は、アプタマー結合タンパク質のＣ末端に連結されている。特定の実施形態では、組換えタンパク質およびアプタマー結合タンパク質は、リンカーによって作動可能に連結されている。特定の実施形態では、リンカーは、３９１１５を含む。
【００３６】
特定の実施形態では、組換え系または組換え組成物は、少なくとも１つの核局在化配列（ＮＬＳ）を含み、必要に応じて、ＮＬＳ（複数可）は、組換えタンパク質に連結されている。特定の実施形態では、ＮＬＳは、配列番号１６のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ＮＬＳは、組換えタンパク質のＣ末端または組換えタンパク質のＮ末端に位置する。
【００３７】
特定の実施形態では、組換えのタンパク質は、微生物組換えタンパク質もしくはその活性部分、ミトコンドリア組換えタンパク質もしくはその活性部分、ウイルス組換えタンパク質もしくはその活性部分、または真核生物組換えタンパク質もしくはその活性部分を含み、表１２に示される組換えタンパク質、またはその誘導体もしくはバリアントもしくは機能的部分を含むが、これらに限定されない。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、表１２に示される組換えタンパク質、またはその誘導体もしくはバリアントもしくは機能的部分と少なくとも７０％の同一性、または少なくとも７５％の同一性、または少なくとも８０％の同一性、または少なくとも８５％の同一性、または少なくとも９０％の同一性、または少なくとも９２％の同一性、または少なくとも９５％の同一性、または少なくとも９６％の同一性、または少なくとも９７％の同一性、または少なくとも９８％の同一性、または少なくとも９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【００３８】
特定の実施形態では、系または組成物は、ドナー核酸を含む。特定の実施形態では、ドナー核酸は、相同アームを含む。
【００３９】
特定の実施形態では、組換え系は、細胞、例えば、真核細胞、哺乳動物細胞、動物細胞、ヒト細胞または植物細胞に含まれる。
【００４０】
いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質はＣａｓ９またはＣａｓ１２ａである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、触媒的に不活性である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は野生型Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９または野生型Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ Ｃａｓ９である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質はＣａｓ９ニッカーゼ（例えば、位置１０にＤ１０Ａというアミノ酸置換（ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｓｕｂｓｔａｔｉｏｎ）を有する野生型Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９）である。
【００４１】
本明細書中で開示される系またはベクターを含む真核細胞も開示される。
【００４２】
宿主細胞において標的ゲノムＤＮＡ配列を変化させる方法が本明細書中でさらに開示さ

れる。本方法は、本明細書中に記載の、系、組成物またはベクターを標的ＤＮＡ配列と接触させること（例えば、標的ゲノムＤＮＡ配列を含む宿主細胞に、本明細書中に記載の、系、組成物またはベクターを導入すること）を含む。前記方法のいずれかを実施するために有用、必要または十分な１またはそれを超える試薬または他の成分を含有するキットも本明細書中で開示される。

【００４３】

いくつかの実施形態では、本発明は、系または組成物であって、（ｉ）核酸ポリメラーゼ（複数可）、例えば逆転写酵素（複数可）（ＲＴ）と、（ｉｉ）標的ＤＮＡ配列に相補的なガイドＲＮＡ配列および逆転写用のＲＮＡを含む核酸分子、または標的ＤＮＡ配列に相補的なガイドＲＮＡ配列および逆転写用のＲＮＡを含む複数の核酸分子と、（ｉｉｉ）組換えタンパク質であって、組換えタンパク質が、エキソヌクレアーゼ、一本鎖ＤＮＡアニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）、もしくは一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ）、またはそれらの２つもしくはそれより多くの組み合わせを含む、組換えタンパク質、あるいは、（ｉｖ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉ）、（ｉｉ）および（ｉｉｉ）をコードもしくは送達する核酸分子（複数可）、あるいは、（ｖ）細胞におけるインビボ発現のための（ｉｖ）の核酸分子（複数可）を含有するベクター（複数可）とを含む、系または組成物を提供する。ＲＴを伴うこの系または組成物（「ＲＴ系または組成物」）では、（ｉｖ）は、（ｉ）が酵素であること、（ｉｉ）が核酸分子（複数可）であること、および（ｉｉｉ）が複数の核酸分子であることを含み得るか、または（ｉ）が酵素（複数可）をコードする核酸分子（複数可）であり、（ｉｉ）が核酸分子（複数可）であり、かつ（ｉｉｉ）がタンパク質であることを含み得るか、または（ｉ）、（ｉｉ）および（ｉｉｉ）の全てが複数の核酸分子であることを含み得る。いくつかの実施形態では、ＲＴ系または組成物は、１よりも多い逆転写酵素を含むことができる。１よりも多い逆転写酵素が存在する場合、逆転写のための１よりも多いＲＮＡが存在し得る。いくつかの実施形態では、ＲＴ系または組成物において、（ｉ）、（ｉｉ）および（ｉｉｉ）は、Ｃａｓタンパク質を更に含むか、または（ｉｖ）は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸分子（複数可）を更に含み、例えば、（ｉｖ）は、細胞におけるインビボ発現のための（ｉ）および／もしくは（ｉｉ）および／もしくは（ｉｉｉ）および／もしくはＣａｓタンパク質をコードもしくは送達する核酸分子（複数可）を含むか、または（ｖ）のベクター（複数可）は、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸分子（複数可）を追加的に含有する。

【００４４】

本発明に従って使用することができる逆転写酵素としては、限定されないが、逆転写酵素、レトロトランスポゾン逆転写酵素、レトロン逆転写酵素、ＬＩＮＥ－１逆転写酵素、Ｅｃ８６逆転写酵素、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）ＲＴ、トリ骨髄芽球症ウイルス（ａｖｉａｎ ｍｙｏｂｌａｓｔｏｓｉｓ ｖｉｒｕｓ）（ＡＭＶ）ＲＴ、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）ＲＴ、グループＩＩイントロンＲＴ、グループＩＩイントロン様ＲＴ、キメラＲＴ、Ｍａ Ｌｕｏｎｉマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）転写酵素、ラウス肉腫ウイルス（ラウス肉腫ウイルス、ＲＳＶ）、トリ骨髄芽球症ウイルス（ＡＭＶ）逆転写酵素、Ｌａｏ Ｓｉｓｈｉ相関ウイルス（Ｌａｏ Ｓｉｓｈｉ ｃｏｒｒｅｌａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ）（ＲＡＶ）逆転写酵素および骨髄芽球腫瘍相関ウイルス（ｍｙｅｌｏｂｌａｓｔ Ｔｕｍｏｒ ｃｏｒｒｅｌａｔｅｄ ｖｉｒｕｓ）（ＭＡＶ）逆転写酵素または他のトリ肉腫ロイコウイルス（トリ肉腫白血症ウイルス、ＡＳＬＶ）逆転写酵素、ならびに他の天然に存在するおよび操作された核酸ポリメラーゼが挙げられる。そのような操作されたポリメラーゼとしては、限定されるが、細胞環境において逆転写酵素活性を有するヒトＤＮＡポリメラーゼη（Ｓｕ ｅｔ ａｌ．２０１９，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２９４（１５）：６０７３－８１）、および逆転写および鎖置換を増強するように操作されたＴａｑ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｂａｒｎｅｓ ｅｔ ｅｌ．，Ｆｒｏｎｔ．Ｂｉｏｅｎｇ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１４ Ｊａｎｕａｒｙ ２０２１，ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．３３８９／ｆｂｉｏｅ．２０２０．５５３４７４）が挙げられる。

【００４５】

いくつかの実施形態では、ＲＴ系または組成物は、少なくとも１つのアプタマー配列と、融合タンパク質の一部として組換えタンパク質に機能的に連結されたアプタマー結合タンパク質とを含む動員系を更に含む。いくつかの実施形態では、ＲＴ系または組成物または動員系を有する組成物において、少なくとも１つのアプタマー配列は、ＲＮＡアプタマー配列またはペプチドアプタマー配列である。いくつかの実施形態では、ＲＴ系または組成物もしくは動員系を有する組成物は、少なくとも１つのＲＮＡアプタマー配列を追加的に含む核酸分子または複数の核酸分子を有し、例えば、核酸分子または複数の核酸分子は、２つのＲＮＡアプタマー配列を含み、例えば、この場合、２つのＲＮＡアプタマー配列は同じ配列を含む。いくつかの実施形態では、ＲＴ系または組成物または動員系を有する組成物は、ＭＳ２コートタンパク質またはその機能性誘導体もしくはバリアントを含むアプタマー結合タンパク質を有する、および／またはアプタマー結合タンパク質は、ファージＮペプチド、またはその機能性誘導体もしくはバリアントを含む、および／または少なくとも１つのペプチドアプタマー配列はＣａｓタンパク質にコンジュゲートされている、および／または少なくとも１つのペプチドアプタマー配列は、１～２４のペプチドアプタマー配列を含む、および／またはアプタマー配列は同じ配列を含む。いくつかの実施形態では、ＲＴ系または組成物または動員系を有する組成物は、ＧＣＮ４ペプチド配列を含むアプタマー配列を有する。

【００４６】

ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、組換えタンパク質のＮ末端は、アプタマー結合タンパク質のＣ末端に連結されており、いくつかの実施形態では、ＲＴ系または組成物は、組換えタンパク質とアプタマー結合タンパク質との間にリンカーを更に含み、例えば、いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号１５のアミノ酸配列を含む。

【００４７】

ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、系または組成物は、少なくとも１つの核局在化配列（ＮＬＳ）を含み、必要に応じて、ＮＬＳは、組換えタンパク質またはＣａｓタンパク質または逆転写酵素に、あるいは組換えタンパク質、逆転写酵素またはＣａｓタンパク質のうちの少なくとも２つまたは３つのそれぞれにおける少なくとも１つのＮＬＳに連結され、例えば、いくつかの実施形態では、核局在化配列は、配列番号１６のアミノ酸配列を含む。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、核局在化配列は、組換えタンパク質またはＣａｓタンパク質上の組換えタンパク質のＣ末端にある。

【００４８】

ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、組換えタンパク質またはその活性部分を含む。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、ミトコンドリア組換えタンパク質またはその活性部分を含む。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、ウイルス組換えタンパク質またはその活性部分を含む。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、真核生物組換えタンパク質またはその活性部分を含む。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、ＲｅｃＥもしくはＲｅｃＴまたはＲｅｃＥおよびＲｅｃＴ、またはその誘導体もしくはバリアントもしくは機能的部分を含む。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、ＲｅｃＥまたはその誘導体もしくはバリアントは、配列番号１～８からなる群より選択されるアミノ酸配列との少なくとも７０％（または７０～１００％の任意の整数、例えば、少なくとも７１％、７２％、７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）の類似性または同一性または相同性を有するアミノ酸配列を含む。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、融合タンパク質は、ＲｅｃＴまたはその誘導体もしくはバリアントを含む。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、ＲｅｃＴまたはその誘導体もしくはバリアントは、配列番号９～１４からなる群より選択されるアミノ酸配列との少なくとも７０％（または７０～１００％の任意の整数、例えば、少なくとも７１％、７２％、７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％

、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）の類似性または同一性または相同性を有するアミノ酸配列を含む。

【００４９】

ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、触媒的に非活性である（Ｃａｓタンパク質の野生型または非変異型と比較して５％未満のヌクレアーゼ活性）か、または触媒的に不活性である（ｃａｔａｌｙｔｉｃａｌｌｙ　ｄｅａｄ）。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ９またはＣａｓ１２ａを含む。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、野生型化Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９または野生型Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９を含む。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、ニッカーゼを含む。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、ニッカーゼは、１０位にＤ１０Ａというアミノ酸置換を伴う野生型Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９を含む。

【００５０】

ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、ドナー核酸を更に含む。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、標的ＤＮＡ配列は、宿主細胞におけるゲノムＤＮＡ配列である。

【００５１】

ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、ＲＴと組換えタンパク質は、互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、アプタマー結合タンパク質と組換えタンパク質は、互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、ＲＴとＣａｓタンパク質は、互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、組換えタンパク質とＣａｓタンパク質は、互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では。ＲＴ系または組成物のいくつかの実施形態では、ＲＴと、Ｃａｓタンパク質と、組換えタンパク質は、互いに機能的に連結されており、融合タンパク質を構成する。

【００５２】

ＲＴ、およびＲＴ系または組成物の実施形態の成分を機能的に連結するためのリンカーまたは方法に関して（ならびにＲＴを含まない本明細書で考察される系または組成物の成分を機能的に連結するためのリンカーまたは方法に関して）、プライム編集（ｐｒｉｍｅ　ｅｄｉｔｉｎｇ）およびツインプライム編集（ｔｗｉｎ　ｐｒｉｍｅ　ｅｄｉｔｉｎｇ）として知られるものを含む国際公開２０２０／１９１２４１号、国際公開２０２０／１９１１５３号、国際公開２０２０／１９１２４５号、国際公開２０２０／１９１２４３号、国際公開２０２０／１９１２３３号、国際公開２０２０／１９１２４６号、国際公開２０２０／１９１２４９号、国際公開２０２０／１９１２３９号、国際公開２０２０／１９１２３４号、国際公開２０２０／１９１２４２号、国際公開２０２０／１９１２４８号、国際公開２０２０１９１１７１号、国際公開２０２１／２２６５５８号が言及される。国際公開２０２０／１９１２４１号、国際公開２０２０／１９１１５３号、国際公開２０２０／１９１２４５号、国際公開２０２０／１９１２４３号、国際公開２０２０／１９１２３３号、国際公開２０２０／１９１２４６号、国際公開２０２０／１９１２４９号、国際公開２０２０／１９１２３９号、国際公開２０２０／１９１２３４号、国際公開２０２０／１９１２４２号、国際公開２０２０／１９１２４８号、国際公開２０２０１９１１７１号、国際公開２０２１／２２６５５８号の各々が、参照により本明細書に組み込まれる。国際公開２０２０／１９１２４１号、国際公開２０２０／１９１１５３号、国際公開２０２０／１９１２４５号、国際公開２０２０／１９１２４３号、国際公開２０２０／１９１２３３号、国際公開２０２０／１９１２４６号、国際公開２０２０／１９１２４９号、国際公開２０２０／１９１２３９号、国際公開２０２０／１９１２３４号、国際公開２０２０／１９１２４２号、国際公開２０２０／１９１２４８号、国際公開２０２０１９１１７１

号、国際公開２０２１／２２６５５８号のＲＴを本発明の実施において使用することができる。国際公開２０２０／１９１２４１号、国際公開２０２０／１９１１５３号、国際公開２０２０／１９１２４５号、国際公開２０２０／１９１２４３号、国際公開２０２０／１９１２３３号、国際公開２０２０／１９１２４６号、国際公開２０２０／１９１２４９号、国際公開２０２０／１９１２３９号、国際公開２０２０／１９１２３４号、国際公開２０２０／１９１２４２号、国際公開２０２０／１９１２４８号、国際公開２０２０１９１１７１号、国際公開２０２１／２２６５５８号のリンカーまたは機能的に連結する方法を本発明の実施において使用することができる。

【００５３】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載または考察される任意のＲＴ系または組成物を含む細胞または真核細胞を包含する。いくつかの実施形態では、本発明は、標的ゲノムＤＮＡ配列を含む細胞において標的ゲノムＤＮＡ配列を改変させる方法であって、本明細書で考察されるまたは記載される任意のＲＴ系または組成物を導入することを含む方法を包含する。いくつかの実施形態では、細胞もしくは真核細胞は、哺乳動物細胞であり、または方法において、細胞もしくは真核細胞は、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞、例えば、幹細胞である。いくつかの実施形態では、本方法は、遺伝子産物をコードする標的ゲノムＤＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞に導入することは、対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、対象が哺乳動物の非ヒト動物（例えば、げっ歯類、ラット、マウス、ウサギ等の実験動物、またはウマ、イヌもしくはイヌ（ｃａｎｉｎｅ）、ネコもしくはネコ（ｆｅｌｉｎｅ）等の家畜、または動物園動物（ヒトの飼育管理下にある家畜化されていない動物）、またはウシもしくはブタ等の生産動物）、またはヒトであることを含む。いくつかの実施形態では、本方法において、投与することは、インビボ投与を含む。いくつかの実施形態では、本方法において、細胞もしくは真核細胞または哺乳動物細胞は、エクスビボの細胞またはインビトロの細胞である。いくつかの実施形態では、本方法は、導入するステップの後に、対象にエクスビボの細胞またはインビトロの細胞を投与することを含み、そのような実施形態では、対象は、哺乳動物の非ヒト動物またはヒトである。

【００５４】

いくつかの実施形態では、本発明は、細胞における標的ＤＮＡ配列の改変のためのＲＴ系または組成物の使用を含む。

【００５５】

ＲＴを含まない本明細書で考察される系または組成物では、ＲＴに関連しないＲＴ系またはＲＴ系（例えば、リンカー）の態様を、ＲＴを含まない本明細書に考察される任意の系または組成物に適用することができる。

【００５６】

リンカーは、５～３０、１０～３０、１０～２０または１５アミノ酸残基のペプチドであり得る。リンカーは、－（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）$_2$－（配列番号５６０）、－（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）$_3$－（配列番号５６１）または－（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）$_4$－（配列番号５６２）であり得る。特定の実施形態では、リンカーは、－（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）$_3$－（配列番号５６１）である。配列番号５６１のアミノ酸配列は、配列番号５６３の核酸配列によってコードされ得る。

【００５７】

特定の実施形態では、リンカーは、グリシンおよびアラニン等の立体的に妨げられていない大部分のアミノ酸から構成される。例示的なリンカーは、ポリグリシン（特に、ポリ（Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）、ポリ（Ｇｌｙ－Ａｌａ）およびポリアラニン）である。以下の実施例に示される例示的な適切なリンカーの１つは、（Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）、例えば、－（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）$_2$－（配列番号５６０）、－（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）$_3$－（配列番号５６１）または－（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）$_4$－（配列番号５６２）である。

【００５８】
リンカーはまた、非ペプチドリンカーであり得る。例えば、ｓ＝２～２０である－ＮＨ－、－（ＣＨ２）ｓ－Ｃ（Ｏ）－等のアルキルリンカーを使用することができる。これらのアルキルリンカーは、低級アルキル（例えば、Ｃ１～４）低級アシル、ハロゲン（例えば、ＣＩ、Ｂｒ）、ＣＮ、ＮＨ２、フェニル等の任意の立体的に障害しない基で更に置換されていてもよい。
【表１３】

リンカーの核酸配列 GGCGGCGGTGGGAGCGGCGGCGGTGGGAGCGGCGGCGGGGGCTCG (配列番号 563)
リンカーのアミノ酸配列 GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号561)
リンカーのアミノ酸配列 GGGGSGGGGS (配列番号560)
リンカーのアミノ酸配列 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (配列番号562)

【００５９】
したがって、本発明の目的は、任意の以前に知られている製品、製品の製造プロセス、または製品の使用方法を本発明に包含させないことであり、その結果、出願人は権利を留保し、任意の以前に知られている製品、プロセス、または方法の権利放棄をここに開示することである。さらに、本発明は、ＵＳＰＴＯ（３５　Ｕ．Ｓ．Ｃ．§１１２、第１段落）またはＥＰＯ（ＥＰＣ第８３条）の記述要件および実施可能要件を満たさない任意の製品、プロセス、または製品の製造もしくは製品の使用方法を本発明の範囲内に包含することを意図するものではなく、その結果、出願人は権利を留保し、任意の以前に記載された製品、製品の製造プロセス、または製品の使用方法の権利放棄をここに開示することに留意されたい。本発明の実施においては、ＥＰＣ第５３条（ｃ）ならびにＥＰＣ規則第２８条（ｂ）および（ｃ）に従うことが有利であり得る。本出願の系統または任意の他の系統または任意の第三者の任意の先に出願された出願における出願人の任意の付与特許（複数可）の対象である任意の実施形態を明示的に放棄する全ての権利は、明示的に留保される。本明細書のいかなる内容も、約束として解釈されるべきではない。
【００６０】
本開示において、特に特許請求の範囲および／または段落において、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含まれる（ｃｏｍｐｒｉｓｅｄ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などの用語は、米国特許法においてそれに帰される意味を有することができることに留意されたい。例えば、それらは、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「含まれる（ｉｎｃｌｕｄｅｄ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」などを意味することができる。「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」および「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｓ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」などの用語は、米国特許法においてそれらに帰される意味を有し、例えば、それらは、明示的に列挙されていない要素を可能にするが、先行技術において見出されるか、または本発明の基本的もしくは新規な特徴に影響を及ぼす要素を除外する。
【００６１】
これらおよび他の実施形態は、以下の詳細な説明から開示されるか、または明らかであり、以下の詳細な説明に包含される。
【００６２】
本発明の他の態様および実施形態は、以下の詳細な説明および添付の図面に照らして明らかになる。
【図面の簡単な説明】
【００６３】

【図１】図１Ａおよび図１Ｂは、酵母およびヒト由来の真核生物組換え酵素による再構築されたＲｅｃＥ（図１Ａ）およびＲｅｃＴ（図１Ｂ）系統樹である。
【００６４】
【図２－１】図２Ａは、ＲｅｃＥ／ＲｅｃＴ相同体の系統樹および長さの分布である。図２Ｂは、ＲｅｃＥ／Ｔのメタゲノミクス分布である。図２Ｃは、本明細書中で開示される中央モデルを示す概略図である。図２Ｄは、ＲｅｃＥ／Ｔ相同体のゲノムノックイン効率のグラフである。
【図２－２】同上。
【図２－３】同上。
【００６５】
【図３－１】図３Ａおよび３Ｂは、ＥＭＸ１（図３Ａ）遺伝子座およびＶＥＧＦＡ（図３Ｂ）遺伝子座における相同組換え修復（ＨＤＲ）のハイスループットシーケンシング（ＨＴＳ）リードのグラフである。図３Ｃ～３Ｅは、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＨＳＰ９０ＡＡ１（図３Ｃ）、ＤＹＮＬＴ１（図３Ｄ）およびＡＡＶＳ１（図３Ｅ）遺伝子座でのｍＫａｔｅノックイン効率のグラフである。図３Ｆは、ＲｅｃＴによるＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるｍＫａｔｅノックイン効率の画像である。図３Ｇは、例示的なＡＡＶＳ１ノックインストラテジーおよびＲｅｃＴノックイン群からのクロマトグラムトレースの概略図である。図３Ｈは、動員制御実験および対応するノックイン効率の概略図およびグラフである。全ての結果がＮＲに対して正規化される。（ＮＣ、切断なし；ＮＲ、リコンビネーター（ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｏｒ）なし）。
【図３－２】同上。
【図３－３】同上。
【００６６】
【図４－１】図４Ａ～４Ｃは、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＨＳＰ９０ＡＡ１（図４Ａ）、ＤＹＮＬＴ１（図４Ｂ）およびＡＡＶＳ１（図４Ｃ）遺伝子座でのＮＥ群に対する相対的ｍＫａｔｅノックイン効率のグラフである。（ＮＣ、切断対照群なし。ＮＲ、リコンビネーター対照群なし）。図４Ｄは、ＡＡＶＳ１遺伝子座におけるｍＫａｔｅノックインを検証するジャンクションＰＣＲの例示的なアガロースゲルの画像である。図４Ｅおよび図４Ｆは、ＡＡＶＳ１遺伝子座における絶対および（図４Ｅ）および相対的（図４Ｆ）ＬＯＶノックイン効率のグラフである。図４Ｇは、ＡＡＶＳ１遺伝子座における例示的なｍＫａｔｅノックインのジャンクションＰＣＲ産物のサンガーシーケンシング結果である。
【図４－２】同上。
【００６７】
【図５－１】図５Ａ～図５Ｄは、細胞株Ａ５４９（図５Ａ）、ＨｅｐＧ２（図５Ｂ）、ＨｅＬａ（図５Ｃ）およびｈＥＳＣ（Ｈ９）（図５Ｄ）にわたる異なる遺伝子座でのゲノムノックイン効率のグラフである。図５Ｅは、ｈＥＳＣにおけるｍＫａｔｅノックインの画像である。図５Ｆおよび図５Ｇは、ＲＥＤＩＴｖ１ツールのゲノムワイドオフターゲット部位（ＯＴＳ）カウント（図５Ｆ）およびＯＴＳ染色体分布（図５Ｇ）である。
【図５－２】同上。
【図５－３】同上。
【００６８】
【図６－１】図６Ａ～図６Ｄは、Ａ５４９細胞株（図６Ａ）におけるＡＡＶＳ１遺伝子座およびＤＹＮＴ１遺伝子座、ＨｅｐＧ２細胞株（図６Ｂ）におけるＤＹＮＬＴ１遺伝子座およびＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座、Ｈｅｌａ細胞株（図６Ｃ）におけるＤＹＮＬＴ１遺伝子座およびＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座、およびｈＥＳ－Ｈ９細胞株（図６Ｄ）におけるＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座およびＯＣＴ４遺伝子座における相対的ｍＫａｔｅノックイン効率のグラフである。（ＮＣ、切断対照群なし。ＮＲ、リコンビネーター対照群なし。全てのデータをＮＲ群に対して正規化）。図６Ｅは、ｈＥＳ－Ｈ９細胞におけるＨＳＰ９０ＡＡ１　ｍＫａｔｅノックインの代表的なＦＡＣＳ結果である。
【図６－２】同上。

【００６９】
【図７－１】図７Ａ～７Ｄは、ＤＹＮＬＴ１（図７Ａ）およびＨＳＰ９０ＡＡ１（図７Ｂ）遺伝子座およびＤＹＮＬＴ１（図７Ｃ）およびＨＳＰ９０ＡＡ１（図７Ｄ）に対するリコンビネーター対照なしでの異なる相同アーム長の絶対的ｍＫａｔｅノックイン効率のグラフである。
【図７－２】同上。
【００７０】
【図８】図８Ａ～８Ｅは、ＲＥＤＩＴｖ１系におけるｓｇＥＭＸ１（図８Ａ～図８Ｃ）またはｓｇＶＥＧＦＡ（図８Ｄ～図８Ｅ）に関連する上位３つの予測オフターゲット遺伝子座のインデル率のグラフである。
【００７１】
【図９－１】図９Ａは、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＲＥＤＩＴｖ２Ｎおよび対応するノックイン効率の選択実施形態の概略図である。図９Ｂおよび図９Ｃは、ＲＥＤＩＴｖ２ＮをＲＥＤＩＴｖ１と比較したゲノムワイドオフターゲット部位（ＯＴＳ）カウント（図９Ｂ）およびＯＴＳ染色体分布（図９Ｃ）のグラフである。図９Ｄは、ＲＥＤＩＴｖ２Ｄおよび対応するノックイン効率の選択実施形態の概略図である。図９Ｅは、血清飢餓条件下でのＲＥＤＩＴｖ１、ＲＥＤＩＴｖ２ＮおよびＲＥＤＩＴｖ２Ｄの編集効率のグラフである。図９Ｆは、ｈＥＳＣにおけるＲＥＤＩＴｖ３のノックイン効率である。図９Ｇは、ｈＥＳＣにおけるＲＥＤＩＴｖ３の使用におけるｍＫａｔｅノックインの画像である。
【図９－２】同上。
【図９－３】同上。
【図９－４】同上。
【図９－５】同上。
【００７２】
【図１０－１】図１０Ａおよび図１０Ｂは、ＤＹＮＬＴ１遺伝子座およびＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座におけるＲＥＤＩＴｖ２Ｎ（図１０Ａ）およびＲＥＤＩＴｖ２Ｄ（図１０Ｂ）の選択実施形態の相対的ｍＫａｔｅノックイン効率の概略図およびグラフである。
【図１０－２】同上。
【００７３】
【図１１】図１１Ａ～図１１Ｄは、選択されたＲＥＤＩＴｖ２Ｎ系についてのＤＹＮＬＴ１遺伝子座およびＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座におけるｍＫａｔｅノックインのジャンクションＰＣＲを示すアガロースゲルの画像である。図１１Ｅは、ＤＹＮＬＴ１遺伝子座におけるジャンクションＰＣＲ産物のクロマトグラム配列である。
【００７４】
【図１２－１】図１２Ａおよび１２Ｂは、ＲＥＤＩＴｖ２（図１２Ａ）およびＲＥＤＩＴｖ２Ｎ（図１２Ｂ）の選択実施形態の検出されたオフターゲット切断のゲノム分布のグラフである。パイルアップは、互いに重なり合う２またはそれを超えるリードを有するアライメントを含む。隣接する対は、互いの上流２００ｂｐ以内の反対鎖に現れるアライメントを含む。一致する標的は、上流配列中の処置された標的に一致するアライメント（ＰＡＭにおける１個のミスマッチを含む最大６個のミスマッチが標的配列において許容される）を含む。図１２Ｃは、ＲＥＤＩＴｖ２Ｎ系についてのＥＭＸ１遺伝子座でのＨＴＳ　ＨＤＲおよびインデルリードのグラフである。
【図１２－２】同上。
【図１２－３】同上。
【００７５】
【図１３－１】図１３Ａは、ＲＥＤＩＴｖ２Ｄ系に対するＤＹＮＬＴ１遺伝子座におけるｍＫａｔｅノックインのジャンクションＰＣＲを示すアガロースゲルの画像である。図１３Ｂは、ＤＹＮＬＴ１遺伝子座におけるジャンクションＰＣＲ産物のクロマトグラム配列である。
【図１３－２】同上。

【００７６】
【図１４】図１４Ａ～１４Ｃは、異なるＦＢＳ濃度で処置した場合の、ＲＥＤＩＴｖ２（図１４Ａ）、ＲＥＤＩＴｖ２Ｎ（図１４Ｂ）およびＲＥＶＩＴｖ２Ｄ（図１４Ｃ）におけるＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座でのｍＫａｔｅノックイン効率のグラフである。図１４Ａ～１４Ｃは、異なる血清ＦＢＳ濃度で処置した場合の、ＲＥＤＩＴｖ２（図１４Ｄ）、ＲＥＤＩＴｖ２Ｎ（図１４Ｅ）およびＲＥＶＩＴｖ２Ｄ（図１４Ｆ）におけるＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座でのｍＫａｔｅノックイン効率のグラフである。
【００７７】
【図１５】図１５は、ＲＥＤＩＴｖ１系へのＥＧＦＰ融合後のＲｅｃＥ＿５８７およびＲｅｃＴの核局在化の画像である。核をＮｕｃＢｌｕｅ　Ｌｉｖｅ　Ｒｅａｄｙ　Ｐｒｏｂｅｓ　Ｒｅａｇｅｎｔで染色した。
【００７８】
【図１６－１】図１６Ａおよび図１６Ｂは、ＲｅｃＴおよびＲｅｃＥ＿５８７のＮ末端またはＣ末端のいずれかへの異なる核局在化配列の融合後のＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座およびＤＹＮＬＴ１遺伝子座における相対的ｍＫａｔｅノックイン効率である。図１６Ｃおよび図１６Ｄは、ＤＹＮＬＴ１遺伝子座（図１６Ｃ）およびＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座（図１６Ｄ）についての図１６Ａおよび図１６Ｂからのコンストラクトの絶対的ｍＫａｔｅノックイン効率のグラフである。
【図１６－２】同上。
【図１６－３】同上。
【図１６－４】同上。
【００７９】
【図１７－１】図１７Ａ～図１７Ｄは、融合新規ＮＬＳ配列ならびにＲＥＤＩＴｖ２およびＲＥＤＩＴｖ３バリアントに対する最適リンカー後のＤＹＮＬＴ１遺伝子座（図１７Ａおよび１７Ｃ）およびＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座（図１７Ｂおよび１７Ｄ）についての相対的（図１７Ａおよび１７Ｂ）および絶対的（図１７Ｃおよび図１７Ｄ）ｍＫａｔｅノックイン効率のグラフである。ＲＥＤＩＴｖ２Ｎ（Ｄ１０ＡまたはＨ８４０Ａ）およびＲＥＤＩＴｖ２Ｄ（ｄＣａｓ９）を使用するＲＥＤＩＴｖ２バージョンは、使用されるガイドの数と共に水平軸に示される。異なる色は、異なる対照群およびＲＥＤＩＴバージョンを表す。
【図１７－２】同上。
【００８０】
【図１８】図１８は、ｈＥＳ－Ｈ９細胞におけるＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座でのＲＥＤＩＴｖ３Ｎ系の相対的編集効率のグラフである。
【００８１】
【図１９－１】図１９Ａは、例示的なｓａＣａｓ９発現ベクターの図である。図１９Ｂ～１９Ｄは、ｓａＣａｓ９系における異なるエフェクターのＡＡＶＳ１遺伝子座（図１９Ｂ）およびＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座（図１９Ｄ）における相対的ｍＫａｔｅノックイン効率およびそれぞれの絶対的効率（それぞれ図１９Ｄおよび図１９Ｅ）のグラフである。ＮＣ、切断対照群なし。ＮＲ、リコンビネーター対照群なし。
【図１９－２】同上。
【００８２】
【図２０－１】図２０Ａは、ＲｅｃＴ短縮化（ｔｒｕｎｃａｔｉｏｎ）の概略図である。図２０Ｂおよび図２０Ｃは、シングルおよびダブルニッキングを伴う野生型Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９およびＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９ｎ（Ｄ１０Ａ）についてのＤＹＮＬＴ１遺伝子座における相対的ｍＫａｔｅノックイン効率のグラフである。
【図２０－２】同上。
【００８３】
【図２１－１】図２１Ａは、ＲｅｃＥ＿５８７短縮化の概略図である。図２１Ｂおよび図

２１Ｃは、シングルおよびダブルニッキングを伴う野生型Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９およびＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９ｎ（Ｄ１０Ａ）についてのＤＹＮＬＴ１遺伝子座における相対的ｍＫａｔｅノックイン効率のグラフである。
【図２１－２】同上。
【００８４】
【図２２】図２２Ａおよび２２Ｂは、陰性対照としてＮＲ（リコンビネーターなし）を含む天然起源のリコンビニアリング系からの様々なエキソヌクレアーゼ（図２２Ａ）および一本鎖ＤＮＡアニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）（図２２Ｂ）を用いてリコンビニアリングに基づく編集を実行する効率の比較のグラフである。ゲノム遺伝子座（ＤＹＮＬＴ１およびＨＳＰ９０ＡＡ１）でのｍＫａｔｅノックインアッセイを使用して、遺伝子編集活性を測定した。示されたデータは、ヒトＨＥＫ２９３細胞を使用した成功したｍＫａｔｅノックインのパーセンテージであり、各実験は３連で実施した（ｎ＝３）。
【００８５】
【図２３－１】図２３Ａ～図２３Ｅは、ｂｏｘＢおよびＮ２２を使用するコンパクトな動員系を示す。ＲＥＤＩＴリコンビネータータンパク質をＮ２２ペプチドに融合させ、ｓｇＲＮＡ内には、Ｎ２２ペプチドの短い認識配列であるｂｏｘＢがあった（図２３Ａ）。図２３Ｂ～２３Ｅは、ＭＳ２－ＭＣＰ動員系と並べて比較した、野生型ＳｐＣａｓ９によるｍＫａｔｅノックインアッセイを使用した遺伝子編集効率のグラフである。図２３Ｂおよび２３Ｄは、ＤＹＮＬＴ１、ＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座における絶対的ｍＫａｔｅノックイン効率であり、図２３Ｃおよび２３Ｅは、相対的効率である。示されたデータは、ＨＥＫ２９３ヒト細胞を使用した成功したｍＫａｔｅノックインのパーセンテージであり、各実験は３連で実施した（ｎ＝３）。
【図２３－２】同上。
【図２３－３】同上。
【００８６】
【図２４－１】図２４Ａ～図２４Ｃは、ＳｕｎＴａｇ動員系を示す。ＲＥＤＩＴリコンビネータータンパク質をｓｃＦＶ抗体に融合し、ＧＣＮ４ペプチドをタンデム（リンカーによって分離された１０コピーのＧＣＮ４ペプチド）にＣａｓ９タンパク質に融合させた（図２４Ａ）。ＤＹＮＬＴ１遺伝子座を有するｍＫａｔｅノックイン実験（図２４Ｂ）を使用して、遺伝子編集ノックイン効率を測定した（図２４Ｃ）。全てのデータは、野生型ＳｐＣａｓ９によるｍＫａｔｅノックインアッセイを用いた遺伝子編集効率の測定値である。ＤＹＮＬＴ１での絶対的ｍＫａｔｅノックイン効率を各フローサイトメトリープロットの右下隅に示し、ここで、対照はリコンビネーターなし（ＮＲ）であり、これは陰性対照としてＧＦＰタンパク質に融合させたｓｃＦＶを含み、全ての実験はＨＥＫ２９３ヒト細胞で行った。
【図２４－２】同上。
【図２４－３】同上。
【００８７】
【図２５－１】図２５Ａおよび図２５Ｂは、Ｃａｓ１２Ａ系によるＲＥＤＩＴを例示する。２つの異なるＣｐｆ１／Ｃａｓ１２ａタンパク質について、ＳｕｎＴａｇ動員デザインを介したＣｐｆ１／Ｃａｓ１２ａに基づくＲＥＤＩＴ系を作製した（図２５Ａ）。ｍＫａｔｅノックインアッセイを使用して、２つの内因性遺伝子座（ＤＹＮＬＴ１およびＡＡＳ１）における効率を測定した（図２５Ｂ）。ＨＥＫ２９３ヒト細胞を使用してｍＫａｔｅ＋細胞パーセンテージによって測定された場合の絶対的ｍＫａｔｅノックイン効率が示されており、各実験は３連で実施し（ｎ＝３）、陰性対照はリコンビネーターなし（ＮＲ）である。
【図２５－２】同上。
【００８８】
【図２６－１】図２６Ａおよび２６Ｂは、ＤＹＮＬＴ１遺伝子座（図２６Ａ）およびＨＳ

Ｐ９０ＡＡ１遺伝子座（図２６Ｂ）におけるＲｅｃＥおよびＲｅｃＴ相同体を使用したｍＫａｔｅノックイン遺伝子編集アッセイを介した精密なリコンビニアリング活性の測定である。ＨＥＫ２９３ヒト細胞を使用してｍＫａｔｅ＋細胞パーセンテージによって測定された場合の絶対的ｍＫａｔｅノックイン効率が示されており、各実験は３連で実施し（ｎ＝３）、陰性対照はリコンビネーターなし（ＮＲ）および切断なし（ＮＣ）である。大腸菌由来のオリジナルのＲｅｃＥおよびＲｅｃＴも陽性対照として含めた。

【図２６－２】同上。

【００８９】

【図２７】図２７Ａおよび２７Ｂは、遺伝子編集のためのＣａｓ９－ｇＲＮＡ複合体へのＳＳＡＰ　ＲｅｃＴのＳｕｎＴａｇに基づく動員を示す概略図（図２７Ａ）およびＭＳ２に基づくストラテジーと比較したＳｕｎＴａｇの編集効率を定量するグラフ（図２７Ｂ）である。

【００９０】

【図２８】図２８Ａ～２８Ｃは、代替のＨＤＲ増強遺伝子編集アプローチとのＲＥＤＩＴの比較を示す。図２８Ａは、機能的ドメインＣｔＩＰまたはゲミニン（Ｇｅｍ）をＣａｓ９タンパク質に融合することによる（左）およびＲＥＤＩＴと組み合わせた場合（右）の代替ＨＤＲ増強アプローチを示す概略図である。図２８Ｂは、細胞周期制御を通じた代替の小分子ＨＤＲ増強アプローチである。示されているタイムライン（右）に従って、Ｇ２／Ｍ境界（左）で細胞を同期させるために、ノコダゾールを使用した。図２８Ｃは、ＲＥＤＩＴおよび代替ＨＤＲ増強ツール、Ｃａｓ９－ＨＥ（ＣｔＩＰ融合）、Ｃａｓ９－Ｇｅｍ（ゲミニン融合）およびノコダゾール（ｎｏｃ）ならびにＲＥＤＩＴとこれらの方法との組み合わせ（Ｃａｓ９－ＨＥ／Ｃａｓ９－Ｇｅｍ／ｎｏｃ＋ＲＥＤＩＴ）を使用した遺伝子編集効率の比較である。ドナーＤＮＡは、ＨＡの、２００＋４００ｂｐ（ＤＹＮＬＴ１）または２００＋２００ｂｐ（ＨＳＰ９０ＡＡ１）を有する。全てのアッセイは、ドナーなし、ＮＴＣおよびＣａｓ９（増強なし）対照で行った。＃Ｐ＜０．０５、ＲＥＤＩＴと比較；＃＃Ｐ＜０．０１、ＲＥＤＩＴと比較。

【００９１】

【図２９－１】図２９Ａ～２９Ｄは、鋳型デザインのガイドライン、連結精度およびＲＥＤＩＴ遺伝子編集法の能力を示す。図２９Ａは、ＲＥＤＩＴおよびＣａｓ９参照を使用して、ＨＤＲドナー（より長いＨＡ）またはＮＨＥＪ／ＭＭＥＪドナー（ゼロ／より短いＨＡ）の異なる鋳型デザインを比較した相同アーム（ＨＡ）長さ試験のグラフである。上および下は、ｍＫａｔｅノックインアッセイを用いて試験した２つのゲノム遺伝子座である。図２９Ｂは、ノックインクローンの単離、その後の鋳型増幅を回避するためにドナー外で結合するプライマー（ｆｗｄ、ｒｅｖ）を使用したゲノムＰＣＲによる例示的な接合部プロファイリングアッセイのデザインである。ＰＣＲ産物のペアードサンガーシーケンシングにより、５’－および３’－接合部における相同編集および非相同編集が明らかになる。図２９Ｃは、図２９Ｂのようなノックインクローンのサンガーシーケンシングからの示された連結プロファイルを有するコロニーのパーセンテージのグラフである。編集方法およびドナーＤＮＡを下に列挙する（ＨＡ長は括弧内に示す）。図２９Ｄは、Ｃａｓ９を用いるＲＥＤＩＴ法を検証するための、二重ＧＦＰ／ｍＫａｔｅタグを挿入するために２ｋｂのカセットを使用したノックイン効率のグラフである。ドナーＤＮＡのＨＡ長は下に示す。

【図２９－２】同上。

【００９２】

【図３０－１】図３０Ａ～図３０Ｃ（図６Ｃ～６Ｅ）は、ＲＥＤＩＴが、不要な編集事象がより少ないキロ塩基長の配列を挿入する能力を有する効率的な方法であることを示すＧＩＳｓｅｑの結果を示す。図３０Ａは、ノックインカセットのゲノムワイド挿入部位を測定するためのＧＩＳ－ｓｅｑに対するデザイン、手順および分析段階を示す概略図である。ドナーＤＮＡからの潜在的な混入を除去するために、高分子量（ＨＭＷ）ゲノムＤＮＡ精製が必要であった。ドナーＤＮＡは、各側に２００ｂｐのＨＡを有していた。図３０Ｂ

は、オンターゲット遺伝子座ＤＹＮＬＴ１におけるプラス／マイナスリードを示す代表的なＧＩＳ－ｓｅｑ結果である。最後のエクソンの終止コドンの前の予想される２Ａ－ｍＫａｔｅノックイン部位は、トリミングされたリード（２Ａ－ｍＫａｔｅカセットを除去するためにクリップされたリード）の中心である。鋳型変異は、ｇＲＮＡ標的化を回避し、標識されるゲノムリードと編集されたリードとを区別するのに役立つ。図３０Ｃは、Ｃａｓ９ｄｎ群およびＲＥＤＩＴｄｎ群を比較した、上位のＧＩＳ－ｓｅｑ挿入部位の概略であり、ＲＥＤＩＴｄｎを使用した場合に予想されるオンターゲット挿入部位（強調表示）および識別されたオフターゲット挿入部位の減少数を示す。フィルタリングおよびトリミングされたＧＩＳ－ｓｅｑリードの分布から計算された、ＭＬＥを伴う、（左）ＤＹＮＬＴ１および（右）ＡＣＴＢ遺伝子座。

【図３０－２】同上。

【００９３】

【図３１－１】図３１Ａ～３１Ｆは、内因性ＤＮＡ修復に対するＲＥＤＩＴ遺伝子編集の依存性およびヒト幹細胞操作のためのＲＥＤＩＴ法の適用を示す。図３１Ａは、遺伝子編集のためにＲＥＤＩＴまたはＣａｓ９を使用するときに関与する編集プロセスおよび主要な修復経路を示すモデルであり、ＨＤＲ経路は化学的撹乱（ＲＡＤ５１の阻害）に対して強調される。２００＋２００ｂｐのＨＡを有するドナーＤＮＡを全ての阻害剤実験に使用する。図３１Ｂおよび図３１Ｃは、ｗｔＣａｓ９に基づくＲＥＤＩＴおよびＣａｓ９（図３１Ｂ）およびＣａｓ９ニッカーゼに基づくＲＥＤＩＴｄｎおよびＣａｓ９ｄｎ（図３１Ｃ）に対する、ＲＡＤ５１阻害剤Ｂ０２およびＲＩ－１で処置した、またはビヒクル処置したＣａｓ９参照と比較したＲＥＤＩＴツールの相対的ノックイン効率を示すグラフである。２つのゲノム遺伝子座（ＤＹＮＬＴ１およびＨＳＰ９０ＡＡ１）における１ｋｂノックインアッセイで、全ての条件を測定した。図３１Ｄは、対応するＣａｓ９およびＣａｓ９ｄｎ参照と比較した、３つのゲノム遺伝子座にわたって試験されたＲＥＤＩＴおよびＲＥＤＩＴｄｎを使用したｈＥＳＣ（Ｈ９）におけるノックイン効率のグラフである。図３１Ｅおよび図３１Ｆは、Ｃａｓ９、Ｃａｓ９ｄｎおよびＮＴＣ対照とともにＲＥＤＩＴ、ＲＥＤＩＴｄｎを使用したｈＥＳＣのｍＫａｔｅノックインの結果のフローサイトメトリープロットである。ｈＥＳＣ実験におけるドナーＤＮＡは、試験した全ての遺伝子座にわたって２００＋２００ｂｐのＨＡを有する。

【図３１－２】同上。

【図３１－３】同上。

【００９４】

【図３２－１】図３２Ａ～３２Ｂは、ｄＣａｓ９　ＲＥＤＩＴに対する化学的撹乱を示す。細胞周期阻害剤（Ｔｈｙ、二重チミジン）ブロッキングあり（図３２Ａ）およびなし（図３２Ｂ）で、哺乳動物ＤＮＡ修復経路阻害剤（ミリン（Ｍｉｒｉｎ）、ＲＩ－１およびＢ０２）で処置したときの遺伝子編集効率を決定した。統計分析は、２段階ステップアップ法を介した１％ＦＤＲでのｔ検定の結果からのものである。

【図３２－２】同上。

【００９５】

【図３３－１】図３３Ａおよび３３Ｂは、それぞれマウスのＤＮＡ成分（遺伝子編集ベクターおよび鋳型ＤＮＡ）および尾静脈注射の概略図である。

【図３３－２】同上。

【００９６】

【図３４－１】図３４Ａ～３４Ｃは、遺伝子編集ベクターを用いたマウスの尾静脈注射の結果である。図３４Ａは、注射されたマウス由来の肝細胞のＰＣＲ分析の概略図およびゲル電気泳動である。図３４Ｂは、ＰＣＲアンプリコンのサンガー配列決定の結果である。図３４Ｃは、次世代シーケンシングの概略図およびノックイン接合部エラーの定量のグラフである。

【図３４－２】同上。

【図３４－３】同上。

【００９７】
【図３５－１】図３５Ａおよび３５Ｂは、それぞれＤＮＡ成分（遺伝子編集および対照ベクター）およびアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）処置の概略図である。図３５Ｃは、ＡＡＶ処置マウスからの肺の蛍光画像および腫瘍数の対応する定量のグラフである。
【図３５－２】同上。
【図３５－３】同上。
【００９８】
【図３６】図３６Ａ～図３６Ｃは、大腸菌ＲｅｃＴ（ＥｃＲｅｃＴ）単独（図３６Ａ）および一本鎖ＤＮＡが結合したもの（図３６Ｂ、３６Ｃ）の予測構造を示す。
【００９９】
【図３７－１】図３７Ａ～図３７Ｂは、ＥｃＲｅｃＴ　ＳＳＡＰアミノ酸とｓｓＤＮＡとの予測される相互作用を示す。
【図３７－２】同上。
【０１００】
【図３８－１】図３８Ａ～図３８Ｆは、微生物ＳＳＡＰのマイニングによるｄＣａｓ９遺伝子エディタの開発を示す。（図３８Ａ）一本鎖アニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）によるｄＣａｓ９エディタの概略モデル。（図３８Ｂ）遺伝子編集効率を測定するためのゲノムノックインアッセイの設計（左）；ＳＳＡＰスクリーニング実験のワークフロー（右）。（図３８Ｃ）８００ｂｐ導入遺伝子を有する２Ａ－ｍＫａｔｅノックインアッセイを使用してＳＳＡＰの遺伝子編集効率をスクリーニングするための構築物設計。（図３８Ｄ）３つのＳＳＡＰ：ラムダファージ由来のＢｅｔタンパク質（ＬＢｅｔ）、Ｒａｃプロファージ由来のＲｅｃＴタンパク質（ＲａｃＲｅｃＴ）、およびＴ７ファージ由来のｇｐ２．５（Ｔ７ｇｐ２．５）の初期スクリーニングの結果。（図３８Ｅ）メタゲノムホモログマイニングおよびノックインアッセイによるＲｅｃＴ様ＳＳＡＰ候補のスクリーニング。最も活性な候補は、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰとラベル付けされる。ＮＴＣ：非標的対照。相同アーム（ＨＡ）の長さ：ＤＹＮＬＴ１、２００＋２００ｂｐ；ＨＳＰ９０ＡＡ１、２００＋４００ｂｐ；ＡＣＴＢ、２００＋４００ｂｐで、ドナーなし対照を除く全ての群にドナー鋳型を添加した。（図３８Ｆ）ＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＤＹＮＬＴ１（左）およびＨＳＰ９０ＡＡ１（右）遺伝子座で異なるＨＡ長を有する３種類のドナー設計を用いて遺伝子編集効率を測定する。この図および以下の図における全ての結果は、特に明記しない限り、平均の標準誤差（Ｓ．Ｅ．Ｍ．）を表すエラーバーを有するレプリケート実験（ｎ＝３）からのものである。
【図３８－２】同上。
【図３８－３】同上。
【図３８－４】同上。
【図３８－５】同上。
【０１０１】
【図３９－１】図３９Ａ～図３９Ｈは、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰのオンターゲットおよびオフターゲット編集エラーを示す。（図３９Ａ）内因性標的においてｄＣａｓ９－ＳＳＡＰおよびＣａｓ９参照を使用する場合の、インデル形成のレベルを測定するためのディープシーケンシング。使用されるドナー鋳型は、２００ｂｐ－ＨＡ　ＨＤＲ鋳型である。方法に記載のアッセイの詳細。（図３９Ｂ）異なるＨＤＲドナーおよびＭＭＥＪドナーを有するｄＣａｓ９－ＳＳＡＰおよびＣａｓ９参照を使用してノックイン編集の精度を分析するためのクローナルサンガーシーケンシング。使用したドナー鋳型は、２００ｂｐ－ＨＡ　ＨＤＲ鋳型および２５ｂｐ－ＨＡ　ＭＭＥＪ鋳型である（方法と補足）。（図３９Ｃ～図３９Ｅ）偏りのないシーケンシングを用いたノックインカセットの挿入部位のゲノムワイド検出、（図３９Ｃ）ワークフローの表示、（図３９Ｄ）ノックインゲノム部位にアライメントされた代表的なリード、および（ｅ）検出されたオンターゲットおよびオフターゲット挿入部位の要約。（図３９Ｆ～図３９Ｇ）編集後の生細胞のパーセンテージによって定義される細胞適合性効果を測定するためのワークフローおよび結果（模擬対照に対して

正規化）。（図３９Ｈ）Ｃａｓ９　ＨＤＲおよびＣａｓ９　ＭＭＥＪ法と比較した、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタのノックイン精度の要約分析。精度は、編集された全ての結果（正しいノックイン、インデルを有するノックイン、およびＮＨＥＪインデル）内の正しいノックインの全体的な収率（％）として定義される。
【図３９－２】同上。
【図３９－３】同上。
【図３９－４】同上。
【０１０２】
【図４０－１】図４０Ａ～図４０Ｇは、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタの検証、ならびにＣａｓ９参照および他のＨＤＲ増強方法との比較を示す。（図４０Ａ）ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰならびに他の代替Ｃａｓ９、ｎＣａｓ９およびＨＤＲ増強ツールを使用した効率の比較。Ｃａｓ９－ＨＥ（ＣｔＩＰ融合Ｃａｓ９）、およびＣａｓ９－Ｇｅｍ（ゲミニン融合Ｃａｓ９）、ｎＣａｓ９（Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａニッカーゼ参照）、およびｎＣａｓ９－ｈＲＡＤ５１（改良Ｃａｓ９ニッカーゼエディタ）。ドナー鋳型は、図１と同じである。（図４０Ｂ）ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタを使用した内因性ゲノム遺伝子座におけるｍＫａｔｅノックインの画像化検証。（図４０Ｃ）異なる長さの導入遺伝子を有するノックインドナーの設計。（図４０Ｄ）ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタを使用した異なる導入遺伝子長に対するノックイン効率。ドナーＨＡの長さは、ＤＹＮＬＴ１については２００ｂｐ＋２００ｂｐ、ＨＳＰ９０ＡＡ１については２００ｂｐ＋４００ｂｐである。（図４０Ｅ）ＨＥＫ２９３Ｔ細胞における７つの内因性遺伝子座にわたるＣａｓ９参照と比較したｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタの性能。ＮＤ、ドナーなし対照；ＮＴ、非標的対照。（図４０Ｆ～図４０Ｇ）定量化されたＨＤＲ効率（図４０Ｆ）およびフローサイトメトリー分析（図４０Ｇ）を用いた、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタを使用したヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ、Ｈ９）におけるノックイン遺伝子編集。Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ、ＫｒｉｅｇｅｒおよびＹｅｋｕｔｉｅｌｉの２段階ステップアップ法による１％の偽発見率（ＦＤＲ）で、全てのゲノム標的にわたって比較するために複数のｔ検定を使用して全ての統計分析を行う。
【図４０－２】同上。
【図４０－３】同上。
【図４０－４】同上。
【図４０－５】同上。
【図４０－６】同上。
【０１０３】
【図４１－１】図４１Ａ～図４１Ｄは、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタの編集機構をプローブするための化学的撹乱を示す。細胞周期同期化（ＤＴＢ、二重チミジン遮断）を用いずに（図４１Ａ、図４１Ｂ）、または用いて（図４１Ｃ、図４１Ｄ）、ＤＮＡ修復経路阻害剤（Ｍｉｒｉｎ、ＲＩ１およびＢ０２）で処理した場合のｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタの遺伝子編集効率。全てのドナー鋳型は、図３８と同じである。統計分析は、Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ、ＫｒｉｅｇｅｒおよびＹｅｋｕｔｉｅｌｉの２段階ステップアップ法による１％　ＦＤＲでのｔ検定結果からのものである。
【図４１－２】同上。
【０１０４】
【図４２－１】図４２Ａ～図４２Ｄは、簡便な送達のためのコンパクトなＣＲＩＳＰＲノックインツールとしてのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタの最小化を示す。（図４２Ａ）構造予測に基づいて短縮化ＥｃＲｅｃＴタンパク質を構築するためのＥｃＲｅｃＴ予測二次構造およびプライミング部位を示す概略図。（図４２Ｂ）様々な短縮化設計の相対的なノックイン効率。全ての群をＣａｓ９基準に対して正規化した（各標的に対して個別に）。（図４２Ｃ）ＨＥＫ２９３Ｔ細胞において元のおよび最小化されたｄＳａＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタを担持するＡＡＶ２ベクターのインビトロ送達を介したＡＡＶＳ１およびＨＳＰ９０ＡＡ１内因性標的におけるコンパクトなＳａＣａｓ９（左、縮尺通りに示されて

いない要素のサイズ）および（図４２Ｄ）ノックイン効率を用いたＡＡＶ構築物中のｄＳａＣａｓ９－ｍＳＳＡＰ系の概略図。
【図４２－２】同上。
【図４２－３】同上。
【０１０５】
【図４３－１】図４３Ａ～図４３Ｅは、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを使用したノックイン特異的ＰＣＲ産物のゲル電気泳動およびシーケンシングの検証を示す。（図４３Ａ）ＤＹＮＬＴ１遺伝子座でのノックイン特異的ジャンクションＰＣＲのアガロースゲル結果。（図４３Ｂ～図４３Ｅ）ＤＹＮＬＴ１遺伝子座でのノックイン実験からのゲノムジャンクションのサンガーシーケンシングクロマトグラム。全ての試料について、出願人は、ノックインを確認するために、ドナーＤＮＡの外側のジャンクションに及ぶプライマーを使用してゲノムＤＮＡの５’末端（図４３Ｂ、図４３Ｃ）および３’末端（図４３Ｄ、図４３Ｅ）を増幅した。
【図４３－２】同上。
【０１０６】
【図４４】図４４は、アノテーションされたタンパク質保存ドメインと共に、代表的なＲｅｃＴホモログの系統樹およびアミノ酸アライメントを示す。
【０１０７】
【図４５】図４５Ａ～図４５Ｂは、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタおよびＣａｓ９エディタを比較する短配列編集のディープシーケンシングを示す。（図４５Ａ）ＥＭＸ１での１６ｂｐ置換のドナー設計。（図４５Ｂ）ＥＭＸ１ゲノム遺伝子座でのディープシーケンシングを使用した、精度の高いＨＤＲおよびインデル編集結果の分析。１回目のＰＣＲは、シーケンシング結果が非標的対照（ドナーＤＮＡが細胞内に送達される場合）によって検証されるドナー鋳型混入を含まないことを確実にするために、ドナーの完全に外側のシーケンシングプライマーを使用した。
【０１０８】
【図４６】図４６Ａ～図４６Ｂは、ノックイン産物のサンガーシーケンシングで使用されるワークフロー（図４６Ａ）およびディープオンターゲットインデルアッセイで使用されるシーケンシング方法（図４６Ｂ）を示す概略図である。ここに記載されるアッセイは、図４１に対応する。ｇＰＣＲ、ゲノムＰＣＲ。配列Ｆ／配列Ｒは、ノックイン鋳型の上流／下流に結合するサンガーシーケンシングのためのプライマーである。
【０１０９】
【図４７－１】図４７Ａ～図４７Ｂは、ＤＹＮＬＴ１遺伝子座でのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ実験からのゲノムジャンクションのサンガーシーケンシングクロマトグラムを示す。赤色の枠の中の配列は、正確には修復されなかった。全ての試料について、ゲノムＤＮＡの５’末端（図４７Ａ）および３’末端（図４７Ｂ）をジャンクションに及ぶプライマーを使用して増幅して、ノックイン精度を確認した。使用されるゲノム結合プライマーは、混入を避けるためにドナーＤＮＡの完全に外側にある。
【図４７－２】同上。
【０１１０】
【図４８－１】図４８Ａ～図４８Ｂは、ＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座でのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ実験からのゲノムジャンクションのサンガーシーケンシングクロマトグラムを示す。全ての試料について、ゲノムＤＮＡの５’末端（図４８Ａ）および３’末端（図４８Ｂ）をジャンクションに及ぶプライマーを使用して増幅して、ノックイン精度を確認した。使用されるゲノム結合プライマーは、混入を避けるためにドナーＤＮＡの完全に外側にある。
【図４８－２】同上。
【０１１１】
【図４９】図４９Ａ～図４９Ｂは、ゲノムワイド挿入部位のマッピングおよび定量化を示す。（図４９Ａ）偏りのないゲノムワイド挿入部位マッピングプロセスのための全体的なワークフロー。オンターゲットおよびオフターゲット挿入部位は、参照ゲノムにアライメ

ントするリードから回収される（ｈｇ３８）。完全なプロトコルおよびデータ分析パイプラインは、方法に詳述されている。（図４９Ｂ）全てのアライメントされたリード（有効なＵＭＩを有する）をカウントするゲノムワイド挿入部位の定量化は、２つのゲノム遺伝子座（ＤＹＮＬＴ１およびＨＳＰ９０ＡＡ１）にわたって、Ｃａｓ９　ＨＤＲと比較してＣａｓ９－ＳＳＡＰを使用して挿入部位存在量の減少を示した。挿入部位の存在量は、ＲＰＫＵまたはＲｅａｄｓ　Ｐｅｒ　Ｔｈｏｕｓａｎｄ　ＵＭＩとして測定される。

【０１１２】

【図５０】図５０Ａ～図５０Ｂは、３つのゲノム標的（上に示す）にわたるシングルガイド（図５０Ａ）およびデュアルガイド（図５０Ｂ）設計を用いたｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタツールの試験を示す。使用したドナーＤＮＡは、８００ｂｐノックイン設計で図３ａに示したものと同じである。

【０１１３】

【図５１】図５１Ａ～図５１Ｃは、ＨｅｐＧ２細胞株（図５１Ａ）、ＨｅＬａ細胞株（図５１Ｂ）およびＵ２ＯＳ細胞株（図５１Ｃ）における３つのさらなる細胞株におけるｄＣａｓ９－ＳＳＡＰノックイン効率の検証を示す。ノックイン実験では、試験した全ての細胞株について、２Ａ－ｍＫａｔｅ導入遺伝子をコードする約８００ｂｐカセットを有する同様のドナーＤＮＡを使用した。

【０１１４】

【図５２】図５２Ａ～図５２Ｃは、ヒト幹細胞工学のためのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタを使用したフローサイトメトリー分析データの完全なセットを示す。非標的対照およびＣａｓ９（Ｃａｓ９　ＨＤＲ）参照と比較した、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを用いたヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ、Ｈ９）におけるＨＳＰ９０ＡＡ１（図５２Ａ）、ＡＣＴＢ（図５２Ｂ）、ＯＣＴ４（図５２Ｃ）内因性遺伝子座でのノックイン遺伝子編集のフローサイトメトリー分析。

【０１１５】

【図５３】図５３は、オンラインツール（ＣＦＳＳＰ、方法を参照）を使用して予測されたＲｅｃＴタンパク質二次構造を示す概略図である。予測結果（二次構造は上、アライメントは下に視覚化されている）は、短縮化された機能的ＲｅｃＴバリアントを開発するための基礎を形成した。

【０１１６】

【図５４－１】図５４Ａ～図５４Ｃは、効率的かつ耐久性のある遺伝子編集のためのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰの最適化を示す。（図５４Ａ）ＳＳＡＰ投与量最適化のためのノックイン効率。ドナーＨＡの長さは、ＤＹＮＬＴ１については約２００ｂｐであり、ＨＳＰ９０ＡＡ１については約３００ｂｐである。ｎ＝３の生物学的に独立した実験。（図５４Ｂ）ＳＳＡＰ投与量最適化およびドナーＨＡ伸長後のＨＥＫ２９３Ｔ細胞における７つの内因性遺伝子座にわたるＣａｓ９参照と比較したｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタの性能。ドナーＨＡ長は、ＤＹＮＬＴ１については約２００ｂｐ、ＨＳＰ９０ＡＡ１については６７３ｂｐ＋７５０ｂｐ、ＡＣＴＢについては５００ｂｐ＋８００ｂｐ、ＢＣＡＰ３１については６０８ｂｐ＋７４０ｂｐ、ＨＩＳＴ１Ｈ２ＢＫについては２１２ｂｐ＋４１３ｂｐ、ＣＬＴＡについては７０５ｂｐ＋６０２ｂｐ、ＲＡＢ１１Ａについては４６４ｂｐ＋４４０ｂｐである。全てのノックインドナーは、Ｎ末端を標的とするＣＬＴＡ／ＲＡＢ１１Ａドナーを除いて、内因性タンパク質のＣ末端を標的とする。ｎ＝３の生物学的に独立した実験。（図５４Ｃ）ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰノックイン後３日目の選別後のＨＳＰ９０ＡＡ１（左）およびＡＣＴＢ（右）での導入遺伝子発現の安定性。可変の選別効率は、異なる開始ｍＫａｔｅ＋率をもたらした（図５７）。ａおよびｂのエラーバーは、平均の標準誤差（ＳＥＭ）を表す。

【図５４－２】同上。

【０１１７】

【図５５－１】図５５Ａ～図５５Ｃは、ドナーＤＮＡのドナー投与量および相同アームの最適化を示す。（図５５Ａ）ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタを使用した場合のドナー投与

量最適化のためのＤＹＮＬＴ１、ＨＳＰ９０ＡＡ１、ＡＣＴＢ遺伝子座におけるゲノムｍＫａｔｅノックイン効率の定量化。非標的、非標的対照。ドナーＨＡの長さは、ＤＹＮＬＴ１については２００ｂｐ＋２００ｂｐ、ＨＳＰ９０ＡＡ１については２００ｂｐ＋４００ｂｐ、ＡＣＴＢについては２００ｂｐ＋４００ｂｐである。ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタを使用した場合のドナー相同アーム（ＨＡ）最適化のためのＨＳＰ９０ＡＡ１（図５５Ｂ）およびＡＣＴＢ（図５５Ｃ）遺伝子座におけるｍＫａｔｅノックイン効率の定量化。非標的、非標的対照。ドナーＨＡの長さは、ＨＳＰ９０ＡＡ１については２００ｂｐ＋２００ｂｐまたは６７３ｂｐ＋７５０ｂｐ、ＡＣＴＢについては２００ｂｐ＋４００ｂｐまたは５００ｂｐ＋８００ｂｐである。ｎ＝３の生物学的に独立した実験。この図の全ての結果は、反復実験からのものであり、平均の標準誤差（Ｓ．Ｅ．Ｍ．）を表すエラーバーを有する。

【図５５－２】同上。

【０１１８】

【図５６－１】図５６Ａ～図５６Ｄは、タンパク質機能アッセイによるｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタの検証を示す。（図５６Ａ）ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰによる機能的オンターゲット編集を検証するためのゲノムピューロマイシン／ブラストサイジン耐性－カセットノックインアッセイの設計。（図５６Ｂ）免疫ブロット法により、内在性タンパク質とのインフレーム融合を認識する抗Ｖ５抗体を用いて実施した、ＨＳＰ９０ＡＡ１およびＡＣＴＢ遺伝子座におけるオンターゲットｄＣａｓ９－ＳＳＡＰノックイン産物の存在およびサイズを確認する。示されるデータは、３回の生物学的に独立した実験を表す。（図５６Ｃ～図５６Ｄ）コロニー形成アッセイによるｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを用いたオンターゲットノックインの検証および定量化。細胞をノックイン耐性カセットによって選択し、次いで、ＣｒｙｓｔａｌＶｉｏｌｅｔ染色を使用して定量化した。スケールバー＝５００ｕｍ。ｎ＝４の生物学的に独立した実験。エラーバーは、平均の標準誤差（ＳＥＭ）を表す。

【図５６－２】同上。

【図５６－３】同上。

【０１１９】

【図５７－１】図５７Ａ～図５７Ｅは、オンターゲット編集の安定性の検証を示す。（図５７Ａ）ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタを使用して編集結果の安定性を評価するための長期経時変化実験のワークフロー。（図５７Ｂ）ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰおよびドナーＤＮＡの送達後の異なる時点でのＨＳＰ９０ＡＡ１、ＡＣＴＢ内因性遺伝子座におけるノックイン遺伝子編集のフローサイトメトリー分析。（図５７Ｃ～５７Ｄ）ＨＳＰ９０ＡＡ１およびＡＣＴＢ遺伝子座におけるオンターゲットピューロマイシンノックインの代表的なクリスタルバイオレット染色画像。スケールバー＝５００ｕｍ。アッセイを３回行い、同様の結果を得た。（図５７Ｅ）バルクＲＮＡ－ｓｅｑ分析によるＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＨＳＰ９０ＡＡ１およびＡＣＴＢ遺伝子発現レベルの定量化であり、有意により高いレベルのＨＳＰ９０ＡＡ１発現を実証している。これは、ＡＣＴＢ群と比較してＨＳＰ９０ＡＡ１群においてより良好な細胞生存をもたらした。２つの生物学的に独立した実験からのデータを提示する。

【図５７－２】同上。

【図５７－３】同上。

【０１２０】

【図５８】図５８は、不活性化ガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）によるＳＳＡＰ＋Ｃａｓ９媒介ノックイン編集を示す。ＳＳＡＰ＋Ｃａｓ９は、ＲｅｃＴおよびｗｔＣａｓ９を含む。ｍＫａｔｅノックインは、ＤＹＮＬＴ１、ＨＳＰ９０ＡＡ１およびＡＣＴＢに示されている。

【０１２１】

【図５９】図５９は、ヒトＨＥＫ２９３Ｔ細胞またはヒト肝細胞におけるヒトアルブミン（ＡＬＢ）遺伝子座（上）またはＡＡＶＳ１遺伝子座（下）でのルシフェラーゼを発現するまたはｍＫａｔｅを発現する６００ｂｐ導入遺伝子のｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ媒介性ノッ

クインを示す。アルブミン遺伝子座における導入遺伝子ノックインは、肝細胞において高度に発現されたが、ＨＥＫ２９３Ｔでは発現されなかった（上）。ＡＡＶＳ１遺伝子座における導入遺伝子ノックインは、ＨＥＫ２９３Ｔにおいて高度に発現されたが、肝細胞では発現されなかった（下）。

【０１２２】

【図６０】図６０は、ヒトＨＥＫ２９３Ｔ細胞またはヒト肝細胞におけるヒトアルブミン（ＡＬＢ）遺伝子座（上）またはＡＡＶＳ１遺伝子座（下）でのルシフェラーゼを発現するまたはｍＫａｔｅを発現する８００ｂｐ導入遺伝子のｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ媒介性ノックインを示す。アルブミン遺伝子座における導入遺伝子ノックインは、肝細胞において高度に発現されたが、ＨＥＫ２９３Ｔでは発現されなかった（上）。ＡＡＶＳ１遺伝子座における導入遺伝子ノックインは、ＨＥＫ２９３Ｔにおいて高度に発現されたが、肝細胞では発現されなかった（下）。

【０１２３】

【図６１】図６１は、Ｋ５６２細胞における８００ｂｐのｍＫａｔｅをコードする導入遺伝子を含むＲＮＰのエレクトロポレーションを示す。細胞に、ＲｅｃＴありおよびなしで、ガイドＲＮＡ、二本鎖８００ｂｐのｍＫａｔｅ導入遺伝子と複合体化した精製Ｃａｓ９またはｄＣａｓ９タンパク質を含むＲＮＰをエレクトロポレーションした。ノックインは、ＨＳＰ９０ＡＡ１（左）遺伝子座またはＨＩＳＴ１Ｈ２ＢＫ（右）遺伝子座であった。

【０１２４】

【図６２】図６２は、ＧＦＰ発現導入遺伝子をノックインするための、マウス初代造血幹細胞（ＨＳＣ）およびＡＡＶ６への、ＳＳＡＰを伴うまたは伴わない、Ｃａｓ９またはｄＣＡＳ９を含むＲＮＰの送達を示す。

【０１２５】

【図６３】図６３は、導入遺伝子発現を示す。

【０１２６】

【図６４－１】図６４Ａ～図６４Ｂは、ＣＲＩＳＰＲ成分を含まないＲループ形成ガイドを用いた導入遺伝子のＳＳＡＰ媒介性ノックインを示す。（図６４Ａ）ＳＳＡＰとＲ－ループ－ｇＲＮＡのＭＣＰ－ＭＳ２アプタマー対合を示すガイドＲＮＡ－ＳＳＡＰ媒介遺伝子編集のモデル。（図６４Ｂ）ガイドＲＮＡ、ｄｓＤＮＡドナーおよびＳＳＡＰを発現するためのベクター／プラスミド設計。（図６４Ｃ）ｍＣｈｅｒｒｙ発現サブセットの同定を示す未処理ＦＡＣＳプロット。（図６４Ｄ）ＲｅｃＴありおよびなしで様々なガイド長（１８ｎｔ、２０ｎｔ、２５ｎｔ）を使用したＡＣＴＢ遺伝子座での導入遺伝子ノックイン。

【図６４－２】同上。

【図６４－３】同上。

【０１２７】

【図６５】図６５Ａ～図６５Ｂは、Ｒループガイド ＲＮＡ設計を示す。Ｒ－ループ－ガイドＲＮＡは、ガイド－足場および足場－ガイド構成（例えば、足場の５’末端または３’末端にあるガイド）で示される２つの成分である、ガイドおよび足場を含む。ガイド配列は、標的ＤＮＡとマッチするように設計される。限定されないが、ＭＳ２、ＰＰ７、およびＢｏｘＢを含む１またはそれを超えるアプタマーを組み込むことができる。ＭＳ２を示す。

【０１２８】

【図６６】図６６は、ＭＳ２／ＰＰ７－アプタマーを含むキメラガイドＲＮＡを示す。

【０１２９】

【図６７】図６７は、Ｒ－ループ－ＳＳＡＰ（ＣＲＩＳＰＲなし）、Ｃａｓ９　ＨＤＲ、およびｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを比較したＡＣＴＢ遺伝子座でのノックイン効率に対する様々なガイド長の効果を示す。ドナーのみがｍＫａｔｅノックインドナーのみを含んでいた。

【０１３０】

【図６８】図６８は、Ｒ－ループ－ＳＳＡＰ（ＣＲＩＳＰＲなし）、Ｃａｓ９　ＨＤＲ、およびｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを比較したＨＩＳＴ遺伝子座でのノックイン効率に対する様々なガイド長の効果を示す。ドナーのみがｍＫａｔｅノックインドナーのみを含んでいた。

【０１３１】

【図６９】図６９は、Ｒ－ループ－ＳＳＡＰ（ＣＲＩＳＰＲなし）、Ｃａｓ９　ＨＤＲ、およびｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを比較したＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座でのノックイン効率に対する様々なガイド長の効果を示す。ドナーのみがｍＫａｔｅノックインドナーのみを含んでいた。

【０１３２】

【図７０】図７０は、ヒトＨＥＫ２９３Ｔ細胞またはヒト肝細胞におけるヒトアルブミン（ＡＬＢ）遺伝子座（上）またはＡＡＶＳ１遺伝子座（下）でのルシフェラーゼを発現するまたはｍＫａｔｅを発現する６００ｂｐ導入遺伝子のＲ－ループ－ＳＳＡＰ媒介性ノックインを示す。アルブミン遺伝子座における導入遺伝子ノックインは、肝細胞において高度に発現されたが、ＨＥＫ２９３Ｔでは発現されなかった（上）。ＡＡＶＳ１遺伝子座における導入遺伝子ノックインは、ＨＥＫ２９３Ｔにおいて高度に発現されたが、肝細胞では発現されなかった（下）。

【０１３３】

【図７１】図７１は、ヒトＨＥＫ２９３Ｔ細胞またはヒト肝細胞におけるヒトアルブミン（ＡＬＢ）遺伝子座（上）またはＡＡＶＳ１遺伝子座（下）でのルシフェラーゼを発現するまたはｍＫａｔｅを発現する８００ｂｐ導入遺伝子のＲ－ループ－ＳＳＡＰ媒介性ノックインを示す。アルブミン遺伝子座における導入遺伝子ノックインは、肝細胞において高度に発現されたが、ＨＥＫ２９３Ｔでは発現されなかった（上）。ＡＡＶＳ１遺伝子座における導入遺伝子ノックインは、ＨＥＫ２９３Ｔにおいて高度に発現されたが、肝細胞では発現されなかった（下）。

【０１３４】

【図７２】図７２は、逆転写酵素を用いないＲＮＡ媒介ＳＳＡＰ編集（上）と逆転写酵素を用いたＲＮＡ媒介ＳＳＡＰ編集（下）とを比較する概略図を示す。図示のＲＮＡ鋳型／ドナーは、１つのＨＡを有する相同アーム（ＨＡ）領域を含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ鋳型／ドナーは、各末端に１つずつ、２つのＨＡ領域を含む。ＨＡは、編集部位の隣のゲノム領域と一致するので、ＳＳＡＰは編集を促進することができる。

【０１３５】

【図７３】図７３は、インビトロ転写（ＩＶＴ）ＲＮＡ鋳型を使用してヒトＥＭＸ遺伝子座に挿入された４ｂｐ配列の挿入率を示す。系の成分は、１．ヒトＥＭＸ１を標的とするｇＥ３またはｓｇ２またはｓｇＨＥ　ＳｐＣａｓ９ガイドＲＮＡ；２．ｇＥ３／ｓｇ２／ｓｇＨＥ付近の領域に結合するｄｇ３不活性／不活性化ガイドＲＮＡのｄｇ２；および３．１００／２００ＨＡ：両端で４ｂｐ編集に隣接する１００ｂｐまたは２００ｂｐのＨＡ領域である。

【０１３６】

【図７４】図７４は、ヒトＥＭＸ１において１６ｂｐ配列を置換する（１６ｂｐ編集を導入する）ために使用されるセンス配向またはアンチセンス配向のＵ６発現ＲＮＡ鋳型を示す。系の成分は、１．ヒトＥＭＸ１を標的とするＳｐＣａｓ９ガイドＲＮＡ；２．領域に結合する不活性／不活性化ガイドＲＮＡを含む。ゲルの各レーンの上部の数字は、両端の編集の隣の相同アーム（ＨＡ）領域の長さを示す。

【０１３７】

【図７５】図７５は、ヒトＥＭＸ１において１６ｂｐ配列を置換する（１６ｂｐ編集を導入する）ために使用されるセンス配向またはアンチセンス配向のＵ６発現ＲＮＡ鋳型の投与量関係を示す。系の成分は、１．ヒトＥＭＸ１を標的とするＳｐＣａｓ９ガイドＲＮＡ；２．領域に結合する不活性／不活性化ガイドＲＮＡを含む。

【０１３８】

【図７６】図７６は、ヒトＡＡＶＳ１遺伝子座（図７６Ａ）に挿入された本発明の系および欠損Ｖｅｎｕｓ（緑色蛍光タンパク質）遺伝子座（図７６Ｂ）の修復を示す。
【０１３９】
【図７７】図７７は、ｓｇＲＮＡ＋ｄｇＲＮＡ系の概略図（上）およびＴＬＲ遺伝子座に基づく例（下）を示す。ＳｐＣａｓ９ガイド＿２０ｂｐ　ｓｇＲＮＡ：第１のガイドＲＮＡで使用されるＴＬＲを標的とするｓｇＲＮＡ用の２０ｂｐガイド。ＳａＣａｓ９ガイド設計も示されている。ｄｇ１－ｄｇ６：動員のためにアプタマーを含む第２のガイドＲＮＡで使用される、ＴＬＲを標的とするｄｇＲＮＡ中の異なる１５ｂｐ／１６ｂｐの不活性／不活性化ガイド。
【０１４０】
【図７８－１】図７８は、Ｖｅｎｕｓタンパク質の修復を示すＧＦＰ（緑色）チャネルで達成されるシグナルを含むｓｇＲＮＡ＋ｄｇＲＮＡ系の実証を示す。ｐＡ１９は、Ｃａｓ９、およびＴＬＲ遺伝子編集レポーターゲノム領域を標的とする２つのガイドであるｓｇ３１８／ｓｇ５３０を有するガイドＲＮＡをコードする。ＢＢは主鎖であり、陰性対照として働く。Ｄｇ５３２／５３４／５３６／５３８は、ＭＳ２／ＰＰ７アプタマーを含む異なる不活性ガイドＲＮＡである。赤色ボックスは、ＲＮＡの３’末端にＶｅｎｕｓのためのＲＮＡ修復鋳型／ドナーを有する設計が最もよく機能することを示す。
【図７８－２】同上。
【図７８－３】同上。
【図７８－４】同上。
【図７８－５】同上。
【０１４１】
【図７９】図７９は、ＲＮＡ鋳型／ドナーとｄｇＲＮＡとの直接融合を伴うｓｇＲＮＡ＋ｄｇＲＮＡ系の概略図を示す。特定の実施形態では、ｓｇＲＮＡおよびｄｇＲＮＡの一方または両方は、環状ＲＮＡ（例えば、ＲＮＡの５’末端と３’末端が共有結合している構成）であり得る。環状ＲＮＡは、安定性および効率を高めることができる。
【０１４２】
【図８０－１】図８０は、ｄｇＲＮＡをＲＮＡ鋳型ドナーおよびＳＳＡＰに融合した系の実証を示す。ボックスは、対照よりも有意に高いＶｅｎｕｓの修復を強調している。
【図８０－２】同上。
【図８０－３】同上。
【０１４３】
【図８１－１】図８１は、ｐｏｌ２（ＣＭＶ）対ｐｏｌ３（Ｕ６）プロモータＴＬＲゲノム編集の試験を示す。
【図８１－２】同上。
【０１４４】
【図８２】図８２は、ＥＭＸ１遺伝子座に基づくｓｇＲＮＡ＋ｄｇＲＮＡ系の例を示す。ｇＥ３：第１のガイドＲＮＡで使用される、ＥＭＸ１を標的とするｓｇＲＮＡのための２０ｂｐガイド；融合ＲＮＡ鋳型／ドナーを有する第２のガイドＲＮＡで使用される、ｄｇ１－ｄｇ８（ＥＭＸ１を標的とするｄｇＲＮＡ中の１５ｂｐ／１６ｂｐの不活性／不活性化ガイド。
【０１４５】
【図８３】図８３は、ヒトＥＭＸ部位に標的化される融合ＲＮＡ鋳型ドナーおよびＳＳＡＰを有するｄｇＲＮＡを示す。ｐＡ１９は、Ｃａｓ９と、ＥＭＸ１遺伝子編集レポーターゲノム領域を標的とする２つのガイドであるｓｇ３３４／ｓｇ５１６を有するガイドＲＮＡとを有する。ＢＢは主鎖であり、陰性対照として働く。ｄｇ５１８／５２０／５２２／５２６は、ＭＳ２／ＰＰ７アプタマーを有し、ｓｇ３３４／ｓｇ５１６の近くの位置に結合し、３６ｂｐリンカー（３６Ｌ）によって融合ＲＮＡ鋳型／ドナーを有する異なる不活性ガイドＲＮＡである。設計は全てアンチセンスであり、３００ｂｐの相同アーム領域（ａ３００＋３００）を有する。赤色ボックス：ｄｇガイドＲＮＡの最適な位置を有する設

計は、より高い編集効率を支持した。
【０１４６】
【図８４】図８４は、ＳＳＡＰおよびプライム編集を組み込んだ系の概略図を示す。ＭＳ２アプタマーは、Ｃａｓ９－ＲＴ複合体にＳＳＡＰ－ＭＣＰを動員する。この系は、１）ＳＳＡＰのための局所的に逆転写された鋳型ドナーを提供し、２）分裂細胞に制限された内因性ＨＤＲ機構を迂回し、３）鋳型／ドナーの相同アーム領域の使用からの利益を提供し、Ｃａｓ／ｎＣａｓ／ｄＣａｓによるＳＳＡＰ編集を可能にする。
【０１４７】
【図８５－１】図８５は、ＨＥＫ３遺伝子座（上）およびＲＦＮ２遺伝子座（下）におけるＳＳＡＰ＋プライム編集媒介編集を示す。２９３Ｔ細胞を、Ｃａｓ９ｎ－ＲＴコンストラクト、ｐｅｇＲＮＡコンストラクト、ニッキング／動員ｓｇＲＮＡ－ＭＳ２コンストラクトおよびＳＳＡＰ－ＭＣＰコンストラクトでトランスフェクトした。
【図８５－２】同上。
【０１４８】
【図８６－１】図８６は、ＨＥＫ３遺伝子座（上）およびＲＦＮ２遺伝子座（下）でのＳＳＡＰ＋プライム編集によって媒介される異なる長さ編集を示す。２９３Ｔ細胞を、Ｃａｓ９ｎ－ＲＴコンストラクト、ｐｅｇＲＮＡコンストラクト、ニッキング／動員ｓｇＲＮＡ－ＭＳ２コンストラクトおよびＳＳＡＰ－ＭＣＰコンストラクトでトランスフェクトした。
【図８６－２】同上。
【０１４９】
【図８７】図８７は、ＳＳＡＰおよびレトロンを組み込んだ編集系の概略図を示す。レトロン－ＳＳＡＰエディタは、３つの成分を有する：（１）レトロン－ｓｇＲＮＡは、３つの領域：逆転写されるＲＮＡの領域（「ｍｓｄ」と呼ばれる）および最終分子にＲＮＡとして残る領域（「ｍｓｒ」と呼ばれる）、ならびに最後にガイドＲＮＡ領域（ＭＳ２またはＳＳＡＰを動員するための他のアプタマーを有するガイドＲＮＡ）に細分することができる。ｇＲＮＡ領域は、Ｃａｓ９足場に由来し得る。このｍｓｒ／ｍｓｄ　ＲＮＡは、ｓｇＲＮＡに直接連結された逆転写ｓｓＤＮＡを生成するＲＴプロセスの開始を助ける。（２）レトロンＲＮＡを認識し、ドナー鋳型（連結されたＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッド分子）の逆転写を完了させる、レトロンのＲＴ。このＲＴは、Ｃａｓ９またはＭＣＰ－ＳＳＡＰに融合することができる。（３）ＭＣＰに融合したＳＳＡＰタンパク質は、ＲＴがＣａｓ９に融合していない場合、必要に応じてＲＴにも融合される。
【０１５０】
【図８８】図８８Ａ～図８８Ｄは、ＡＣＴＢ標的（図８８Ａ、図８８Ｂ）およびＨＳＰ９０ＡＡ１標的（図８８Ｃ、図８８Ｄ）についての細胞生存度対編集効率（陰性対照（図８８Ａ、図８８Ｃ）に対する倍率（ｆｏｌｄ）、またはｍＫａｔｅノックインのパーセント（図８８Ｂ、図８８Ｄ））を示すＳＳＡＰアレイスクリーニングを示す。陽性対照はＥｃＲｅｃＴである。
【０１５１】
【図８９－１】図８９Ａ～８９Ｃは、２つの標的、ＨＳＰ９０ＡＡおよびＡＣＴＢでの活性を比較した、正規化された（図８９Ａ）編集効率および絶対的な（図８９Ｂ）編集効率を示す。図８９Ｃは、ＨＳＰ９０ＡＡ１ノックインのＳＳＡＰ使用をＡＣＴＢノックインと比較した細胞生存率を示す。陽性対照はＥｃＲｅｃＴである。
【図８９－２】同上。
【０１５２】
【図９０－１】図９０は、散布図によって、組み合わされた全ての標的についての細胞生存率対正規化（Ａ）または絶対的（Ｂ）編集効率の比較を示す。棒グラフは、候補の各々について、正規化された（Ｃ）または絶対的な（Ｄ）２つの標的、ＨＳＰ９０およびＱＣＴＢにおける編集効率を比較する。陽性対照はＥｃＲｅｃＴである。
【図９０－２】同上。

【０１５３】
【図９１】図９１は、ＥｃＲｅｃＴ（配列番号１７１）と比較した、ＳＳＡＰ＿１６（１、配列番号１８５）、ＳＳＡＰ＿１０（２、配列番号１７９）、ＳＳＡＰ＿３６（３、配列番号２０５）、ＳＳＡＰ＿１５２（４、配列番号３２１）、およびＳＳＡＰ＿１８４（５、配列番号３５３）のツリーおよび配列アライメントを示す。表１２を参照されたい。
【０１５４】
【図９２－１】図９２は、ＥｃＲｅｃＴ（配列番号１７１）と比較した、ＳＳＡＰ＿１６（１、配列番号１８５）、ＳＳＡＰ＿１０（２、配列番号１７９）、ＳＳＡＰ＿３６（３、配列番号２０５）、ＳＳＡＰ＿１５２（４、配列番号３２１）、ＳＳＡＰ＿１８４（５、配列番号３５３）、ＳＳＡＰ＿１９７（６、配列番号３６６）、ＳＳＡＰ＿３０５（７、配列番号４２４）、ＳＳＡＰ＿２１０（８；配列番号３７９）、およびＳＳＡＰ＿１９０（９、配列番号３５９）のツリーおよび配列アライメントを示す。表１２を参照されたい。
【図９２－２】同上。
【０１５５】
【図９３】図９３は、ＥｃＲｅｃＴ（配列番号１７１）と比較した、ＳＳＡＰ＿１６（１、配列番号１８５）、ＳＳＡＰ＿１０（２、配列番号１７９）、ＳＳＡＰ＿３６（３、配列番号２０５）、ＳＳＡＰ＿１９７（６、配列番号３６６）、およびＳＳＡＰ＿２１０（８；配列番号３７９）のツリーおよび配列アライメントを示す。表１２を参照されたい。
【０１５６】
【図９４－１】図９４は、候補ＳＳＡＰの進化樹を示す。一組のフィルタを適用して進化距離を最大化する２９６個の候補を選択した。ＳＳＡＰは、ＳＳＡＰファミリー内の多様な系統発生ファミリー（分枝）をカバーする。
【図９４－２】同上。
【図９４－３】同上。
【図９４－４】同上。
【０１５７】
【図９５】図９５Ａ～図９５Ｃは、ｄＣａｓ９編集系を使用したＥｃＲｅｃＴおよび陰性対照と比較した、上位１０個のＳＳＡＰの編集効率を示す。（図９５Ａ）ＡＣＴＢ遺伝子座におけるｍＫａｔｅノックイン。（図９５Ｂ）ＨＳＰ９０遺伝子座におけるｍＫａｔｅノックイン。（図９５Ｃ）候補ＳＳＡＰのＡＣＴＢ標的およびＨＳＰ９０ＡＡ１標的での編集効率を示す散布図。
【０１５８】
【図９６】図９６は、上位１０個のＳＳＡＰのＣａｓフリー系における編集効率を陰性対照（ｐＡ２５はＭＣＰ－ＥＢＦＰを発現する）およびＭＣＰ－ＥｃＲｅｃＴを発現するｐＣＫ９１４と比較する。遺伝子編集効率は、ＨＥＫ２９３ヒト細胞における相同アームを有する８００ｂｐのｍＫａｔｅドナーのノックイン、および標的ゲノム挿入部位ＨＳＰ９０ＡＡ１（上）またはＡＣＴＢ（下）と一致する２０塩基のガイドＲＮＡに対するものである。使用されるコンストラクトは、ｉ）ＳＳＡＰを動員するためのＭＳアプタマーを有するガイドＲＮＡ；ｉｉ）ＭＣＰ－ＳＳＡＰ融合タンパク質；およびｉｉｉ）ｍＫａｔｅカーゴ（プロモータなし）を挿入するドナーＤＮＡである。
【０１５９】
【図９７】図９７Ａ～図９７Ｃは、初代肝細胞（マウス）における転写されたＡＡＶドナーを有するｄＣａｓ９編集系を使用したＥｃＲｅｃＴと比較した上位ＳＳＡＰの編集効率を示す。ｄＣａｓ９は、強力なＣＭＶプロモータの制御下でアデノ－ウイルス－Ｃａｓ９（アデノ－ＣＭＶ－Ｃａｓ９）を使用して別々にウイルス送達される。（図９７Ａ）ＡＡＶドナー設計：（上）典型的なＡＡＶドナーＤＮＡ；（下）ＡＡＶベクターは、ドナーカーゴをＲＮＡに転写するプロモータを含む。ドナーＲＮＡは、カーゴ発現を回避するためにアンチセンス配向で転写される。６００ｂｐのルシフェラーゼカーゴをマウスアルブミン遺伝子座（図９７Ｂ）またはＡＣＴＢ遺伝子座（図９７Ｃ）でノックインした。

【０１６０】
【図９８】図９８Ａ～図９８Ｃは、ＡＡＶドナー設計および編集効率を示す。ｄＣａｓ９は、強力なＣＭＶプロモータの制御下でアデノ－ウイルス－Ｃａｓ９（アデノ－ＣＭＶ－Ｃａｓ９）を使用して別々にウイルス送達される。（図９８Ａ）上：５’放出ＡＡＶ設計。第２のガイドＲＮＡは、カーゴの５’末端に結合／切断するために提供される（左相同アーム（左ＨＡ）に隣接するｈｓｇＲＮＡ切断部位）。中央：３’放出ＡＡＶ設計。第２のガイドＲＮＡは、カーゴの３’末端に結合／切断するために提供される（右相同アーム（右ＨＡ）に隣接するｈｓｇＲＮＡ切断部位）。下：インタクトＡＡＶ設計。６００ｂｐのルシフェラーゼカーゴをマウスアルブミン遺伝子座（図９８Ｂ）またはＡＣＴＢ遺伝子座（図９８Ｃ）でノックインした。
【０１６１】
【図９９】図９９は、ＳＳＡＰを用いる複数のヒト標的にわたるゲノム操作を示す。編集系は、ｄＣａｓ９（ｄＳｐＣａｓ９）、ＭＳ２アプタマーを有するガイドＲＮＡ、候補ＳＳＡＰに融合したＭＣＰタンパク質、およびｍＫａｔｅ蛍光タンパク質カーゴをインフレームで示された内因性ゲノム遺伝子座に挿入するドナーＤＮＡを含んでいた。
【０１６２】
【図１００】図１００Ａ～図１００Ｃは、ＳＳＡＰクローンとＬｉｓｔｅｒｉａ Ｉｎｎｏｃｃｕａファージ Ａ１１８のＲｅｃＴ（ＬｉＲｅｃＴ）との比較、およびＤＮＡアニーリングにおけるＲｅｃＴ複合体のモデルを示す。（図１００Ａ）クローンＳＳＡＰ－１０、ＳＳＡＰ－１６、ＳＳＡＰ－１５２、ＳＳＡＰ－１９８、ＥｃＲｅｃＴおよびＬｉＲｅｃＴを示す進化樹。（図１００Ｂ）ＲｅｃＴ－ｄｓＤＮＡ複合体のモデル。（図１００Ｃ）ＤＮＡアニーリングの二重鎖中間体との複合体におけるＲｅｃＴのモデル。モデルは、堆積構造７ＵＢＢおよび７ＵＢ２に基づいている。
【０１６３】
【図１０１】図１０１Ａ～図１０１Ｂは、ＲｅｃＴの操作を示す。（Ａ）ＤＮＡアニーリングの二重鎖中間体との複合体におけるＲｅｃＴのモデル。挿入図は、ＲｅｃＴ鎖およびＤＮＡ鎖が、右上で強調されているコアチロシンアミノ酸を含む選択されたタンパク質残基との広範な相互作用（黄色の破線）を有することを示す。（Ｂ）ｄｓＤＮＡとの相互作用を示すＬｉＲｅｃＴのモデル（強調）は、Ｎ末端短縮型ミニＳＳＡＰ（ｍＳＳＡＰ）のノックイン効率と一致する（例えば、図４２を参照）。
【発明を実施するための形態】
【０１６４】
本発明の詳細な説明
本発明は、ＤＮＡ編集のための系および構成成分を対象とする。特に、開示される系は、ファージ組換え酵素によるＣＲＩＳＰＲ標的化および相同組換え修復に基づく。この系は、キロ塩基スケールで優れた組換え効率および精度をもたらす。
【０１６５】
本技術の理解を容易にするために、いくつかの用語および語句を以下で定義する。さらなる用語は、詳細な説明を通して記載する。
【０１６６】
本明細書中で使用される場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ（ｓ））」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ（ｓ））」、「有すること（ｈａｖｉｎｇ）」、「有する（ｈａｓ）」、「し得る（ｃａｎ）」、「含有する（ｃｏｎｔａｉｎ（ｓ））」という用語およびそれらの変形は、さらなる行為または構造の可能性を排除しないオープンエンドの移行句、用語または単語であることを意図する。単数形「ａ」、「ａｎｄ」および「ｔｈｅ」は、文脈上他に明確に指示されない限り、複数への言及を含む。本開示はまた、明示的に記載されているか否かにかかわらず、本明細書中で提示される実施形態または要素を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ ｏｆ）」および「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ ｏｆ）」他の実施形態も企図する。
【０１６７】

本明細書中の数値範囲の列挙に対して、同程度の精度でその間に介在する各数字が明示的に企図される。例えば、６～９の範囲の場合、６および９に加えて数字７および８が企図され、６．０～７．０の範囲の場合、数字６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９および７．０が明示的に企図される。

【０１６８】

本明細書中で他に定義されない限り、本発明に関連して使用される科学的および技術的用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。例えば、本明細書中に記載の細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学ならびにタンパク質および核酸の化学およびハイブリッド形成に関連して使用される任意の命名法、ならびにそれらの技術は、当技術分野で周知であり、一般的に使用されるものである。用語の意味および範囲は明確であるべきであるが；ただし、任意の潜在的な曖昧さがある場合、本明細書中で提供される定義が辞書または外部の定義よりも優先される。さらに、文脈により別段の要求がない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものとする。

【０１６９】

「相補的」および「相補性」という用語は、従来のワトソン－クリック塩基対形成またはその他の非従来の型の対形成のいずれかによって別の核酸配列と水素結合（複数可）を形成する核酸の能力を指す。２つの核酸配列間の相補性の程度は、第２の核酸配列と水素結合（例えば、ワトソン－クリック塩基対形成）を形成することができる核酸配列中のヌクレオチドの百分率によって示すことができる（例えば、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％および１００％相補的）。核酸配列の全ての連続するヌクレオチドが第２の核酸配列中の同じ数の連続するヌクレオチドと水素結合すれば、２つの核酸配列は「完全に相補的」である。２つの核酸配列間の相補性の程度が、少なくとも８ヌクレオチド（例えば、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、３５、４０、４５、５０またはそれを超えるヌクレオチド）の領域にわたって少なくとも６０％（例えば、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％または１００％）であれば、または２つの核酸配列が少なくとも中程度の、好ましくは高いストリンジェンシー条件下でハイブリッドを形成すれば、２つの核酸配列は「実質的に相補的」である。例示的な中程度のストリンジェンシー条件には、２０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１５ｍＭクエン酸三ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５×デンハルト溶液、１０％デキストラン硫酸および２０ｍｇ／ｍｌの変性した剪断されたサケ精子ＤＮＡを含む溶液中において、３７℃で一晩インキュベートした後、約３７～５０℃で１×ＳＳＣ中において、または実質的に同様の条件、例えば、以下のＳａｍｂｒｏｏｋらに記載されている中程度にストリンジェントな条件でフィルタを洗浄することが含まれる。高ストリンジェンシー条件は、例えば、（１）洗浄のために、５０°Ｃで０．０１５Ｍ塩化ナトリウム／０．００１５Ｍクエン酸ナトリウム／０．１％ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）などの低イオン強度および高温を使用する、（２）ハイブリダイゼーション中に変性剤、例えば、ホルムアミド、例えば、ｐＨ６．５の０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）／０．１％フィコール／０．１％ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）／５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液を含む５０％（ｖ／ｖ）ホルムアミドを７５０ｍＭ塩化ナトリウムおよび７５ｍＭクエン酸ナトリウムとともに４２°Ｃで使用する、または（３）５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（０．７５Ｍ　ＮａＣｌ、０．０７５Ｍクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１％ピロリン酸ナトリウム、５×デンハルト溶液、超音波処理したサケ精子ＤＮＡ（５０μｇ／ｍｌ）、０．１％ＳＤＳおよび１０％デキストラン硫酸を４２℃で使用し、（ｉ）０．２×ＳＳＣ中において４２℃、（ｉｉ）５０％ホルムアミド中において５５℃および（ｉｉｉ）０．１×ＳＳＣ中において５５℃（好ましくは、ＥＤＴＡと組み合わせて）で洗浄する条件である。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーのさらなる詳細および説明は、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，

３ｒｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（２００１）およびＡｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９４）に提供されている。

【０１７０】

外因性ＤＮＡが細胞内に導入されている場合に、細胞は、外因性ＤＮＡ、例えば、組換え発現ベクターによって、「遺伝子改変」、「形質転換」または「形質移入」されている。外因性ＤＮＡの存在は、恒久的なまたは一過性の遺伝的変化をもたらす。形質転換ＤＮＡは、細胞のゲノム中に組み込まれる（共有結合される）ことがあり得、または組み込まれないことがあり得る。例えば、原核生物、酵母および哺乳動物細胞では、形質転換ＤＮＡは、プラスミドなどのエピソームエレメント上に維持され得る。真核細胞に関して、安定して形質転換された細胞とは、形質転換ＤＮＡが染色体複製を通じて娘細胞によって受け継がれるように、形質転換ＤＮＡが染色体中に組み込まれた細胞である。この安定性は、形質転換ＤＮＡを含有する娘細胞の集団を含む細胞系またはクローンを確立する真核細胞の能力によって実証される。「クローン」は、有糸分裂によって単一の細胞または共通の祖先から生じる細胞の集団である。「細胞系」は、何世代にもわたってインビトロで安定した成長が可能な初代細胞のクローンである。

【０１７１】

本明細書で使用される場合、「核酸」または「核酸配列」は、ピリミジンおよび／またはプリン塩基、好ましくはそれぞれシトシン、チミン、およびウラシル、ならびにアデニンおよびグアニンのポリマーまたはオリゴマーを指す。本技術は、任意のデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはペプチド核酸成分、ならびにこれらの任意の化学的バリアント、例えば、これらの塩基のメチル化された形態、ヒドロキシメチル化された形態またはグリコシル化された形態などを企図する。ポリマーまたはオリゴマーは、組成が不均一または均一であり得、天然に存在する供給源から単離され得るか、または人工的もしくは合成的に生成され得る。さらに、核酸は、ＤＮＡもしくはＲＮＡまたはこれらの混合物であり得、ホモ二本鎖、ヘテロ二本鎖およびハイブリッド状態を含む一本鎖または二本鎖形態で恒久的にまたは移行的に存在し得る。いくつかの実施形態において、核酸または核酸配列は、例えば、ＤＮＡ／ＲＮＡヘリックス、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、モルホリノ核酸（例えば、本明細書に参考として援用されるＢｒａａｓｃｈおよびＣｏｒｅｙ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，４１（１４）：４５０３－４５１０（２００２））および米国特許第５，０３４，５０６号を参照）、ロックされた核酸（ＬＮＡ；本明細書に参考として援用されるＷａｈｌｅｓｔｅｄｔら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，９７：５６３３－５６３８（２０００）を参照）、シクロヘキセニル核酸（本明細書に参考として援用されるＷａｎｇ，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１２２：８５９５－８６０２（２０００）参照）および／またはリボザイムなどの他の種類の核酸構造を含む。したがって、「核酸」または「核酸配列」という用語は、天然ヌクレオチドと同じ機能を示すことができる、非天然ヌクレオチド、修飾されたヌクレオチドおよび／または非ヌクレオチド基本要素（例えば、「ヌクレオチド類似体」）を含む鎖も包含し得、さらに、本明細書で使用される「核酸配列」という用語は、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドおよびこれらの断片または部分、ならびに一本鎖または二本鎖であり得、センス鎖またはアンチセンス鎖を表し得るゲノムまたは合成起源のＤＮＡまたはＲＮＡを指す。「核酸」、「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、交換可能に使用される。「核酸」、「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれかまたはこれらの類似体である、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。

【０１７２】

「ペプチド」または「ポリペプチド」は、ペプチド結合によって連結された２またはそ

れを超えるアミノ酸の連結配列である。ペプチドまたはポリペプチドは、天然、合成または天然および合成の修飾もしくは組み合わせであり得る。ポリペプチドには、結合タンパク質、受容体および抗体などのタンパク質が含まれる。タンパク質は、糖、脂質またはアミノ酸鎖に含まれない他の部分の付加によって修飾され得る。「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書中で交換可能に使用される。

【０１７３】

本明細書で使用される場合、「パーセント配列同一性」という用語は、２つの配列を整列させ、必要であれば、最大のパーセント同一性を達成するためにギャップを導入した後に、参照配列中の対応するヌクレオチドまたはアミノ酸と同一である、核酸配列中のヌクレオチドもしくはヌクレオチド類似体、またはアミノ酸配列中のアミノ酸の百分率を指す。したがって、本技術による核酸が参照配列よりも長い場合には、参照配列と整列しない核酸中の追加のヌクレオチドは、配列同一性を決定するために考慮されない。整列のための方法およびコンピュータプログラムは、ＢＬＡＳＴ、Ａｌｉｇｎ２およびＦＡＳＴＡを含み、当技術分野において周知である。

【０１７４】

「ベクター」または「発現ベクター」は、プラスミド、ファージ、ウイルスまたはコスミドなどのレプリコンであり、それに、別のＤＮＡセグメント、例えば「挿入物」が、細胞において結合したセグメントの複製をもたらすように結合され得るかまたは組み込まれ得る。

【０１７５】

「野生型」という用語は、天然に存在する供給源から単離された場合にその遺伝子または遺伝子産物の特徴を有する遺伝子または遺伝子産物を指す。野生型遺伝子は、集団で最も頻繁に観察される遺伝子であり、したがって、遺伝子の「正常」または「野生型」形態と任意に指定される。対照的に、「修飾された」、「変異体」または「多形性の」という用語は、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較した場合に、配列および／または機能的特性の修飾（例えば、改変された特性）を示す遺伝子または遺伝子産物を指す。天然に存在する変異体を単離できることに留意すべきであり、これらは、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較した場合、改変された特性を有するという事実によって特定される。

【０１７６】

ＲＮＡガイドＣＲＩＳＰＲリコンビニアリング系

細菌および古細菌では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、侵入するファージ、ウイルスおよびプラスミドＤＮＡの断片をＣＲＩＳＰＲ遺伝子座に組み込み、対応するＣＲＩＳＰＲＲＮＡ（「ｃｒＲＮＡ」）を使用して相同配列の分解を誘導することにより、免疫を提供する。各ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座は、リピート配列によって隔てられている獲得された「スペーサー」をコードする。ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座の転写により「プレｃｒＲＮＡ」が生成され、プレｃｒＲＮＡは処理されて、スペーサーに相補的なｄｓＤＮＡ配列を切断するようにエフェクターヌクレアーゼ複合体をガイドするスペーサー・リピート断片を含有するｃｒＲＮＡが生成される。３つの異なるタイプのＣＲＩＳＰＲ系、タイプＩ、タイプＩＩまたはタイプＩＩＩが知られており、Ｃａｓタンパク質タイプ、および侵入するＤＮＡ中のプロトスペーサーの選択のためのプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の使用に基づいて分類される。内因性ＩＩ型系は、Ｃａｓ９タンパク質およびＣａｓ９タンパク質をコードする遺伝子を含む４つの遺伝子、２つの非コードｃｒＲＮＡ：トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）および同一のダイレクトリピート（ＤＲ）によって間隔が空けられたヌクレアーゼガイド配列（「スペーサー」とも呼ばれる）を含有する前駆体ｃｒＲＮＡ（プレｃｒＲＮＡ）アレイを含む。ｔｒａｃｒＲＮＡは、プレｃｒＲＮＡの処理およびＣａｓ９複合体の形成に重要である。第一に、ｔｒａｃｒＲＮＡがプレｃｒＲＮＡのリピート領域にハイブリッド形成する。第二に、内因性リボヌクレアーゼＩＩＩがハイブリッド形成したｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡを切断し、第二の事象が各スペーサーの５’末端を除去して、ｔｒａｃｒＲＮＡとＣａｓ９の両方に会合したままの成熟ｃｒＲＮＡを生成する。第三に、各成熟複合体は、標的二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）配列の位置を特

定し、Ｃａｓ９のヌクレアーゼ活性を使用して両方の鎖を切断する。
【０１７７】
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ遺伝子編集系は、真核細胞における関心対象の特定の遺伝子に対する標的化修飾を可能にするために開発された。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ遺伝子編集系は、一般に、ＩＩ型の原核生物のクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）適応免疫系由来のＲＮＡガイドＣａｓ９ヌクレアーゼに基づく。真核細胞において使用するためのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系の改変操作は、典型的には、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ－Ｃａｓ９複合体の再構成を伴う。ヒト細胞では、例えば、適切な核局在化シグナルを含めるために、Ｃａｓ９アミノ酸配列をコドン最適化および修飾することができ、ＲＮＡポリメラーゼＩＩプロモーターを介して、個別にまたは単一のキメラ分子としてｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒＲＮＡ配列を発現させ得る。典型的には、ｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡ配列はキメラとして発現され、まとめて「ガイドＲＮＡ」（ｇＲＮＡ）またはシングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）と呼ばれる。したがって、「ガイドＲＮＡ」、「シングルガイドＲＮＡ」および「合成ガイドＲＮＡ」という用語は、本明細書では互換的に使用され、ガイド配列を含有するｔｒａｃｒＲＮＡとプレｃｒＲＮＡのアレイを含む核酸配列を指す。「ガイド配列」、「ガイド」および「スペーサー」という用語は、本明細書では互換的に使用され、標的部位を特定するガイドＲＮＡ内の約２０ヌクレオチド配列を指す。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９系では、ガイドＲＮＡは、約２０ヌクレオチドのガイド配列とこれに後続する、ワトソン－クリック塩基対形成を介してＣａｓ９を標的配列に誘導するプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）とを含有する。
【０１７８】
いくつかの実施形態または本発明では、ＣＲＩＳＰＲ遺伝子編集系からのツールを利用するＲＮＡガイドリコンビニアリングのための系または組成物が提供される。この系は、Ｃａｓタンパク質、標的ＤＮＡ配列に相補的であるガイドＲＮＡ配列を含む核酸分子および組換えタンパク質を含む。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、微生物の組換えタンパク質を含む。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、ウイルスの組換えタンパク質を含む。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、真核生物の組換えタンパク質を含む。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、ミトコンドリアの組換えタンパク質を含む。
【０１７９】
Ｃａｓタンパク質ファミリーは、例えば、参照により本明細書中に組み込まれる、Ｈａｆｔら、ＰＬｏＳ　Ｃｏｍｐｕｔ．Ｂｉｏｌ．，１（６）：ｅ６０（２００５）にさらに詳細に記載されている。Ｃａｓタンパク質は、いずれかのＣａｓエンドヌクレアーゼであり得る。いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ９またはＣａｓ１２ａであり、そうでなければＣｐｆ１と呼ばれる。一実施形態において、Ｃａｓ９タンパク質は、野生型Ｃａｓ９タンパク質である。Ｃａｓ９タンパク質は任意の適切な微生物から得ることができ、多くの細菌がＣａｓ９タンパク質オルソログまたはバリアントを発現する。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９は、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓまたはＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓに由来する。他の種のＣａｓ９タンパク質は当技術分野において公知であり（例えば、本明細書に参考として援用される米国特許出願公開第２０１７／００５１３１２号を参照）、本発明に関連して使用され得る。様々な種からのＣａｓタンパク質のアミノ酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋおよびＵｎｉＰｒｏｔデータベースを通じて公に入手可能である。
【０１８０】
いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｃａｓ９ニッカーゼ（Ｃａｓ９ｎ）である。野生型Ｃａｓ９は、二本鎖ＤＮＡ切断を促進する２つの触媒性ヌクレアーゼドメインを有する。Ｃａｓ９ニッカーゼタンパク質は、典型的には、残りの活性ヌクレアーゼドメインを使用してＣａｓ９にニックを入れるか、または２本のＤＮＡ鎖の一方のみを酵素的に切断する触媒性ヌクレアーゼドメインのうちの１つにおける点変異（複数可）を不活性化することを通じて操作される。Ｃａｓ９ニッカーゼは当技術分野で公知であり（例

えば、参照により本明細書中に組み込まれる米国特許出願公開第２０１７／００５１３１２号を参照）、例えば、Ｄ１０またはＨ８４０に点変異を有するＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓが挙げられる。選択実施形態では、Ｃａｓ９ニッカーゼはＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９ｎ（Ｄ１０Ａ）である。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質は、触媒的に不活性であるＣａｓである。例えば、触媒的に不活性のＣａｓ９は、基本的に、典型的にはその触媒性ヌクレアーゼドメイン内の２またはそれを超える変異によるＤＮＡ結合タンパク質であり、これにより、タンパク質が触媒ヌクレアーゼ活性を殆どまたは全く持たなくなる。Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９は、Ｄ１０および、Ｅ７６２、Ｈ８４０、Ｎ８５４、Ｎ８６３またはＤ９８６のうち少なくとも１つの、典型的にはＨ８４０および／またはＮ８６３の、変異によって触媒的に不活性となるようにされ得る（例えば、参照により本明細書中に組み込まれる米国特許出願公開第２０１７／００５１３１２号を参照）。Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９中のＮ５８０など、対応するオルソログ中の変異が知られている。多くの場合、このような変異によって、触媒的に不活性であるＣａｓタンパク質が正常なヌクレアーゼ活性の３％以下を有するようになる。

【０１８２】

ある特定の実施形態では、この系は、標的ＤＮＡ配列に相補的なガイドＲＮＡ配列を含む核酸分子を含む。ガイドＲＮＡ配列は、上記のように、およそ２０ヌクレオチドのガイド配列と、その後に続くワトソン・クリック塩基対合を介してＣａｓ９を標的配列に向かわせるプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）とを有する標的部位を指定する。

【０１８３】

特定の実施形態では、系は、標的ＤＮＡ配列に相補的な不活性化ガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）配列を含む核酸分子を含む。不活性化ガイドは、ｄｇＲＮＡを含むＣＲＩＳＰＲ複合体が標的ＤＮＡに結合するが切断もニックも入れないように短縮または修飾される。非限定的な例としては、国際公開第２０１６／０９４８７２号に記載されているようなガイドが挙げられ、ガイドは、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成および標的への成功裏の結合を可能にすると同時に、成功裏のヌクレアーゼ活性を可能にしないように修飾される（例えば、ヌクレアーゼ活性なし／インデル活性なし）。ガイド核酸は、ヌクレアーゼ活性に関して触媒的に非活性またはコンフォメーション的に非活性であると考えることができる。短い標的認識配列を有するｄｇＲＮＡは、活性Ｃａｓ９　ｓｇＲＮＡ複合体に結合し、オフターゲット部位をそれから遮蔽することによって、Ｃａｓ９媒介性編集特異性を劇的に改善することができる。（Ｒｏｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｏｆ　ｕｎｗａｎｔｅｄ　ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９　ｅｄｉｔｉｎｇ　ｂｙ　ｃｏ－ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｃａｔａｌｙｔｉｃａｌｌｙ　ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｎｇ　ｔｒｕｎｃａｔｅｄ　ｇｕｉｄｅ　ＲＮＡｓ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ（２０２０）ｖｏｌ．１１，ａｒｔｉｃｌｅ　２６９７）。短縮／修飾ｄｇＲＮＡを本発明に従って使用して、長い配列の切断のないノックインのためにＣａｓ９－ＳＳＡＰを動員する。

【０１８４】

「標的ＤＮＡ配列」、「標的核酸」、「標的配列」および「標的部位」という用語は、ガイド配列（例えば、ガイドＲＮＡ）がそれに対して相補性を有するように設計されているポリヌクレオチド（核酸、遺伝子、染色体、ゲノムなど）を表すために、本明細書で互換的に使用され、標的配列とガイド配列間のハイブリダイゼーションは、結合のために十分な条件が存在すれば、Ｃａｓ９／ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進する。いくつかの実施形態では、標的配列はゲノムＤＮＡ配列である。本明細書で使用される「ゲノム（ｇｅｎｏｍｉｃ）」という用語は、細胞内の染色体上に位置する核酸配列（例えば、遺伝子または遺伝子座）を指す。ハイブリダイゼーションを引き起こし、ＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を促進するのに十分な相補性が存在すれば、標的配列とガイド配列は完全な相補性を示す必要はない。標的配列は、ＤＮＡまたはＲＮＡなどの任意のポリヌクレオチドを含み得

る。適切なＤＮＡ／ＲＮＡ結合条件には、細胞中に通常存在する生理学的条件が含まれる。他の適切なＤＮＡ／ＲＮＡ結合条件（例えば、無細胞系における条件）は当技術分野で公知であり、例えば、本明細書で参照され、参照により組み込まれるＳａｍｂｒｏｏｋを参照されたい。ＤＮＡを標的とするＲＮＡに相補的で、該ＲＮＡとハイブリッドを形成する標的ＤＮＡの鎖は「相補鎖」と呼ばれ、「相補鎖」に相補的である（したがって、ＤＮＡを標的とするＲＮＡに対しては相補的でない）標的ＤＮＡの鎖は「非相補鎖（ｎｏｎｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ　ｓｔｒａｎｄ）」または「非－相補鎖（ｎｏｎ－ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ　ｓｔｒａｎｄ）」と呼ばれる。

【０１８５】

標的ゲノムＤＮＡ配列は、遺伝子産物をコードし得る。本明細書で使用される「遺伝子産物」という用語は、遺伝子の発現から生じる任意の生化学的産物を指す。遺伝子産物はＲＮＡまたはタンパク質であり得る。ＲＮＡ遺伝子産物には、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）などの非コードＲＮＡ、およびメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）などのコードＲＮＡが含まれる。いくつかの実施形態において、標的ゲノムＤＮＡ配列は、タンパク質またはポリペプチドをコードする。

【０１８６】

いくつかの実施形態では、例えば、この系がＣａｓ９ニッカーゼまたは触媒的に不活性のＣａｓ９を含む場合、ガイドＲＮＡ配列を含む２つの核酸分子が利用され得る。この２つの核酸分子は、同じまたは異なるガイドＲＮＡ配列を有し得、したがって、同じまたは異なる標的ＤＮＡ配列に相補的であり得る。いくつかの実施形態では、２つの核酸分子のガイドＲＮＡ配列は、挿入位置の反対末端（例えば、３’または５’）および／または反対鎖で標的ＤＮＡ配列に相補的である。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、この系は、少なくとも１つのアプタマー配列と、融合タンパク質の一部として微生物組換えタンパク質に機能的に連結されたアプタマー結合タンパク質とを含む動員系をさらに含む。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、アプタマー配列は、ＲＮＡアプタマー配列である。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡを含む核酸分子はまた、別の分子種、アダプター分子、例えば核酸またはタンパク質など、を動員し、それに結合し得る１またはそれを超えるＲＮＡアプタマー、または別個のＲＮＡ二次構造もしくは配列を含む。いくつかのＣＲＩＳＰＲ系は、ＳｐＣａｓ９、ＳａＣａｓ９およびＬｂＣａｓ１２ａ（別名Ｃｐｆ１）を含むがこれらに限定されないガイドＲＮＡ挿入および伸長に適合する。ＲＮＡアプタマーは、特定の標的分子種に結合するようにインビトロ選択またはＳＥＬＥＸ（指数関数的富化によるリガンドの系統的進化）の反復ラウンドによって操作された天然または合成オリゴヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態では、核酸は２またはそれを超えるアプタマー配列を含む。アプタマー配列は、同じであり得るかまたは異なり得、同じまたは異なるアダプタータンパク質を標的とし得る。選択実施形態では、核酸は２つのアプタマー配列を含む。

【０１８９】

既知の任意のＲＮＡアプタマー／アプタマー結合タンパク質対が、本発明に関連して選択され、使用され得る（例えば、参照により本明細書中に組み込まれる、Ｊａｙａｓｅｎａ，Ｓ．Ｄ．，Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９９９．４５（９）：ｐ．１６２８－１６５０；Ｇｅｌｉｎａｓら、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｏｐｉｎｉｏｎ　ｉｎ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，２０１６．３６：ｐ．１２２－１３２；およびＨａｓｅｇａｗａ，Ｈ．，Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，２０１６；２１（４）：ｐ．４２１を参照）。

【０１９０】

多様な一連のバクテリオファージコートタンパク質を含む、多数のＲＮＡアプタマー結合またはアダプタータンパク質が存在する。このようなコートタンパク質の例としては、ＭＳ２、Ｑβ、Ｆ２、ＧＡ、ｆｒ、ＪＰ　５０１、Ｍ１２、Ｒ１７、ＢＺ１３、ＪＰ３４

、ＪＰ５００、ＫＵ１、Ｍ１１、ＭＸ１、ＴＷ１８、ＶＫ、ＳＰ、ＦＩ、ＩＤ２、ＮＬ９５、ＴＷ１９、ＡＰ２０５、φＣｂ５、φＣｂ８ｒ、φＣｂ１２ｒ、φＣｂ２３ｒ、７ｓおよびＰＲＲ１が挙げられるが限定されない。いくつかの実施形態では、ＲＮＡアプタマーは、ＭＳ２バクテリオファージコートタンパク質またはその機能性誘導体、断片もしくはバリアントに結合する。ＭＳ２結合ＲＮＡアプタマーは、一般に、単純なステム－ループ構造を有し、古典的には、ステムの５’脚に単一のバルジアデニン（ｂｕｌｇｅｄ ａｄｅｎｉｎｅ）を有する１９ヌクレオチドＲＮＡ分子によって定義される（参照により本明細書中に組み込まれる、Ｗｉｔｈｅｒａｌｌ Ｇ．Ｗ．ら、（１９９１）Ｐｒｏｇ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，４０，１８５－２２０）。しかし、多くの大きく異なる一次配列がＭＳ２コートタンパク質に結合可能であることが見出された（Ｐａｒｒｏｔｔ ＡＭら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０００；２８（２）：４８９－４９７、Ｂｕｅｎｒｏｓｔｒｏ ＪＤら、Ｎａｔｕｒａ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２０１４；３２，５６２－５６８、参照により本明細書中に組み込まれる）。ＭＳ２バクテリオファージコートタンパク質に結合することが知られているＲＮＡアプタマー配列のいずれも、ＭＳ２を含む融合タンパク質に結合させるために本発明に関連して利用され得る。選択実施形態では、ＭＳ２ ＲＮＡアプタマー配列は、ＡＡＣＡＵＧＡＧＧＡＵＣＡＣＣＣＡＵＧＵＣＵＧＣＡＧ（配列番号１４５）、ＡＧＣＡＵＧＡＧＧＡＵＣＡＣＣＣＡＵＧＵＣＵＧＣＡＧ（配列番号１４６）またはＡＧＣＧＵＧＡＧＧＡＵＣＡＣＣＣＡＵＧＣＣＵＧＣＡＧ（配列番号１４７）を含む。

【０１９１】

バクテリオファージのＮ－タンパク質（Ｎｕｔ利用部位タンパク質）は、Ｎペプチドと称される約２０アミノ酸のアルギニンに富む保存されたＲＮＡ認識モチーフを含有する。ＲＮＡアプタマーは、ファージＮペプチドまたはその機能的誘導体、断片もしくはバリアントに結合し得る。いくつかの実施形態では、ファージＮペプチドは、ラムダもしくはＰ２２ファージＮペプチドまたはその機能性誘導体、断片もしくはバリアントである。

【０１９２】

選択実施形態では、Ｎペプチドは、ラムダファージＮ２２ペプチドまたはその機能性誘導体、断片もしくはバリアントである。いくつかの実施形態では、Ｎ２２ペプチドは、アミノ酸配列ＧＮＡＲＴＲＲＲＥＲＲＡＥＫＱＡＱＷＫＡＡＮ（配列番号１４９）と少なくとも７０％の類似性を有するアミノ酸配列を含む。λバクテリオファージ抗ターミネータータンパク質Ｎ（λＮ－（１－２２）またはλＮペプチド）の２２アミノ酸ＲＮＡ結合ドメインであるＮ２２ペプチドは、ＢｏｘＢステムループを含むが限定されない特異的なステムループ構造に特異的に結合可能である。例えば、参照により本明細書中に組み込まれるＣｉｌｌｅｙおよびＷｉｌｌｉａｍｓｏｎ，ＲＮＡ １９９７；３（１）：５７－６７を参照のこと。いくつかの異なるＢｏｘＢステムループ一次配列がＮ２２ペプチドに結合することが知られており、それらの何れも本発明に関連して利用され得る。いくつかの実施形態では、Ｎ２２ペプチドＲＮＡアプタマー配列は、ＧＣＣＣＵＧＡＡＡＡＡＧＧＧＣ（配列番号１５０）、ＧＣＣＣＵＧＡＡＧＡＡＧＧＧＣ（配列番号１５１）、ＧＣＧＣＵＧＡＡＡＡＡＧＣＧＣ（配列番号１５２）、ＧＣＣＣＵＧＡＣＡＡＡＧＧＧＣ（配列番号１５３）およびＧＣＧＣＵＧＡＣＡＡＡＧＣＧＣ（配列番号１５４）からなる群より選択されるＲＮＡ配列と少なくとも７０％の類似性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、Ｎ２２ペプチドＲＮＡアプタマー配列は、配列番号１５０～１５４からなる群より選択される。

【０１９３】

選択実施形態では、Ｎペプチドは、Ｐ２２ファージＮペプチドまたはその機能性誘導体、断片もしくはバリアントである。いくつかの異なるＢｏｘＢステムループ一次配列がＰ２２ファージＮペプチドおよびそのバリアントに結合することが知られており、それらのいずれも本発明に関連して利用され得る。例えば、参照により本明細書中に組み込まれる、Ｃｏｃｏｚａｋｉ，ＧｈａｔｔａｓおよびＳｍｉｔｈ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ ２００８；１９０（２３）：７６９９－７７０８を参照のこと。い

くつかの実施形態では、Ｐ２２ファージＮペプチドは、アミノ酸配列ＧＮＡＫＴＲＲＨＥＲＲＲＫＬＡＩＥＲＤＴＩ（配列番号１５５）と少なくとも７０％の類似性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、Ｐ２２ファージＮペプチドＲＮＡアプタマー配列は、ＧＣＧＣＵＧＡＣＡＡＡＧＣＧＣ（配列番号１５６）およびＣＣＧＣＣＧＡＣＡＡＣＧＣＧＧ（配列番号１５７）からなる群より選択されるＲＮＡ配列と少なくとも７０％の類似性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、Ｐ２２ファージＮペプチドＲＮＡアプタマー配列は、配列番号１５６～１５７、ＵＧＣＧＣＵＧＡＣＡＡＡＧＣＧＣＧ（配列番号１５８）またはＡＣＣＧＣＣＧＡＣＡＡＣＧＣＧＧＵ（配列番号１５９）からなる群より選択される。

【０１９４】

特定の実施形態では、異なるアプタマー／アプタマー結合タンパク質ペアを選択して、組換えタンパク質および機能の組み合わせをもたらすことができる。

【０１９５】

いくつかの実施形態では、アプタマー配列は、ペプチドアプタマー配列である。ペプチドアプタマーは、親和性物質（ａｆｆｉｎｉｔｙ　ａｇｅｎｔ）によって特異的に認識される天然または合成ペプチドであり得る。このようなアプタマーとしては、ｃ－Ｍｙｃアフィニティタグ、ＨＡアフィニティタグ、Ｈｉｓアフィニティタグ、Ｓアフィニティタグ、メチオニン－Ｈｉｓアフィニティタグ、ＲＧＤ－Ｈｉｓアフィニティタグ、７ｘＨｉｓタグ、ＦＬＡＧオクタペプチド、ｓｔｒｅｐタグまたはｓｔｒｅｐタグＩＩ、Ｖ５タグまたはＶＳＶ－Ｇエピトープが挙げられるが限定されない。対応するアプタマー結合タンパク質は当技術分野で周知であり、例えば、一次抗体、ビオチン、アフィマー、単一ドメイン抗体および抗体模倣物が挙げられる。

【０１９６】

例示的なペプチドアプタマーとしては、ＧＣＮ４ペプチドが挙げられる（参照により本明細書中に組み込まれるＴａｎｅｎｂａｕｍら、Ｃｅｌｌ，２０１４；１５９（３）：６３５－６４６）。抗体またはＧＣＮ４結合タンパク質は、アプタマー結合タンパク質として使用され得る。

【０１９７】

いくつかの実施形態では、ペプチドアプタマー配列は、Ｃａｓタンパク質にコンジュゲートされる。ペプチドアプタマー配列は、いずれかの向き（例えば、Ｎ末端からＣ末端、Ｃ末端からＮ末端、Ｎ末端からＮ末端）でＣａｓに融合され得る。選択実施形態では、ペプチドアプタマーは、Ｃａｓタンパク質のＣ末端に融合される。

【０１９８】

いくつかの実施形態では、１～２４個のペプチドアプタマー配列がＣａｓタンパク質にコンジュゲートされ得る。アプタマー配列は、同じであり得るかまたは異なり得、同じまたは異なるアプタマー結合タンパク質を標的とし得る。選択実施形態では、同じペプチドアプタマー配列の１から２４個のタンデムリピートがＣａｓタンパク質にコンジュゲートされる。好ましい実施形態では、４～１８個のタンデムリピートがＣａｓタンパク質にコンジュゲートされる。個々のアプタマーは、リンカー領域によって分離され得る。適切なリンカー領域は当技術分野で公知である。リンカーは、柔軟であり得るか、または立体障害なく、もしくは低い立体障害で、隣接するアプタマーへの親和性物質（ａｆｆｉｎｉｔｙ　ａｇｅｎｔ）の結合を可能にするように構成され得る。リンカー配列は、例えば、１またはそれを超えるグリシンおよび／またはセリン残基を含む、ポリペプチドの非構造化領域または直鎖領域を提供し得る。リンカー配列は、少なくとも約２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれを超えるアミノ酸長であり得る。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、アプタマー結合タンパク質に機能的に連結される組換えタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、微生物の組換えタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、リコンビナーゼを含む。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、５’－３’エキソヌクレアーゼ

活性を含む。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を含む。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、ｓｓＤＮＡ結合活性を含む。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、ｓｓＤＮＡアニーリング活性を含む。

【０２００】

λ　ｒｅｄ系と呼ばれるバクテリオファージλコード化遺伝子組換え機構は、ｇａｍ遺伝子によって支援されるｅｘｏ遺伝子およびｂｅｔ遺伝子を含み、これらは一緒にλ　ｒｅｄ遺伝子と呼ばれる。Ｅｘｏは、ｄｓＤＮＡを標的とする５’－３’エキソヌクレアーゼであり、ＢｅｔはｓｓＤＮＡ結合タンパク質である。Ｂｅｔ機能には、ｓｓＤＮＡを分解から保護すること、および相補的なｓｓＤＮＡ鎖のアニーリングを促進することが含まれる。大腸菌に見られる別のバクテリオファージ系は、ｅｘｏおよびｂｅｔに機能的に類似するｒｅｃＥ遺伝子およびｒｅｃＴ遺伝子を含むＲａｃプロファージ系である。いくつかの実施形態では、微生物組換えタンパク質は、ＲｅｃＥ、ＲｅｃＴ、ラムダエキソヌクレアーゼ（Ｅｘｏ）、Ｂｅｔタンパク質（ｂｅｔＡ、ｒｅｄＢ）、エキソヌクレアーゼｇｐ６、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質ｇｐ２．５またはその誘導体もしくはバリアントであり得る。

【０２０１】

本発明において有用な組換えタンパク質およびその機能性断片には、ヌクレアーゼ、ｓｓＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ）、およびｓｓＤＮＡアニーリングタンパク質（ＳＳＡＢ）が含まれる。微生物タンパク質の中でも、これらには、限定されないが、Ｅ．ｃｏｌｉタンパク質、例えばＥｘｏＩ（ｘｏｎＡ；ｓｂｃＢ）、ＥｘｏＩＩＩ（ｘｔｈＡ）、ＥｘｏＩＶ（ｏｒｎ）、ＥｘｏＶＩＩ（ｘｓｅＡ、ｘｓｅＢ）、ＥｘｏＩＸ（ｙｇｄＧ）、ＥｘｏＸ（ｅｘｏＸ）、ＤＮＡ　ｐｏｌＩ　５’Ｅｘｏ（ＥｘｏＶＩ）（ｐｏｌＡ）、ＤＮＡ　Ｐｏｌ　Ｉ　３’Ｅｘｏ（ＥｘｏＩＩ）（ｐｏｌＡ）、ＤＮＡ　Ｐｏｌ　ＩＩ　３’Ｅｘｏ（ｐｏｌＢ）、ＤＮＡ　Ｐｏｌ　ＩＩＩ　３’Ｅｘｏ（ｄｎａＱ、ｍｕｔＤ）、ＲｅｃＢＣＤ（ｒｅｃＢ、ｒｅｃＣ、ｒｅｃＤ）、およびＲｅｃＪ（ｒｅｃＪ）ならびにそれらの機能的断片が含まれる。

【０２０２】

二本鎖ＤＮＡは遺伝情報を含有するが、情報の使用は一本鎖中間体を含む。一本鎖中間体は二次構造を形成し、化学分解および核酸分解に感受性であるが、細胞は、ｓｓＤＮＡに結合してこれを安定化するｓｓＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ）をコードする。有用なＳＳＢとしては、限定されないが、原核生物、バクテリオファージ、真核生物、哺乳動物、ミトコンドリアおよびウイルスのＳＳＢが挙げられる。ＳＳＢはあらゆる生物に見られるが、タンパク質自体は驚くほどわずかな配列類似性を共有し、サブユニット組成およびオリゴマー化状態が異なり得る。ＳＳＢタンパク質は、特定の構造的特徴を含み得る。１つは、ホスホジエステル骨格およびヌクレオチド塩基との静電相互作用および塩基スタッキング相互作用の組み合わせを介してｓｓＤＮＡに結合するためのオリゴヌクレオチド／オリゴ糖結合（ＯＢ）ドメインの使用である。別の特徴は、ＤＮＡ結合ＯＢフォールドを一緒にするオリゴマー化である。真核生物ＳＳＢは、セリンおよびトレオニン残基上のリン酸化によって調節される。微生物ＳＳＢのチロシンリン酸化は、分類学的に遠い細菌で観察され、ｓｓＤＮＡに対する親和性を実質的に増加させる。ヒトミトコンドリアｓｓＤＮＡ結合タンパク質は、大腸菌由来のＳＳＢ（ＥｃｏＳＳＢ）と構造的に類似しているが、Ｃ末端の無秩序なドメインを欠いている。真核生物複製タンパク質Ａ（ＲＰＡ）は、細菌ＳＳＢと機能を共有するが、配列相同性は共有しない。単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ－１）ＳＳＢ、ＩＣＰ８は、他の複製タンパク質と共にウイルスＤＮＡ複製に必要とされる核タンパク質である。

【０２０３】

理論に束縛されるものではないが、本発明の組換えタンパク質のエキソヌクレアーゼ活性およびｓｓＤＮＡ結合活性は、鋳型および標的ＤＮＡの一本鎖領域を明らかにし、保護し、それによって組換えを促進すると考えられる。また、標的化は協同的であり得、鋳型ＤＮＡに設計された相同アームによる組換えと協調した染色体ＤＮＡの標的指向ＣＲＩＳ

ＰＲ媒介ニッキングを含む。本発明の特定の実施形態では、オフターゲット効果が最小限に抑えられる。例えば、標的化組換えは、協調的なＣＲＩＳＰＲおよび組換え機能を伴うが、オフターゲット部位では、ＨＲ鋳型ＤＮＡとの相同性は存在せず、ニック修復が促進され得る。

【０２０４】

一本鎖ＤＮＡアニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）もまた、多様な配列を有する生物の間で遍在しており、バイオインフォマティクスおよび実験分析によってファミリーおよびスーパーファミリーに分類されている。さらに、ファージにコードされたＳＳＡＰは、ＤＮＡ代謝を制御するために宿主タンパク質と共に機能しながら古典的なＲｅｃＡタンパク質に取って代わるそれら自体のＳＳＡＰリコンビナーゼをコードすると認識されている。Ｓｔｅｃｚｋｉｅｗｉｚは、ＳＳＡＰを、原核生物、真核生物およびファージを含む３つのスーパーファミリーに編成された７つのファミリー（ＲｅｃＡ、Ｇｐ２．５、ＲｅｃＴ／Ｒｅｄβ、Ｅｒｆ、Ｒａｄ５２／２２、Ｓａｋ３、およびＳａｋ４）に分類した（Ｓｔｅｃｋｉｅｗｉｃｚら、２０２１、Ｆｒｏｎｔ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ １２：６４４６２２）。本発明に従って使用することができるＳＳＡＰの非限定的な例を表７に示す。本発明では、ＳＳＡＰのうちの任意の１またはそれを超えるものを使用することができる。

【０２０５】

特定の実施形態では、微生物組換えタンパク質は、ＲｅｃＥもしくはＲｅｃＴまたはその誘導体もしくはバリアントである。ＲｅｃＥおよびＲｅｃＴの誘導体またはバリアントは、野生型ＲｅｃＥおよびＲｅｃＴと実質的に同様の機能を有する機能的に等価なタンパク質またはポリペプチドである。ＲｅｃＥおよびＲｅｃＴの誘導体またはバリアントとしては、野生型配列と類似しているが、アミノ酸の置換、付加、欠失、短縮、翻訳後修飾または他の修飾のために異なる生物学的に活性なアミノ酸配列が挙げられる。いくつかの実施形態では、誘導体は、翻訳、精製、生物学的半減期、活性を改善し得るか、または任意の望ましくない副作用もしくは反応を排除もしくは軽減し得る。誘導体またはバリアントは、天然のポリペプチド、合成もしくは化学合成ポリペプチドまたは遺伝子操作されたペプチドポリペプチドであり得る。ＲｅｃＥおよびＲｅｃＴ生物活性は、当業者にとって公知であり、当業者によって容易にアッセイされ、例えば、エキソヌクレアーゼおよび一本鎖核酸結合をそれぞれ含む。

【０２０６】

ＲｅｃＥまたはＲｅｃＴは、とりわけ、大腸菌、Ｐａｎｔｏｅａ ｂｒｅｅｎｅｒｉ、Ｐｌａｕｔｉａ ｓｔａｌｉのＦ型共生生物、Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ｓｐ．、ＭＧＦ０１４、Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｏｎｎｅｉ、Ｐｓｅｕｄｏｂａｃｔｅｒｉｏｖｏｒａｘ ａｎｔｉｌｌｏｇｏｒｇｉｉｃｏｌａを含むいくつかの生物に由来し得る。他の非限定的な供給源としては、Ｄｅｓｕｌｆｏｔａｌｅａ ｐｓｙｃｈｒｏｐｈｉｌａ、Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ、Ｆｌａｖｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐｓｙｃｈｒｏｐｈｉｌｕｍ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｍｅｇｍａｔｉｓ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｈａｍｎｏｓｕｓ、Ｐｓｙｃｈｒｏｂａｃｔｅｒ ａｒｃｔｉｃｕｓ、Ｐｓｙｃｈｒｏｂａｃｔｅｒ ｃｒｙｏｈａｌｏｌｅｎｔｉｓ、Ｐｓｙｃｈｒｏｍｏｎａｓ ｉｎｇｒａｈａｍｉｉ、Ｐｈｏｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐｒｏｆｕｎｄｕｍ、Ｐｓｙｃｈｒｏｆｌｅｘｕｓ ｔｏｒｑｕｉｓ、およびＣａｕｌｏｂａｃｔｅｒ ｃｒｅｓｃｅｎｔｕｓが挙げられる。特定の実施形態では、ＲｅｃＥおよびＲｅｃＴタンパク質は、大腸菌に由来する。

【０２０７】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、ＲｅｃＥまたはその誘導体もしくはバリアントを含む。ＲｅｃＥまたはその誘導体もしくはバリアントは、配列番号１～８からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み得る。ＲｅｃＥまたはその誘導体もしくはバリアントは、配列番号１～８からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％（例えば７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）の類似性を有するアミノ酸配列を含み得る

。選択実施形態では、ＲｅｃＥまたはその誘導体もしくはバリアントは、配列番号１～８からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の類似性を有するアミノ酸配列を含む。例示的な実施形態では、ＲｅｃＥまたはその誘導体もしくはバリアントは、配列番号１～３からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の類似性を有するアミノ酸配列を含む。

【０２０８】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、ＲｅｃＴまたはその誘導体もしくはバリアントを含む。ＲｅｃＴまたはその誘導体もしくはバリアントは、配列番号９～１４からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み得る。ＲｅｃＴまたはその誘導体もしくはバリアントは、配列番号９～１４からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも７０％（例えば７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）の類似性を有するアミノ酸配列を含み得る。選択実施形態では、ＲｅｃＴまたはその誘導体もしくはバリアントは、配列番号９～１４からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の類似性を有するアミノ酸配列を含む。例示的な実施形態では、ＲｅｃＴまたはその誘導体もしくはバリアントは、配列番号９からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の類似性を有するアミノ酸配列を含む。

【０２０９】

特定の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号１６６～配列番号４９１の組換えタンパク質、表９の組換えタンパク質、配列番号１７９、配列番号１８５、配列番号２０５、配列番号３２１、配列番号３５３、配列番号３５９、配列番号３６６、配列番号４２４、もしくは配列番号４７９の組換えタンパク質、または配列番号１６６、配列番号１６８、配列番号１６９、配列番号１７０、配列番号１７１、配列番号２４１、配列番号２５３、配列番号２９０、配列番号４０８、配列番号４１１、もしくは配列番号４４２の組換えタンパク質に対して、少なくとも７５％類似、または少なくとも７５％同一のアミノ酸配列を含む組換えタンパク質を含む。特定の実施形態では、融合タンパク質は、上記で言及された組換えタンパク質に対して少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９８．５％、少なくとも９９％、少なくとも９９．５％、または１００％の類似性または同一性を有する配列を含む組換えタンパク質を含む。短縮は、Ｃ末端もしくはＮ末端のいずれか、またはその両方からであり得る。例えば、以下の実施例６に示されるように、いずれかの末端または両方からの多様な短縮のセットが機能的産物を提供した。いくつかの実施形態では、１またはそれを超える（２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１８、２０、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０またはそれを超える）アミノ酸は、野生型配列と比較した場合、Ｃ末端、Ｎ末端から短縮され得る。

【０２１０】

いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、チロシンリコンビナーゼまたはその機能的断片を含む。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、セリンリコンビナーゼまたはその機能的断片を含む。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、インテグラーゼ、リゾルバーゼもしくはインベルターゼ、またはその機能的断片を含む。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼタンパク質は、部位特異的リコンビナーゼタンパク質またはその機能性断片を含む。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、エキソヌクレアーゼまたはその機能的断片を含む。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、ｓｓＤＮＡ結合タンパク質またはその機能的断片を含む。特定の実施形態では、融合タンパク質は、限定されないが、Ｈｉｎ、Ｇｉｎ、Ｔｎ３、β／ｓｉｘ、ＣｉｎＨ、Ｍｉｎ、ＰａｒＡ、γδ、Ｂｘｂ１、φＣ３１、ＴＰ９０１－１、ＴＧＩ、Ｗβ、φ３７０．１、φＫ３８、φＢＴｌ、Ｒ４、φＲＶｌ、φＦＣｌ、ＭＲ１１、Ａ１１８、Ｕ１５３、Ｂｘｚ２、ｇｐ２９、Ｃｒｅ、Ｄｒｅ、Ｖｉｋａ、Ｆｌｐ、Ｋｗ、ＳｐｒＡ、ＨＫ０２２、Ｐ

２２、Ｌ１、もしくはＬ５、またはそのようなタンパク質のいずれかのホモログもしくはその機能的断片を含む。そのようなリコンビナーゼは、当該技術分野においてインテグラーゼ、リゾルバーゼまたはインベルターゼとして分類され得、エキソヌクレアーゼおよびＳＳＢと部分構造および活性を共有し得、本発明に従って使用され得る。

【０２１１】

本発明は、逆転写酵素、ガイド核酸、および組換えタンパク質、ならびに必要に応じてＣａｓタンパク質を含む系を提供する。

【０２１２】

「逆転写酵素」という用語は、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼとして特徴付けられるポリメラーゼのクラスを表す。全ての公知の逆転写酵素は、ＲＮＡ鋳型からＤＮＡ転写物を合成するためにプライマーを必要とする。歴史的に、逆転写酵素は、ｍＲＮＡをｃＤＮＡに転写するために主に使用されており、その後、更なる操作のためにベクターにクローニングすることができる。トリ骨髄芽球症ウイルス（ＡＭＶ）逆転写酵素は、最初に広く使用されたＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼであった（Ｖｅｒｍａ，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ　４７３：１（１９７７））。酵素は、５’－３’ＲＮＡ指向ＤＮＡポリメラーゼ活性、５－３’ＤＮＡ指向ＤＮＡポリメラーゼ活性、およびＲＮアーゼＨ活性を有する。ＲＮａｓｅ　Ｈは、ＲＮＡ－ＤＮＡハイブリッドのＲＮＡ鎖に特異的な進行性の５’および３’リボヌクレアーゼである（Ｐｅｒｂａｌ，Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ：Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（１９８４））。既知のウイルス逆転写酵素は、プルーフリーディングに必要な３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を欠いているため、転写のエラーは逆転写酵素によって修正することができない（Ｓａｕｎｄｅｒｓ　ａｎｄ　Ｓａｕｎｄｅｒｓ，Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ａｐｐｌｉｅｄ　ｔｏ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｌｏｎｄｏｎ：Ｃｒｏｏｍ　Ｈｅｌｍ（１９８７））。ＡＭＶ逆転写酵素の活性およびその関連するＲＮアーゼＨ活性の詳細な研究は、Ｂｅｒｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　２２：２３６５－２３７２（１９８３）によって提示されている。分子生物学において広く使用されている別の逆転写酵素は、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）に由来する逆転写酵素である。例えば、Ｇｅｒａｒｄ，Ｇ．Ｒ．，ＤＮＡ　５：２７１－２７９（１９８６）ａｎｄ　Ｋｏｔｅｗｉｃｚ，Ｍ．Ｌ．ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　３５：２４９－２５８（１９８５）を参照されたい。ＲＮａｓｅ　Ｈ活性を実質的に欠くＭ－ＭＬＶ逆転写酵素も記載されている。例えば、米国特許第５，２４４，７９７号を参照されたい。本発明は、任意のそのような逆転写酵素、またはそのバリアントもしくは変異体（ＲＴ）の使用を企図する。ＲＴ、および本発明のＲＴ系または組成物等の本発明の実施形態の成分を機能的に連結するためのリンカーまたは方法に関して（ならびにＲＴを含まない本明細書で考察される系または組成物の成分を機能的に連結するためのリンカーまたは方法に関して）、プライム編集およびツインプライム編集として知られるものを含む国際公開２０２０／１９１２４１号、国際公開２０２０／１９１１５３号、国際公開２０２０／１９１２４５号、国際公開２０２０／１９１２４３号、国際公開２０２０／１９１２３３号、国際公開２０２０／１９１２４６号、国際公開２０２０／１９１２４９号、国際公開２０２０／１９１２３９号、国際公開２０２０／１９１２３４号、国際公開２０２０／１９１２４２号、国際公開２０２０／１９１２４８号、国際公開２０２０１９１１７１号、国際公開２０２１／２２６５５８号が言及される。国際公開２０２０／１９１２４１号、国際公開２０２０／１９１１５３号、国際公開２０２０／１９１２４５号、国際公開２０２０／１９１２４３号、国際公開２０２０／１９１２３３号、国際公開２０２０／１９１２４６号、国際公開２０２０／１９１２４９号、国際公開２０２０／１９１２３９号、国際公開２０２０／１９１２３４号、国際公開２０２０／１９１２４２号、国際公開２０２０／１９１２４８号、国際公開２０２０１９１１７１号、国際公開２０２１／２２６５５８号の各々が、参照により本明細書に組み込まれる。国際公開２０２０／１９１２４１号、国際公開２０２０／１９１１５３号、国際公開２０２０／１９１２４５号、国際公開２０２０／１９１２４３号、国際公開２０２０／１９１２３３号、国際公開

２０２０／１９１２４６号、国際公開２０２０／１９１２４９号、国際公開２０２０／１９１２３９号、国際公開２０２０／１９１２３４号、国際公開２０２０／１９１２４２号、国際公開２０２０／１９１２４８号、国際公開２０２０１９１１７１号、国際公開２０２１／２２６５５８号のＲＴを本発明の実施において使用することができる。国際公開２０２０／１９１２４１号、国際公開２０２０／１９１１５３号、国際公開２０２０／１９１２４５号、国際公開２０２０／１９１２４３号、国際公開２０２０／１９１２３３号、国際公開２０２０／１９１２４６号、国際公開２０２０／１９１２４９号、国際公開２０２０／１９１２３９号、国際公開２０２０／１９１２３４号、国際公開２０２０／１９１２４２号、国際公開２０２０／１９１２４８号、国際公開２０２０１９１１７１号、国際公開２０２１／２２６５５８号のリンカーまたは機能的に連結する方法を本発明の実施において使用することができる。Ｃａｓ９、逆転写酵素、ガイドＲＮＡおよび逆転写酵素の活性のためのＲＮＡを含有する系を含む、米国特許出願公開第２０１４／０３４９４００号および米国特許出願公開第２０１８／０２９８３９１号（いずれも参照により本明細書に組み込まれる）も言及され、逆転写酵素およびこれらの初期の系の他の態様を本発明の実施において使用することができる。

【０２１３】

国際公開第２０２０／１９１１５３号は、標的部位を指定するガイドＲＮＡと共に使用するためのＣＲＩＳＰＲタンパク質（例えば、Ｃａｓ９ニッカーゼ）および逆転写酵素を含む系、ならびにガイド核酸（例えば、５’末端もしくは３’末端、またはガイドＲＮＡの内部部分）上に操作された伸長部（ＤＮＡまたはＲＮＡのいずれか）による置換ＤＮＡ鎖の形態での所望の編集の鋳型合成を記載する。ＤＮＡ修復および／または複製機構を介して、標的部位の内因性鎖は、所望の編集を含む新たに合成された置換鎖によって置換される。本発明は、ＣＲＩＳＰＲ媒介性のニッキングも切断も標的ＤＮＡも伴わずに編集するために逆転写酵素と共に使用される一本鎖結合タンパク質（例えば、ＳＳＡＰまたはＳＳＢ）を提供する。

【０２１４】

ＲＴ系および組成物に関する背景：現在のゲノム編集技術は、正確な編集に関して効率および精度が低いために制限されており、ＣＲＩＳＰＲ系等の現在のツールを使用して哺乳動物細胞に正確な置換、欠失、または挿入を導入する能力は非常に信頼性が低い。通常のプロセスは、ゲノム配列に望ましい変化を導入するための遺伝子編集ツール（ＣＲＩＳＰＲ等）およびＤＮＡ修復鋳型の送達を含む。しかしながら、細胞に送達されたＤＮＡは、オフターゲットゲノム遺伝子座または意図しない標的に非特異的に挿入され、治療目的のための安全で正確な遺伝子編集を確実にするための大きな課題につながる可能性がある。

【０２１５】

ＲＴ系および組成物に関する説明：ここで、本出願人らは、遺伝子編集を媒介するための分子実体としてＲＮＡを使用する本発明を説明する。出願人らは、ＳＳＡＰ（ＲｅｃＴ、ラムダＲｅｄ、Ｔ７ｇｐ２．５によって例示される一本鎖アニーリングタンパク質）の活性を介して媒介されるゲノムＤＮＡ配列を挿入、欠失、置換または制御するための鋳型（ドナー）としてＲＮＡを適用するための系および方法の成分を設計および検証した。

【０２１６】

第１の実施形態では、出願人らは、ここで、３つの成分を細胞に送達するプロセスによる遺伝子編集の効率を示す：（１）本出願人らは、ＣＲＩＳＰＲ酵素（切断／ニック／Ｒ－ループ形成のためにそれぞれＣａｓ９／Ｃａｓ９ｎ／ｄＣａｓ９またはＣａｓ１２ａ／ｎＣａｓ１２ａ／ｄＣａｓ１２ａに対応する）およびガイドＲＮＡから構成されるＣＲＩＳＰＲ系を使用して、局所的なＤＮＡ切断、ニッキングまたはＲ－ループ形成を導入し、ガイドＲＮＡは、ＳＳＡＰタンパク質を動員するためのアプタマー（例えば、ＭＳ２、ＰＰ７、またはＢｏｘＢ）を含有し、（２）望ましいＤＮＡ変化を担持するＲＮＡ配列は、（１）のガイドＲＮＡに融合／連結されているか、または第２のガイドＲＮＡに融合／連結されている１またはそれを超える相同アーム（ＨＡ）領域（複数可）を有する。ＨＡ領

域は少なくとも２０ｂｐであり、ＳＳＡＰ媒介性編集のために編集部位の隣に相同領域を提供する。第２のガイドＲＮＡを使用する際、この第２のガイドＲＮＡは、（１）のガイドＲＮＡから０ｂｐ～１５０ｂｐ離れて位置する近くのゲノム部位に結合する。次いで、この第２のガイドＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ酵素（Ｃａｓ９／ｎＣａｓ９／ｄＣａｓ９およびＣａｓ１２ａ／ｎＣａｓ１２ａ／ｄＣａｓ１２ａ等）と複合体を形成し、標的ゲノム遺伝子座に動員され、編集のためのＲＮＡ鋳型／ドナーを提供するのに役立つ。酵素は、通常のＣＲＩＳＰＲ酵素またはＣａｓタンパク質のいずれかであるが、標的遺伝子座にのみ結合するニッキングまたは不活性化ＣＲＩＳＰＲ酵素（ｄＣａｓ９、ｄＣａｓ１２ａ等）であってもよい。ガイドは、標的の切断ではなく効率的な結合を可能にするための通常のガイドＲＮＡまたはより短いガイドＲＮＡ（典型的には、通常のガイドＲＮＡよりも２～６ｂｐ短い、１４ｂｐ～１８ｂｐなど）である。（３）リンカーを介してＲＮＡ－アプタマー結合タンパク質（ＲＢＰ）に融合したＳＳＡＰタンパク質。ＲＢＰは、ＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）、ＰＰ７コートタンパク質（ＰＣＰ）、またはラムダファージ由来のＢｏｘＢ結合ペプチド（ラムダＮ２２ペプチド）である。この成分について、本出願人らはまた、このＲＮＡ鋳型ＳＳＡＰ遺伝子編集を増強する更なる因子を同定し、すなわち、本出願人らが長いペプチドリンカーを介して逆転写酵素（ＲＴ）をＳＳＡＰタンパク質に融合し、この第３の成分ＲＢＰ－ＳＳＡＰ－ＲＴまたはＲＢＰ－ＲＴ－ＳＳＡＰ（－はリンカーを表す）を作製すると、これは編集効率を更に増強する。

【０２１７】

第２の実施形態では、Ｃａｓ９／ｎＣａｓ９／ｄＣａｓ９またはＣａｓ１２ａ／ｎＣａｓ１２ａ／ｄＣａｓ１２ａタンパク質は、リンカーを介して逆転写酵素（ＲＴ）に融合される。この設計のガイドＲＮＡはまた、編集部位の領域に相補的な少なくとも１４ｂｐまたはそれを超えるプライマー結合部位（ＰＢＳ）を有する。このＰＢＳは、ＲＴ活性の開始を助ける。あるいは、別の設計は、第１の実施形態と同じガイドＲＮＡを使用し、ＲＴ活性を開始させ、編集部位の領域に相補的な短いオリゴＤＮＡ（長さは１４ｂｐまたはそれを超える）を細胞に供給する。このオリゴＤＮＡはＲＴ活性を開始し、ＳＳＡＰ媒介遺伝子編集を可能にする。

【０２１８】

第３の実施形態では、Ｃａｓ９／ｎＣａｓ９／ｄＣａｓ９またはＣａｓ１２ａ／ｎＣａｓ１２ａ／ｄＣａｓ１２ａタンパク質は、リンカーを介して、レトロン系からの逆転写酵素（ＲＴ）に融合される。この設計のガイドＲＮＡは、レトロンからのｍｓｒ／ｍｓｄ配列、および編集部位の領域に相補的な１またはそれを超える相同アーム（ＨＡ）領域をも有する。ｍｓｒ／ｍｓｄ配列は、ＲＴ活性を開始するのに役立つ。ＨＡ領域は、ＳＳＡＰ遺伝子編集を媒介するのに役立つ。

【０２１９】

全体として、この一連のツールおよび方法は、真核細胞／哺乳動物細胞における新規かつ進歩性のあるＲＮＡ媒介／ＲＮＡ鋳型遺伝子編集を提供する。本出願人らは更に、内因性ｔＲＮＡ、リボザイム、またはＣａｓ１２ａ系からのダイレクトリピートを使用して切断可能なＲＮＡ鋳型を設計することにより、本出願人らはＲＮＡを鋳型として使用して多重標的遺伝子編集も達成することを実証した。

【０２２０】

ＲＴ系および組成物に関する特徴：出願人のＲＮＡ鋳型ＳＳＡＰ遺伝子編集系には５つの利点がある：（１）ＲＮＡに起因するオフターゲットまたは毒性が減少しており、既存の遺伝子編集プロセスで使用されるＤＮＡと比較して免疫原性が低く、またＲＮＡを意図しないゲノムＤＮＡ部位またはオフターゲットＤＮＡ部位に直接組み込むことができない；（２）本出願人らは、本出願人らの方法において切断可能なＲＮＡ鋳型を使用することによって、正確な遺伝子編集方法を容易に多重化する；（３）ＲＮＡは、細胞内への送達がより容易であり、製造がより容易であり、臨床使用のためのスケールアップがより安価である；（４）ＲＮＡは、化学的結合または生化学的カップリングを介して他の調節または組み合わせペイロード／成分を組み合わせることによって多くの操作可能性を有し、Ｒ

ＮＡ鋳型遺伝子編集と他のタイプの遺伝子編集または治療モダリティとのより効率的な送達、編集または相乗作用を可能にする；ならびに（５）ＲＮＡ鋳型遺伝子編集の効率は、ＲＮＡおよびタンパク質因子を介して増強され得、標的細胞の健康にとって重要であり得る通常のＤＮＡ修復経路に直交する。

【０２２１】

ＲＮＡガイド組換えタンパク質系。特定の実施形態または本発明では、主にＣＲＩＳＰＲタンパク質に依存しないＲＮＡ誘導型リコンビニアリング（ｒｅｃｏｍｂｉｎｅｅｒｉｎｇ）のための系または組成物が提供される。そのような実施形態では、系または組成物は、標的ＤＮＡ配列に相補的なガイドＲＮＡ配列を含む核酸分子および組換えタンパク質を含む。特定の実施形態では、系または組成物は、Ｒループ形成を促進することができる。特定の実施形態では、系または組成物は組換えが可能である。特定の実施形態では、系または組成物はＣＲＩＳＰＲタンパク質を含まない。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、微生物組換えタンパク質を含む。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、ウイルス組換えタンパク質を含む。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、真核生物組換えタンパク質を含む。特定の実施形態では、組換えタンパク質は、ミトコンドリア組換えタンパク質を含む。様々な実施形態において、組換えタンパク質は、一本鎖ＤＮＡアニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ）、エキソヌクレアーゼ、またはそれらの２つもしくはそれより多くの組み合わせを含む。

特定の実施形態では、系または組成物は、Ｃａｓ９を含まない。特定の実施形態では、系または組成物は、Ｃａｓ１２ａを含まない。特定の実施形態では、系または組成物はＣａｓを含まない。特定の実施形態では、系または組成物は、ＣＲＩＳＰＲを含まない。

【０２２２】

理論に拘束されるものではないが、系は、標的ＤＮＡに結合することによってＲループ形成を促進するガイド核酸と、標的核酸とドナー核酸との間の組換えを促進する組換えタンパク質とを含むと考えることができる。

【０２２３】

特定の実施形態では、ガイドＲＮＡおよび組換えタンパク質は、有効に連結される。いくつかの実施形態では、結合は共有結合性である。いくつかの実施形態では、結合は非共有結合性である。特定の実施形態では、ガイド核酸がアプタマー配列を含み、組換えタンパク質がアプタマー結合ドメインを含むかまたはそれに結合している。以下の表は、本発明で使用されるＲループガイド核酸の非限定的な例を提供する。

【表１－１】

表1. Rループガイド核酸配列

設計	説明	配列
リンカーおよびヘアピン形成スペーサーを有する足場、5'末端にガイド		
RL-gRNA-単純 -MS2	Rーループガイド RNA単純ms2（AAACAACリンカーとそれに続く1つのMS2アプタマー）	AAACAAACggccAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAGggcc (配列番号 564)
RL-gRNA-単純 -MS2x2	Rーループガイド RNA二重ms2（AAACAACリンカー、1つのMS2アプタマー、CTGTCTCTCリンカー、別のMS2アプタマー）	AAACAAACggccAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAGggccCTGTCTCTCggccAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAGggcc (配列番号 565)
RL-gRNA-単純-PP7	Rーループガイド RNA単純pp7（AAACAACリンカーとそれに続く1つのPP7アプタマー）	AAACAAACgccagcTAAGGAGTTGATATGGCAACCCTTAgctggc (配列番号 566)
RL-gRNA-単純-PP7x2	Rーループガイド RNA二重pp7（AAACAACリンカー、1つのPP7アプタマー、CTGTCTCTCリンカー、別のPP7アプタマー）	AAACAAACgccagcTAAGGAGTTGATATGGCAACCCTTAgctggcCTGTCTCTCtacgagCAACCAGAAGATATGGCTTCGGTTGctcgta (配列番号 567)

【表１－２】

RL-gRNA-単純-boxB	Rループガイド RNA単純boxB（AAACAACリンカーとそれに続く1つのboxBアプタマー）	AAACAAACggccGCCCTGAAGAAGGGCggcc (配列番号 568)
RL-gRNA-単純-boxBx2	Rーループガイド RNA二重boxB（AAACAACリンカー、1つのboxBアプタマー、CTGTCTCTCリンカー、別のboxBアプタマー）	AAACAAACggccGCCCTGAAGAAGGGC ggccCTGTCTCTCgccagcGCCCTGAAGAA GGGCgctggc (配列番号 569)
リンカーおよびヘアピン形成スペーサーを有する足場、3'末端にガイド		
RL-gRNA-単純-MS2（3プライムーガイド）	Rーループガイド RNA単純ms2（1つのMS2アプタマーとそれに続くAAACAACリンカー）	ggccAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAG ggccAAACAAAC (配列番号 570)
RL-gRNA-単純-MS2x2（3プライムーガイド）	Rーループガイド RNA二重ms2（1つのMS2アプタマー、CTGTCTCTCリンカー、別のMS2アプタマー、AACAACリンカー）	ggccAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAG ggccCTGTCTCTCggccAACATGAGGATC ACCCATGTCTGCAGggccAAACAAAC (配列番号571)
RL-gRNA-単純-PP7（3プライムーガイド）	Rーループガイド RNA単純pp7（1つのPP7アプタマー、AAACAACリンカー）	gccagcTAAGGAGTTGATATGGCAACCCTTA gctggcAAACAAAC (配列番号 572)
RL-gRNA-単純-PP7x2（3プライムーガイド）	Rーループガイド RNA二重pp7（1つのPP7アプタマー、CTGTCTCTCリンカー、別のPP7アプタマー、AACAACリンカー）	gccagcTAAGGAGTTGATATGGCAACCCTTA gctggcCTGTCTCTCtacgagCAACCAGAAGA TATGGCTTCGGTTGctcgtaAAACAAAC (配列番号573)
RL-gRNA-単純-boxB（3プライムーガイド）	Rループガイド RNA単純boxB（1つのboxBアプタマー、AAACAACリンカー）	ggccGCCCTGAAGAAGGGCggccAAACAAAC (配列番号 574)
RL-gRNA-単純-boxBx2（3プライムーガイド）	Rーループガイド RNA二重boxB（1つのboxBアプタマー、CTGTCTCTCリンカー、別のboxBアプタマー、AACAACリンカー）	ggccGCCCTGAAGAAGGGCggccCTGTC TCTCgccagcGCCCTGAAGAAGGGC gctggcAAACAAAC (配列番号 575)
CRISPR RNA 足場		
RL-gRNA-ms2-1	Rーループガイド RNA設計1（2つのMS2アプタマーを有するSpCas9ガイドRNAから適合された元の足場）	gttttagagctaggccAACATGAGGAT CACCCATGTCTGCAGggcctagc AAGTTAAAATAAGGCTAGTCC GTTATCAACTTGAAAAAGTGG CACCGAGTCGGTGCGCGCACA TGAGGATCACCCATGTGC (配列番号576)

【表１－３】

RL-gRNA-ms2-2	Rループガイド RNA設計2（互いに近接した2つのMS2アプタマーを有する強化された足場）	gtttAagagctaggccAACATGAGGATC ACCCATGTCTGCAGggcctagcaagttT aaataaggctagtccgttatcaacttggccAACAT GAGGATCACCCATGTCTGCAG ggccaagtggcaccgagtcggtgc (配列番号 577)
RL-gRNA-ms2-3	Rループガイド RNA設計3（互いに離れた2つのMS2アプタマーを有する強化された足場）	gtttAagagctaggccAACATGAGGATC ACCCATGTCTGCAGggcctagcAAG TTTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGCACCGA GTCGGTGCGCGCACATGAGGAT CACCCATGTGC (配列番号 578)
RL-gRNA-pp7-1	Rループガイド RNA設計1（2つのPP7アプタマーを有する強化された足場）	gtttAagagctaggccggagcagacgatatggcgtc gctccggcctagcAAGTTTAAATAAGGCT AGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGT GGCACCGAGTCGGTGCaacaTAAGG AGTTTATATGGAAACCCTTAtg (配列番号 579)
RL-gRNA-pp7-2	Rループガイド RNA設計2（2つの修飾PP7アプタマーを有する強化された足場）	gtttaagagctatgctgcgaatacgagggagcagacg atatggcgtcgctcctctctccacgagagcatatgggctc cgtggctcgtattcgcagcatagcaagtttaaataaggc tagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgc (配列番号 580)
RL-gRNA-pp7-3	Rループガイド RNA設計3（2つの伸長されたPP7アプタマーを有する強化された足場）	GTTTCAGAGCTACGCACCGgccagc TAAGGAGTTGATATGGCAACCCT TAgcctgctcCAACCAGAAGATATGG CTTCGGTTGgagcagttggcCGGTGCG TAGCAAGTTGAAATAAGGCTAGT CCGTTTACAACTTGAAAAAGTGG CACCCGAGTCGGGTGC (配列番号 581)
RL-gRNA-ms2-pp7	Rループガイド RNA設計（MS2アプタマーおよびPP7アプタマーを有する強化された足場）	gtttAagagctaggccAACATGAGGATCA CCCATGTCTGCAGggcctagcAAGTT TAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAA CTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCaacaTAAGGAGTTTATATGG AAACCCTTAtg (配列番号 582)
RL-gRNA-boxB-1	Rループガイド RNA設計1（boxBアプタマーを有するSpCas9ガイドRNAから適合された元の足場）	GTTTTAGTACTCTGGGCCAGCCCTG AAGAAGGGCCTGCAGGGCCCAGAA TCTACTAGAACAAGGCAAAATGCC GTGTTTATCTCGTCAAGGCCACTGC AGGGCCTTGGCGAGA (配列番号 583)

【表１－４】

RL-gRNA-boxB-2	Rループガイド RNA設計2（2つのboxBアプタマーを有するSpCas9ガイドRNAから適合された元の足場）	GTTTTAGTACTCTGGGCCAGCCCT GAAGAAGGGCCTGCAGGGCCCAG AATCTACTAGAACAAGGCAAAAT GCCGTGTTTATCTCGTCAAGGCCA GCCCTGAAGAAGGGCCTGCAGGG CCTTGGCGAGA (配列番号 584)

【０２２４】

Ｒループ－ガイドＲＮＡは、様々な配置、例えば、ガイド－足場および足場－ガイド構成のガイド成分および足場成分を含む。特定の実施形態では、Ｒループ－ガイドＲＮＡは、足場の５’末端にガイドを含む。特定の実施形態では、Ｒループ－ガイドＲＮＡは、足場の３’末端にガイドを含む。

【０２２５】

ガイド配列は、標的ＤＮＡ（ゲノム標的）に結合するように操作される。特定の実施形態では、ガイドは、１７～１６０塩基である。足場は、１またはそれを超えるアプタマー配列を含む。本発明で使用されるアプタマーとしては、ＭＳ２、ＰＰ７、ＢｏｘＢ等が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、融合タンパク質は、上記のよ

うなアプタマーに結合するＲＮＡ結合成分と、限定されないが、ＲｅｃＴ、ラムダＲｅｄ、Ｔ７ｇｐ２．５等のＳＳＡＰタンパク質とを含む。

【０２２６】

ドナー核酸は、一本鎖または二本鎖ＤＮＡであり得、（１）ゲノム標的領域とマッチする様々な長さの相同アーム（ＨＡ）、および（２）導入遺伝子、例えばノックイン配列または置換配列等を含み得る。導入遺伝子のサイズに制限はない。６００ｂｐ（図７０）および８００ｂｐ（図７１）の挿入物が本明細書において例示される。

【０２２７】

特定の実施形態では、Ｒループ－ガイドＲＮＡは、ＳＳＡＰ等であるがこれに限定されない組換えタンパク質に融合したＲＮＡ結合タンパク質またはドメインに結合する。

【０２２８】

様々な実施形態において、本発明は、融合タンパク質を提供する。融合タンパク質では、組換えタンパク質は、いずれかの向き（例えば、Ｎ末端からＣ末端、Ｃ末端からＮ末端、Ｎ末端からＮ末端）でアプタマー結合タンパク質のいずれかの末端に連結され得る。選択実施形態では、組換えタンパク質Ｎ末端は、アプタマー結合タンパク質Ｃ末端に連結される。したがって、Ｎ末端からＣ末端への全体的な融合タンパク質は、組換えタンパク質（Ｎ末端からＣ末端）に連結されたアプタマー結合タンパク質（Ｎ末端からＣ末端）を含む。

【０２２９】

いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、融合タンパク質またはキメラもしくはキメラ分子としてヌクレアーゼに機能的に連結され得る。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、融合タンパク質またはキメラもしくはキメラ分子としてエンドヌクレアーゼに機能的に連結され得る。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、融合タンパク質またはキメラもしくはキメラ分子としてエキソヌクレアーゼに機能的に連結され得る。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、融合タンパク質またはキメラもしくはキメラ分子として、ヌクレアーゼおよび／またはＣａｓもしくはｄＣａｓに機能的に連結され得る。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、融合タンパク質またはキメラもしくはキメラ分子として、エンドヌクレアーゼおよび／またはＣａｓもしくはｄＣａｓに機能的に連結され得る。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、融合タンパク質またはキメラもしくはキメラ分子として、エキソヌクレアーゼおよび／またはＣａｓもしくはｄＣａｓに機能的に連結され得る。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、ヌクレアーゼとの融合タンパク質ではなく、独立して発現され得る。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、エンドヌクレアーゼとの融合タンパク質ではなく、独立して発現され得る。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、エキソヌクレアーゼとの融合タンパク質ではなく、独立して発現され得る。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、ヌクレアーゼおよび／またはＣａｓもしくはｄＣａｓとの融合タンパク質としてではなく、独立して発現され得る。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、融合タンパク質またはキメラもしくはキメラ分子として、アプタマーおよび／またはアプタマー結合タンパク質に機能的に連結され得る。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、アプタマーおよび／またはアプタマー結合タンパク質との融合タンパク質としてではなく、独立して発現され得る。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、融合タンパク質またはキメラまたはキメラ分子として、ヌクレアーゼおよび／またはＣａｓもしくはｄＣａｓおよび／またはアプタマーおよび／またはアプタマー結合タンパク質に機能的に連結され得る。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、ヌクレアーゼおよび／またはＣａｓもしくはｄＣａｓおよび／またはアプタマーおよび／またはアプタマー結合タンパク質との融合タンパク質としてではなく、独立して発現され得る。いくつかの実施形態では、アプタマーおよび／またはアプタマー結合タンパク質は、ＭＣＰタンパク質である。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、ＳＳＡＰであり得る。

【０２３０】

本明細書で使用される場合、「ヌクレアーゼ」という用語は、核酸分子内のヌクレオチ

ド残基を結合するホスホジエステル結合を切断することができる、タンパク質または小分子等の作用物質を指す。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼは、例えば、核酸分子に結合し、核酸分子内のヌクレオチド残基を連結するホスホジエステル結合を切断することができる酵素であるが、組み立てられている（ｗｏｖｅｎ）。ヌクレアーゼは、ポリヌクレオチド鎖のホスホジエステル結合を切断するエンドヌクレアーゼ、またはポリヌクレオチド鎖の末端のホスホジエステル結合を切断するエキソヌクレアーゼであってもよい。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼは、特定のヌクレオチド配列（本明細書において「認識配列」、「ヌクレアーゼ標的部位」、または「標的部位」とも呼ばれる）内の特定のホスホジエステル結合に結合し、および／または特定のヌクレオチド配列内の特定のホスホジエステル結合を切断する部位特異的ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼは、標的部位に相補的な配列を有するＲＮＡに複合体化し（例えば、結合し）、それによってヌクレアーゼの配列特異性を提供するＲＮＡガイド（例えば、ＲＮＡ－プログラマブル）ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼは一本鎖標的部位を認識し、他の実施形態では、ヌクレアーゼは二本鎖標的部位、例えば二本鎖ＤＮＡ標的部位を認識する。多くの天然に存在するヌクレアーゼ、例えば多くの天然に存在するＤＮＡ制限ヌクレアーゼの標的部位は、当業者に周知である。多くの場合、ＥｃｏＲＩ、ＨｉｎｄＩＩＩまたはＢａｍＨＩ等のＤＮＡヌクレアーゼは、４～１０塩基対長のパリンドローム二本鎖ＤＮＡ標的部位を認識し、標的部位内の特定の位置で２本のＤＮＡ鎖の各々を切断する。いくつかのエンドヌクレアーゼは、二本鎖核酸標的部位を対称的に切断し、例えば、両方の鎖を同じ位置で切断し、その結果、末端は塩基対合したヌクレオチドを含み、本明細書では平滑末端とも呼ばれる。他のエンドヌクレアーゼは、二本鎖核酸標的部位を非対称的に切断する、例えば、各鎖は、末端が、対合していないヌクレオチドを含有するように異なる位置で切断される。二本鎖ＤＮＡ分子の末端の対合していないヌクレオチドは、対合していないヌクレオチドが対応するＤＮＡ鎖の５’末端または３’末端を形成するかどうかに応じて、「オーバーハング」、例えば「５’オーバーハング」または「３’－オーバーハング、」とも呼ばれる。対合していないヌクレオチドで終端する二本鎖ＤＮＡ分子の末端は、粘着末端とも呼ばれ、相補的な対合していないヌクレオチドを含有する他の二本鎖ＤＮＡ分子の末端に「付着する（ｓｔｉｃｋ）」ことができる。ヌクレアーゼタンパク質は、典型的には、タンパク質と核酸基質との相互作用を媒介する「結合ドメイン」（場合によっては標的部位にも特異的に結合する）および核酸骨格内のホスホジエステル結合の切断を触媒する「切断ドメイン」を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼタンパク質は、単量体形態の核酸分子に結合して切断することができるが、他の実施形態では、ヌクレアーゼタンパク質は、標的核酸分子を二量体化するか、または他の方法で切断しなければならない。天然に存在するヌクレアーゼの結合ドメインおよび切断ドメイン、ならびに融合してヌクレアーゼを生成することができるモード結合ドメインおよび切断ドメインは、当業者に周知である。例えば、ジンクフィンガーまたは転写アクチベーター様エレメントを結合ドメインとして使用して、所望の標的部位に特異的に結合し、ｆｏｋｌの切断ドメイン等の切断ドメインに融合またはコンジュゲートして、標的部位を切断する操作されたヌクレアーゼを作製することができる。

【０２３１】

エキソヌクレアーゼの非限定的な例としては、エキソヌクレアーゼＩ、エキソヌクレアーゼＩＩ、エキソヌクレアーゼＩＩＩ、エキソヌクレアーゼＩＶ、エキソヌクレアーゼＶ、エキソヌクレアーゼＶＩＩ、エキソヌクレアーゼＶＩＩＩ、ラムダエキソヌクレアーゼ、Ｘｒｎ１、マングビーンヌクレアーゼ、ＴＲＥＸ２、エキソヌクレアーゼＴ、Ｔ７エキソヌクレアーゼ、ストランダーゼ（ｓｔｒａｎｄａｓｅ）エキソヌクレアーゼ、３’－５’エキソホスホジエステラーゼ、およびＢａｌ３１ヌクレアーゼが挙げられる。

【０２３２】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、組換えタンパク質とアプタマー結合タンパク質との間にリンカーをさらに含む。リンカーは、いずれかの長さのいずれかのアミノ酸配列を含み得る。リンカーは、それらがいずれかの特定の向きで一緒に連結する２つの

構成成分の何れも拘束しないように柔軟であり得る。リンカーは、本質的にスペーサーとして作用し得る。選択実施形態では、リンカーは、組換えタンパク質のＣ末端をアプタマー結合タンパク質のＮ末端に連結する。選択実施形態では、リンカーは、１６残基のＸＴＥＮリンカー、ＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳ（配列番号１５）または３７残基のＥＸＴＥＮリンカー、ＳＡＳＧＧＳＳＧＧＳＳＧＳＥＴＰＧＴＳＥＳＡＴＰＥＳＳＧＧＳＳＧＧＳＧＧＳ（配列番号１４８）のアミノ酸配列を含む。

【０２３３】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、核局在化配列（ＮＬＳ）をさらに含む。核局在化配列は、融合タンパク質内のいずれかの位置にあり得る（例えば、アプタマー結合タンパク質のＣ末端、アプタマー結合タンパク質のＮ末端、組換えタンパク質のＣ末端）。選択実施形態では、核局在化配列は、組換えタンパク質のＣ末端に連結される。いくつかの核局在化配列が当技術分野で公知であり（例えば、参照により本明細書中に組み込まれるＬａｎｇｅ，Ａ．ら、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２００７；２８２（８）：５１０１－５１０５）、本発明に関連して使用され得る。核局在化配列は、ＳＶ４０ ＮＬＳ、ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号１６）であり得；Ｔｙ１ ＮＬＳ、ＮＳＫＫＲＳＬＥＤＮＥＴＥＩＫＶＳＲＤＴＷＮＴＫＮＭＲＳＬＥＰＰＲＳＫＫＲＩＨ（配列番号１７）；ｃ－Ｍｙｃ ＮＬＳ、ＰＡＡＫＲＶＫＬＤ（配列番号１８）；ｂｉＳＶ４０ ＮＬＳ、ＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号１９）；およびＭｕｔ ＮＬＳ、ＰＥＫＫＲＲＲＰＳＧＳＶＰＶＬＡＲＰＳＰＰＫＡＧＫＳＳＣＩ（配列番号２０）であり得る。選択実施形態では、核局在化配列は、ＳＶ４０ ＮＬＳ、ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号１６）である。

【０２３４】

Ｃａｓタンパク質および融合タンパク質は、望ましくは、単一組成物中で単独で含まれるか、互いに、および／またはガイドＲＮＡ配列およびアプタマー配列を含むポリヌクレオチド（例えばベクター）と組み合わせて含まれる。Ｃａｓタンパク質および／または融合タンパク質は、ポリヌクレオチドに物理的または化学的に結合し得るかまたは結合し得ない。Ｃａｓタンパク質および／または組換えタンパク質は、当技術分野で公知のタンパク質－タンパク質連結またはタンパク質－ウイルス連結のための任意の適切な方法を使用してポリヌクレオチドと会合され得る。

【０２３５】

本発明はさらに、ＲＮＡアプタマー結合タンパク質に機能的に連結された微生物組換えタンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを含む組成物およびベクターを提供する。

【０２３６】

本組成物またはベクターは、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドおよび標的ＤＮＡ配列に相補的であるガイドＲＮＡ配列を含む核酸分子の少なくとも一方または両方をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡ配列を含む核酸分子は、少なくとも１つのＲＮＡアプタマー配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドは、少なくとも１つのペプチドアプタマー配列をコードする配列をさらに含む。

【０２３７】

本発明の系に関連して上に記載したガイドＲＮＡ配列、アプタマー配列、Ｃａｓタンパク質、組換えタンパク質およびアプタマー結合タンパク質を含む核酸分子の説明は、列挙した組成物およびベクターのポリヌクレオチドにも適用可能である。

【０２３８】

Ｃａｓタンパク質をコードする核酸配列および／またはアプタマー結合タンパク質に機能的に連結された組換えタンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸配列は、ガイドＲＮＡ配列および／またはＲＮＡアプタマー配列を含む核酸分子と同じベクター（例えばシス）上で細胞に提供され得る。このような実施形態では、各核酸配列の発現を制御するために、一方向性プロモーターを使用することができる。別の実施形態では、複数の核酸配列の発現を制御するために、双方向性プロモーターと一方向性プロモーターの組み合

わせを使用することができる。

【０２３９】

他の実施形態では、Ｃａｓタンパク質をコードする核酸配列、アプタマー結合タンパク質に機能的に連結された組換えタンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸配列、およびガイドＲＮＡ配列および／またはＲＮＡアプタマー配列を含む核酸分子は、別個のベクター上で（例えばトランスで）細胞に提供され得る。別個のベクターの各々における核酸配列の各々は、同一のまたは異なる発現制御配列を含むことができる。別個のベクターは、同時にまたは逐次に細胞に提供することができる。

【０２４０】

Ｃａｓタンパク質をコードし、アプタマー結合タンパク質に機能的に連結された組換えタンパク質を含む融合タンパク質をコードする核酸配列を含むベクターは、それによってコードされるポリペプチドを発現可能である宿主細胞（いずれかの適切な原核細胞または真核細胞を含む）に導入され得る。したがって、本発明は、本明細書に開示されるベクターまたは核酸配列を含む単離された細胞を提供する。好ましい宿主細胞は、容易かつ確実に成長させることができ、適度に速い成長速度を有し、十分に特徴付けられた発現系を有し、容易かつ効率的に形質転換または形質移入することができるものである。適切な原核細胞の例には、Ｂａｃｉｌｌｕｓ属（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓおよびＢａｃｉｌｌｕｓ　ｂｒｅｖｉｓなど）、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属（大腸菌など）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ属、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ属、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ属およびＥｎｖｉｎｉａ属からの細胞が含まれるが、これらに限定されない。適切な真核細胞は当技術分野で公知であり、例えば、酵母細胞、昆虫細胞および哺乳動物細胞が含まれる。適切な酵母細胞の例には、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ属、Ｐｉｃｈｉａ属、Ｒｈｉｎｏ－ｓｐｏｒｉｄｉｕｍ属、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ属およびＳｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ属からの細胞が含まれる。例示的な昆虫細胞には、Ｓｆ－９およびＨＩＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，Ｃａｌｉｆ．）が含まれ、例えば、本明細書に参考として援用されるＫｉｔｔｓら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，１４：８１０－８１７（１９９３）；Ｌｕｃｋｌｏｗ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，４：５６４－５７２（１９９３）；およびＬｕｃｋｌｏｗら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６７：４５６６－４５７９（１９９３）に記載されている。望ましくは、宿主細胞は哺乳動物細胞であり、いくつかの実施形態において、宿主細胞はヒト細胞である。多くの適切な哺乳動物およびヒト宿主細胞が当技術分野で公知であり、多くはアメリカ培養細胞系統保存機関（ＡＴＣＣ、Ｍａｎａｓｓａｓ、Ｖａ．）から入手可能である。適切な哺乳動物細胞の例には、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ６１）、ＣＨＯ　ＤＨＦＲ細胞（Ｕｒｌａｕｂら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９７：４２１６－４２２０（１９８０））、ヒト胎児由来腎臓（ＨＥＫ）２９３または２９３Ｔ細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ１５７３）および３Ｔ３細胞（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ９２）が含まれるが、これらに限定されない。他の適切な哺乳動物細胞系は、サルＣＯＳ－１（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ１６５０）およびＣＯＳ－７細胞系（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ１６５１）、ならびにＣＶ－１細胞系（ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ７０）である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞には、形質転換された細胞系を含む、霊長類、齧歯類およびヒト細胞系が含まれる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養に由来する細胞株、ならびに初代外植片も適切である。他の適切な哺乳動物細胞系には、マウス神経芽細胞腫Ｎ２Ａ細胞、ＨｅＬａ、ＨＥＫ、Ａ５４９、ＨｅｐＧ２、マウスＬ－９２９細胞、およびＢＨＫまたはＨａＫハムスター細胞系が含まれるが、これらに限定されない。適切な哺乳動物宿主細胞を選択するための方法、ならびに細胞の形質転換、培養、増幅、スクリーニングおよび精製のための方法は、当技術分野で公知である。

【０２４１】

標的ＤＮＡを改変する方法

本発明はまた、標的ＤＮＡを改変する方法も提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞中のゲノムＤＮＡ配列を改変するが、任意の所望の核酸が修飾され得る。細胞

に含有されるＤＮＡに適用される場合、本方法は、標的ゲノムＤＮＡ配列を含む細胞に本明細書中に記載の系、組成物またはベクターを導入することを含む。本発明の系に関連して上に記載された、ガイドＲＮＡ配列を含む核酸分子、Ｃａｓタンパク質、組換えタンパク質、動員系およびそれらをコードするポリヌクレオチド、細胞、標的ゲノムＤＮＡ配列およびそれらの構成成分の説明は、細胞において標的ゲノムＤＮＡ配列を改変する方法にも適用可能である。系、組成物またはベクターは、細胞型に応じて、化学的形質移入、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、遺伝子銃を介したバイオリスティック送達または磁気支援形質移入を含むが限定されない、当技術分野で公知のいずれかの方式で導入され得る。

【０２４２】

特定の実施形態では、編集系または成分の送達は、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体の送達を含む。本発明によれば、限定されないが、ｇＲＮＡ、ｄｇＲＮＡを含む標的化核酸を、限定されないが、Ｃａｓ９またはｄＣａｓ９を含む複合体等の複合体中に提供することができる。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、ガイド核酸およびＣａｓ９融合タンパク質、例えば、限定されないが、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを含む複合体を含む。特定の実施形態では、ＲＮＰ複合体は、ガイド核酸と、ガイド核酸に結合するように適合または修飾され得る組換えタンパク質、例えばＳＳＡＰまたはＳＳＢとを含む。特定の実施形態では、ガイド核酸および組換えタンパク質またはＣａｓ９融合タンパク質は、複合体形成を促進する結合エレメントを含む。非限定的な例では、組換えタンパク質はＭＣＰドメインを含み、ガイドＲＮＡはＭＳ２アプタマーを含み、それによりＭＳ２アプタマーのＭＣＰドメインへの結合はＲＮＰを生成する。

【０２４３】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡとＣａｓおよび／または組換えタンパク質ポリペプチドとを一緒にインキュベートしてリボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を形成した後、細胞に導入し、例えば容器内で一緒に混合してＲＮＰ複合体を形成し、次いでＲＮＰ複合体を細胞に導入する。他の実施形態では、本明細書に記載のＣａｓポリペプチドは、ＣａｓポリペプチドをコードするｍＲＮＡであり得、Ｃａｓ　ｍＲＮＡは、「Ａｌｌ　ＲＮＡ」ＣＲＩＳＰＲ系として修飾ｓｇＲＮＡと共に初代細胞に導入される。

【０２４４】

いくつかの実施形態では、ＲＮＰ複合体およびドナー核酸またはベクターは、細胞に同時に導入される。他の実施形態では、ＲＮＰ複合体およびドナー核酸またはベクターは、初代細胞に順次導入される。いくつかの例では、ＲＮＰ複合体は、ドナーの前に初代細胞に導入される。他の例では、ドナーは、ＲＮＰ複合体の前に初代細胞に導入される。例えば、ＲＮＰ複合体は、ドナー核酸またはベクターの約１分前、約２分前、約３分前、約４分前、約５分前、約６分前、約７分前、約８分前、約９分前、約１０分前、約１１分前、約１２分前、約１３分前、約１４分前、約１５分前、約１６分前、約１７分前、約１８分前、約１９分前、約２０分前、約２５分前、約３０分前、約３５分前、約４０分前、約４５分前、約５０分前、約５５分前、約６０分前、約９０分前、約１２０分前、約１５０分前、約１８０分前、約２１０分前、もしくは約２４０分前またはそれより前に細胞に導入することができ、またはその逆も可能である。米国特許第１１，１９３，１４１号は、標的化組み込みを媒介するための、ＲＮＰ複合体および相同ドナーアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターの細胞への導入を記載している。記載された方法は、本発明と共に使用することができる。米国特許出願公開第２０１９／００９３１２８号は、接合体のゲノムＤＮＡ内の標的配列にハイブリダイズする対応するＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡと複合体を形成したクラス２　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエンドヌクレアーゼを含むリボ核タンパク質（ＲＮＰ）を接合体に導入することを記載している。

【０２４５】

非限定的な例としては、（１）精製Ｃａｓ９またはｄＣａｓ９タンパク質；（２）ＭＳ２アプタマーを有する合成ガイドＲＮＡ；（３）精製ＭＣＰ－ＳＳＡＰ融合タンパク質；（４）ノックイン編集のためにＨＥＫ２９３、Ｋ５６２および初代造血幹細胞（マウスお

よびヒト）に送達されるドナーＤＮＡ（ＨＥＫ２９３およびＫ５６２に対する二本鎖一本鎖ＤＮＡドナー、ならびにＨＳＣに対するＡＡＶドナー）の使用が挙げられる。

【０２４６】

以下の表は、ＡＬＢおよびＡＡＶＳ１を含むノックインを生成するための例示的な配列を提供する。配列を、発現のために、ＲＮＰ、核酸、ベクター等において使用することができる。

【表２－１】

表2. ノックインのための配列

名称	注記	配列
アルブミンガイドRNA	SpCas9 ガイドRNA	GACTGAAACTTCACAGAATA (配列番号585)
AAVS1ガイドRNA	SpCas9 ガイドRNA	CACCCCACAGTGGGGCCACT (配列番号586)
アルブミン(ALB)ルシフェラーゼノックインドナー	相同アーム(左)ースプライスアクセプターーリンカーールシフェラーゼ(Gaussiaー Dura Luc)ーbGHポリAー相同アーム(右)	GGGACTTAACTCTTTCAGTATGTCTTATTTCTAAG CAAAGTATTTAGTTTGGTTAGTAATTACTAAACAC TGAGAACTAAATTGCAAACACCAAGAACTAAAAT GTTCAAGTGGGAAATTACAGTTAAATACCATGGT AATGAATAAAAGGTACAAATCGTTTAAACTCTTA TGTAAAATTTGATAAGATGTTTTACACAACTTTAA TACATTGACAAGGTCTTGTGGAGAAAACAGTTCC AGATGGTAAATATACACAAGGGATTTAGTCAAAC AATTTTTTTGGCAAGAATATTATGAATTTTGTAATC GGTTGGCAGCCAATGAAATACAAAGATGAGTCTA GTTAATAATCTACAATTATTGGTTAAAGAAGTATA TTAGTGCTAATTTCCCTCCGTTTGTCCTAGCTTTTC TCTTCTGTCAACCCCACACGCCTTTGGCACAATGA

【表２－２】

		AGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTTCTCTTTA GCTCGGCTTATTCCAGGGGTGTGTTTCGTCGAGAT GCACGTAAGAAATCCATTTTTCTATTGTTCAACTT TTATTCTATTTTCCCAGTAAAATAAAGTTTTAGTA AACTCTGCATCTTTAAAGAATTATTTTGGCATTTA TTTCTAAAATGGCATAGTATTTTGTATTTGTGAAG TCTTACAAGGTTATCTTATTAATAAAATTCAAACA TCCTAGGTaaaaaaaaaaaaaGGTCAGAATTGTTTAGTG ACTGTAATTTTCTTTTGCGCACTAAGGAAAGTGCA AAGTAACTTAGAGTGACTGAAACTTCACAGAGCT AGCctgacctcttctcttcctcccacagggctcgagagatctggcagcggaatg ggagtcaaagttctgtttgccctgatctgcatcgctgtggccgaggccaagcccac cgagaacaacgaagacttcaacatcgtggccgtggccagcaacttcgcgaccac ggatctcgatgctgaccgcgggaagttgcccggcaagaagctgccgctggaggt gctcaaagagctggaagccaatgcccggaaagctggctgcaccaggggctgtct gatctgcctgtcccacatcaagtgcacgcccaagatgaagaagttcatcccagga cgctgccacacctacgaaggcgacaaagagtccgcacagggcggcataggcga ggcgatcgtcgacattcctgagattcctgggttcaaggacttggagcccctggagc agttcatcgcacaggtcgatctgtgtgtggactgcacaactggctgcctcaaaggg cttgccaacgtgcagtgttctgacctgctcaagaagtggctgccgcaacgctgtgc gacctttgccagcaagatccagggccaggtggacaagatcaaggggccggtg gtgacTAAAACGCGTtagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttcta gttgccagccatctgttgtttgcccctccccgtgccttccttgaccctggaaggtgc cactcccactgtccttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggt gtcattctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattggg aagagaatagcaggcatgctggggaGGATCCATAGGGTTGAAG ATTGAATTCATAACTATCCCAAAGACCTATCCATT GCACTATGCTTTATTTAAAAACCACAAAACCTGTG CTGTTGATCTCATAAATAGAACTTGTATTTATATT TATTTTCATTTTAGTCTGTCTTCTTGGTTGCTGTTG ATAGACACTAAAAGAGTATTAGATATTATCTAAG TTTGAATATAAGGCTATAAATATTTAATAATTTTT AAAATAGTATTCTTGGTAATTGAATTATTCTTCTG TTTAAAGGCAGAAGAAATAATTGAACATCATCCT GAGTTTTTCTGTAGGAATCAGAGCCCAATATTTTG AAACAAATGCATAATCTAAGTCAAATGGAAAGAA ATATAAAAAGTAACATTATTACTTCTTGTTTTCTT CAGTATTTAACAATCCttttttttCTTCCCTTGCCCAGAC AAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATTTGG GAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGTAAGTTAAAAT ATTGATGAATCAAATTTAATGTTTCTAATAGTGTT GTTTATTATTCTAAAGTGCTTATATTTCCTTGTCAT CAGGGTTCAGATTCTAAAAcagtgctgcctcgtagagttttctgc gttgaggaagatattctgtatctgggctatccaataaggtagtcactggtcacatggc tattgagtacttcaaatatgacaagtgcaactgagaaacaaaaacttaaattgtattta

10

20

30

40

50

【表２－３】

		attgtagttaatttgaatgtatatagtcacatgtggctaatggctactgtattggacagt acag (配列番号 587)
アルブミン（ALB） mKate蛍光タン パク質ノックインド ナー	相同アーム（左）－ス プライスアクセプター －リンカー－mKate －bGHポリA－相同 アーム（右）	GGGACTTAACTCTTTCAGTATGTCTTATTTCTAAG CAAAGTATTTAGTTTGGTTAGTAATTACTAAACAC TGAGAACTAAATTGCAAACACCAAGAACTAAAAT GTTCAAGTGGGAAATTACAGTTAAATACCATGGT AATGAATAAAAGGTACAAATCGTTTAAACTCTTA TGTAAAATTTGATAAGATGTTTTACACAACTTTAA TACATTGACAAGGTCTTGTGGAGAAAACAGTTCC AGATGGTAAATATACACAAGGGATTTAGTCAAAC AATTTTTTGGCAAGAATATTATGAATTTTGTAATC GGTTGGCAGCCAATGAAATACAAAGATGAGTCTA GTTAATAATCTACAATTATTGGTTAAAGAAGTATA TTAGTGCTAATTTCCCTCCGTTTGTCCTAGCTTTC TCTTCTGTCAACCCCACACGCCTTTGGCACAATGA AGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTTCTCTTTA GCTCGGCTTATTCCAGGGGTGTGTTTCGTCGAGAT GCACGTAAGAAATCCATTTTTCTATTGTTCAACTT TTATTCTATTTTCCCAGTAAAATAAAGTTTTAGTA AACTCTGCATCTTTAAAGAATTATTTTGGCATTTA TTTCTAAAATGGCATAGTATTTTGTATTTGTGAAG TCTTACAAGGTTATCTTATTAATAAAATTCAAACA TCCTAGGTaaaaaaaaaaaaaGGTCAGAATTGTTTAGTG ACTGTAATTTTCTTTTGCGCACTAAGGAAAGTGCA AAGTAACTTAGAGTGACTGAAACTTCACAGAGCT AGCctgacctcttctcttcctcccacagggctcgagGGAAGCGGAGC TACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGAC GTGGAGGAGAACCCTGGACCTgccaccatggtgagcgagctg attaaggagaacatgcacatgaagctgtacatggagggcaccgtgaacaaccac cacttcaagtgcacatccgagggcgaaggcaagccctacgagggcacccagac catgagaatcaaggcggtcgagggcggccctctcccccttcgccttcgacatcctg gctaccagcttcatgtacggcagcaaaaccttcatcaaccacacccagggcatcc ccgacttctttaagcagtccttccccgagggcttcacatgggagagtcaccaca tacgaagatggggcgtgctgaccgctacccaggacaccagcctccaggacgg ctgcctcatctacaacgtcaagatcagaggggtgaacttcccatccaacggccctg tgatgcagaagaaaacactcggctgggaggcctccaccgagacactgtaccccg ctgacggcggcctggaaggcagagccgacatggccctgaagctcgtgggcggg ggccacctgatctgcaaccttaagaccacatacagatccaagaaacccgctaaga acctcaagatgcccggcgtctactatgtggacaggagactggaaagaatcaagga ggccgacaaagagacatacgtcgagcagcacgaggtggctgtggccagatact gcgacctccctagcaaactggggcacaaacttaattccTAaGGATCCAT AGGGTTGAAGATTGAATTCATAACTATCCCAAAG ACCTATCCATTGCACTATGCTTTATTTAAAAACCA CAAAACCTGTGCTGTTGATCTCATAAATAGAACTT GTATTTATATTTATTTTCATTTTAGTCTGTCTTCTT

【表２－４】

		GGTTGCTGTTGATAGACACTAAAAGAGTATTAGA TATTATCTAAGTTTGAATATAAGGCTATAAATATT TAATAATTTTTAAAATAGTATTCTTGGTAATTGAA TTATTCTTCTGTTTAAAGGCAGAAGAAATAATTGA ACATCATCCTGAGTTTTTCTGTAGGAATCAGAGCC CAATATTTTGAAACAAATGCATAATCTAAGTCAA ATGGAAAGAAATATAAAAAGTAACATTATTACTT CTTGTTTTCTTCAGTATTTAACAATCCttttttttCTTCC CTTGCCCAGACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTT AAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGT AAGTTAAAATATTGATGAATCAAATTTAATGTTTC TAATAGTGTTGTTTATTATTCTAAAGTGCTTATATT TCCTTGTCATCAGGGTTCAGATTCTAAAAcagtgctgcc tcgtagagttttctgcgttgaggaagatattctgtatctgggctatccaataaggtagt cactggtcacatggctattgagtacttcaaatatgacaagtgcaactgagaaacaaa aacttaaattgtatttaattgtagttaatttgaatgtatatagtcacatgtggctaatggct actgtattggacagtacag (配列番号 588)
AAVS1ルシフェラーゼノックインドナー	相同アーム（左）－スプライスアクセプター－リンカー－ルシフェラーゼ（Gaussia－Dura Luc）－bGHポリA－相同アーム（右）	tgctttctctgaccagcattctctcccctgggcctgtgccgctttctgtctgcagcttgt ggcctgggtcacctctacggctggcccagatccttccctgccgcctccttcaggttc cgtcttcctccactccctcttcccccttgctctctgctgtgttgctgcccaaggatgctct ttccggagcacttccttctcggcgctgcaccacgtgatgtcctctgagcggatcctc cccgtgtctgggtcctctccgggcatctctcctccctcacccaaccccatgccgtctt cactcgctgggttcccttttccttctccttctggggcctgtgccatctctcgtttcttagg atggccttctccgacggatgtctcccttgcgtcccgcctcccctttcttgtaggcctgc atcatcaccgttttttctggacaaccccaaagtaccccgtctccctggctttagccacc tctccatcctcttgctttctttgcctggacaccccgttctcctgtggattcgggtcacct ctcactcctttcatttgggcagctcccctaccccccttacctctctagtctgtgctagct cttccagccccctgtcatggcatcttccaggggtccgagagctcagctagtcttcttc ctccaacccgggcccctatgtccacttcaggacagcatgtttgctgcctccagggga tcctgtgtccccgagctgggaccaccttatattcccagggccggttaatgtggctct ggttctgggtacttttatctgtcccctccaccccacagtggggcaagcttctgacctc ttctcttcctcccacagggcctcgagagatctatgggagtcaaagttctgtttgccct gatctgcatcgctgtggccgaggccaagcccaccgagaacaacgaagacttcaa catcgtggccgtggccagcaacttcgcgaccacggatctcgatgctgaccgcgg gaagttgcccggcaagaagctgccgctggaggtgctcaaagagctggaagcca atgcccggaaagctggctgcaccaggggctgtctgatctgcctgtcccacatcaa gtgcacgcccaagatgaagaagttcatcccaggacgctgccacacctacgaagg cgacaaagagtccgcacagggcggcataggcgaggcgatcgtcgacattcctga gattcctgggttcaaggacttggagccccctggagcagttcatcgcacaggtcgatc tgtgtgtggactgcacaactggctgcctcaaagggcttgccaacgtgcagtgttctg acctgctcaagaagtggctgccgcaacgctgtgcgacctttgccagcaagatcca gggccaggtggacaagatcaaggggggccggtggtgacTAAAACGCGT tagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcc cctccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtccttcctaata aaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgg

【表２－５】

		ggtggggcaggacagcaaggggaggattgggaagagaatagcaggcatgct ggggaGGTACCggctagagcggccgcactagggacaggattggtgacag aaaagccccatccttaggcctcctccttcctagtctcctgatattgggtctaaccccc acctcctgttaggcagattccttatctggtgacacacccccatttcctggagccatct ctctccttgccagaacctctaaggtttgcttacgatggagccagagaggatcctgg gagggagagcttggcaggggggtgggagggaaggggggggatgcgtgacctgcc cggttctcagtggccaccctgcgctaccctctcccagaacctgagctgctctgacg cggctgtctggtgcgtttcactgatcctggtgctgcagcttccttacacttcccaaga ggagaagcagtttggaaaaacaaaatcagaataagttggtcctgagttctaactttg gctcttcacctttctagtccccaatttatattgttcctccgtgcgtcagttttacctgtga gataaggccagtagccagccccgtcctggcagggctgtggtgaggaggggggt gtccgtgtggaaaactccctttgtgagaatggtgcgtcctaggtgttcaccaggtcg tggccgcctctactccctttctctttctccatccttctttccttaaagagtccccagtgct atctgggacatattcctccgcccagagcagggtcccgcttccctaaggccctgctc tgggcttctgggtttgagtccttggcaagcccaggagaggcgctcaggcttccctg tcccccttcctcgtccaccatctcatgcccctggctctcctgccccttcctacaggg gttcctggctctgctct (配列番号 589)
AAVS1 mKate蛍光タンパク質ノックインドナー	相同アーム（左）ースプライスアクセプターーリンカーーmKateーbGHポリAー相同アーム（右）	tgctttctctgaccagcattctctcccctgggcctgtgccgctttctgtctgcagcttgt ggcctgggtcacctctacggctggcccagatccttccctgccgcctccttcaggttc cgtcttcctccactccctcttcccccttgctctctgctgtgttgctgcccaaggatgctct ttccggagcacttccttctcggcgctgcaccacgtgatgtcctctgagcggatcctc cccgtgtctgggtcctctccgggcatctctcctccctcacccaaccccatgccgtctt cactcgctgggttcccttttccttctccttctggggcctgtgccatctctcgtttcttagg atggccttctccgacggatgtctcccttgcgtcccgcctcccctttcttgtaggcctgc atcatcaccgtttttctggacaaccccaaagtaccccgtctccctggctttagccacc tctccatcctcttgctttctttgcctggacaccccgttctcctgtggattcgggtcacct ctcactcctttcatttgggcagctcccctaccccccttacctctctagtctgtgctagct cttccagccccctgtcatggcatcttccaggggtccgagagctcagctagtcttcttc ctccaacccgggcccctatgtccacttcaggacagcatgtttgctgcctccagggga tcctgtgtccccgagctgggaccaccttatattcccagggccggttaatgtggctct ggttctgggtacttttatctgtcccctccaccccacagtggggcaagcttctgacctc ttctcttcctcccacagggcctcgagagatctGGAAGCGGAGCTACT AACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGG AGGAGAACCCTGGACCTgccaccatggtgagcgagctgattaag gagaacatgcacatgaagctgtacatggagggcaccgtgaacaaccaccacttca agtgcacatccgagggcgaaggcaagccctacgagggcacccagaccatgaga atcaaggcggtcgagggcggccctctcccctcgccttcgacatcctggctacca gcttcatgtacggcagcaaaaccttcatcaaccacacccagggcatccccgacttc tttaagcagtccttccccgagggcttcacatgggagagagtcaccacatacgaaga tgggggcgtgctgaccgctacccaggacaccagcctccaggacggctgcctcat ctacaacgtcaagatcagaggggtgaacttcccatccaacggccctgtgatgcag aagaaaacactcggctgggaggcctccaccgagacactgtaccccgctgacggc ggcctggaaggcagagccgacatggccctgaagctcgtgggcgggggccacct gatctgcaaccttaagaccacatacagatccaagaaacccgctaagaacctcaag atgcccggcgtctactatgtggacaggagactggaaagaatcaaggaggccgac

【表２－６】

		aaagagacatacgtcgagcagcacgaggtggctgtggccagatactgcgacctc cctagcaaactggggcacaaacttaattccTAaGGTACCggctagagcgg ccgcactagggacaggattggtgacagaaaagccccatccttaggcctcctccttc ctagtctcctgatattgggtctaaccccccacctcctgttaggcagattccttatctggt gacacacccccatttcctggagccatctctctccttgccagaacctctaaggtttgct tacgatggagccagagaggatcctgggagggagagcttggcaggggggtgggga gggaaggggggggatgcgtgacctgcccggttctcagtggccaccctgcgctacc ctctcccagaacctgagctgctctgacgcggctgtctggtgcgtttcactgatcctg gtgctgcagcttccttacacttcccaagaggagaagcagtttggaaaaacaaaatc agaataagttggtcctgagttctaactttggctcttcacctttctagtccccaatttatat tgttcctccgtgcgtcagttttacctgtgagataaggccagtagccagccccgtcct ggcagggctgtggtgaggaggggggtgtccgtgtggaaaactccctttgtgagaa tggtgcgtcctaggtgttcaccaggtcgtggccgcctctactccctttctctttctcca tccttctttccttaaagagtccccagtgctatctgggacatattcctccgcccagagc agggtcccgcttccctaaggccctgctctgggcttctgggtttgagtccttggcaag cccaggagaggcgctcaggcttccctgtccccctttcctcgtccaccatctcatgcc cctggctctcctgccccttccctacaggggttcctggctctgctct (配列番号590)
マウスRosa26_MS-5PM_IDTLong	初代マウスHSC編集で使用される、ノックインのためにマウスRosa26を標的とするSSAPを動員するためのMS2アプタマーを有するガイドRNAの5'部分（「m」は2'Oーメチル修飾塩基を示し、「＊」はホスホロチオエート結合を示す）	mA*mC*mU*rCrCrArGrUrCrUrUrUrCrUrArGrArArGrA rGrUrUrUrArArGrArGrCrUrArUrGrCrUrCrCrArGrGrCr CrArArCrArUrGrArGrGrArUrCrArCrCrCrArUrGrUrCrU rGrCrArGrGmG*mC*mC (配列番号591)
ヒトHBB_MS-5PM_IDTLong	初代ヒトHSC編集で使用される、ノックインのためにヒトHBBを標的とするSSAPを動員するためのMS2アプタマーを有するガイドRNAの5'部分（「m」は2'Oーメチル修飾塩基を示し、「＊」はホスホロチオエート結合を示	mC*mU*mU*rGrCrCrCrCrArCrArGrGrGrCrArGrUrArA rGrUrUrUrArArGrArGrCrUrArUrGrCrUrCrCrArGrGrCr CrArArCrArUrGrArGrGrArUrCrArCrCrCrArUrGrUrCrU rGrCrArGrGmG*mC*mC (配列番号592)

【表２－７】

	す）	
ヒトHBA1_MS-5PM_IDTLong	初代ヒトHSC編集で使用される、ノックインのためにヒトHBA1を標的とするSSAPを動員するためのMS2アプタマーを有するガイドRNAの5’部分（「m」は2’Oーメチル修飾塩基を示し、「＊」はホスホロチオエート結合を示す）	mG*mG*mC*rArArGrArArGrCrArUrGrGrCrCrArCrCrGrGrUrUrUrArArGrArGrCrUrArUrGrCrUrCrCrArGrGrCrCrArArCrArUrGrArGrGrArUrCrArCrCrCrArUrGrUrCrUrGrCrArGrGmG*mC*mC (配列番号593)
UnigRNA_3PM_IDTLong	SSAPを動員するためにMS2アプタマーと共に普遍的に使用されるガイドRNAの3’部分（「m」は2’Oーメチル修飾塩基を示し、「＊」はホスホロチオエート結合を示す）	mU*mG*mG*rArGrCrArUrArGrCrArArGrUrUrUrArArArUrArArGrGrCrUrArGrUrCrCrGrUrUrArUrCrArArCrUrUrGrArArArArArGrUrGrGrCrArCrCrGrArGrUrCrGrGrUrGrCrGrCrGrCrArCrArUrGrArGrGrArUrCrArCrCrCrArUrGrUrGrCrUmU*mU*mU (配列番号594)
マウスRosa26ガイド	RNAとして示される	ACUCCAGUCUUUCUAGAAGA (配列番号595)
ヒトHBBガイド	RNAとして示される	CUUGCCCCACAGGGCAGUAA (配列番号596)
ヒトHBA1ガイド	RNAとして示される	GGCAAGAAGCAUGGCCACCG (配列番号597)

【表２－８】

ACTB_MS-5PM_IDTLong	ヒトK562編集で使用される、ノックインのためにヒトACTBを標的とするSSAPを動員するためのMS2アプタマーを有するガイドRNAの5’部分（「m」は2’Oーメチル修飾塩基を示し、「＊」はホスホロチオエート結合を示す）	mC*mC*mA*rCrCrGrCrArArArUrGrCrUrUrCrUrArGrGrGrUrUrUrArArGrArGrCrUrArUrGrCrUrCrCrArGrGrCrCrArArCrArUrGrArGrGrArUrCrArCrCrCrArUrGrUrCrUrGrCrArGrGmG*mC*mC (配列番号598)
HSP90_MS-5PM_IDTLong	ヒトK562編集で使用される、ノックインのためにヒトHSP90AA1を標的とするSSAPを動員するためのMS2アプタマーを有するガイドRNAの5’部分（「m」は2’Oーメチル修飾塩基を示し、「＊」はホスホロチオエート結合を示す）	mG*mU*mA*rGrArCrUrArArUrCrUrCrUrGrGrCrUrGrArGrUrUrUrArArGrArGrCrUrArUrGrCrUrCrCrArArGrGrCrCrArArCrArUrGrArGrGrArUrCrArCrCrCrArUrGrUrCrUrGrCrArGrGmG*mC*mC (配列番号599)
Hist1_MS-5PM_IDTLong	ヒトK562編集で使用される、ノックインのためにヒトHIST1H2BKを標的とするSSAPを動員するためのMS2アプタマーを有するガイドRNAの5’部分（「m」は2’Oーメチル修飾塩基を示し、「＊」はホスホロチオエート結合を示す）	mU*mG*mG*rGrCrUrUrUrArArGrArCrGrCrUrUrArCrUrGrUrUrUrArArGrArGrCrUrArUrGrCrUrCrCrArGrGrCrCrArArCrArUrGrArGrGrArUrCrArCrCrCrArUrGrUrCrUrGrCrArGrGmG*mC*mC (配列番号600)

【表２－９】

ACTB_MS2x2_全長	ヒトACTBを標的とするSSAPノックインのための二重MS2アプタマーを含む全長ガイドRNA、ガイド長23bp、配列はDNA形式で示される	cgtCCACCGCAAATGCTTCTAGGGTTTAAGAGCTAT GCTCCAGGCCAACATGAGGATCACCCATGTCTGC AGGGCCTGGAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTA GTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCGCGCACATGAGGATCACCCATGTGCTTTT (配列番号601)
HSP90_MS2x2_全長	ヒトHSP90AA1を標的とするSSAPノックインのための二重MS2アプタマーを含む全長ガイドRNA、ガイド長23bp、配列はDNA形式で示される	gaaGTAGACTAATCTCTGGCTGAGTTTAAGAGCTAT GCTCCAGGCCAACATGAGGATCACCCATGTCTGC AGGGCCTGGAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTA GTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCGCGCACATGAGGATCACCCATGTGCTTTT (配列番号602)
Hist1_MS2x2_全長	ヒトHIST1H2BKを標的とするSSAPノックインのための二重MS2アプタマーを含む全長ガイドRNA、ガイド長23bp、配列はDNA形式で示される	ggtTGGGCTTTAAGACGCTTACTGTTTAAGAGCTAT GCTCCAGGCCAACATGAGGATCACCCATGTCTGC AGGGCCTGGAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTA GTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCGCGCACATGAGGATCACCCATGTGCTTTT (配列番号603)

【０２４７】

標的ゲノムＤＮＡ配列を含む細胞に本明細書中に記載の系を導入すると、ガイドＲＮＡ配列は細胞ゲノム中の標的ゲノムＤＮＡ配列に結合し、Ｃａｓタンパク質はガイドＲＮＡと会合し、標的ゲノムＤＮＡ配列中の二本鎖切断または一本鎖ニックを誘導し得、アプタマーは融合タンパク質のアプタマー結合タンパク質を通じて組換えタンパク質を標的ゲノムＤＮＡ配列に動員し、それによって細胞中の標的ゲノムＤＮＡ配列を変化させる。本明細書中に記載の組成物またはベクターを細胞に導入する場合、ガイドＲＮＡ配列を含む核酸分子、Ｃａｓ９タンパク質および融合タンパク質は、最初に細胞において発現される。

【０２４８】

いくつかの実施形態では、細胞は生物または宿主中にあり、そのため、開示された系、組成物、ベクターを細胞に導入することは対象への投与を含む。この方法は、対象に、インビボで、またはエクスビボ処置された細胞、系、組成物、本系のベクターの移植によって、提供または投与することを含み得る。

【０２４９】

「対象」は、ヒトまたは非ヒトであり得、例えば、研究目的のための「モデル系」として使用される動物の系統または種、例えば本明細書中に記載のようなマウスモデルを含み得る。同様に、対象は、成人または若年者（例えば子供）のいずれかを含み得る。さらに、対象は、本明細書中で企図される組成物の投与から恩恵を受け得る任意の生物、好ましくは哺乳動物（例えばヒトまたは非ヒト）を意味し得る。哺乳動物の例としては、哺乳動物クラスのいずれかのメンバー：ヒト、非ヒト霊長類、例えばチンパンジー、および他の類人猿およびサル種：ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタなどの家畜；ウサギ、イヌおよびネコなどの家庭動物；ラット、マウスおよびモルモットなどのげっ歯類を含む実験動物などが挙げられるが限定されない。非哺乳動物の例としては、鳥類、魚類などが挙げられる

が限定されない。本明細書中で提供される方法および組成物の一実施形態では、哺乳動物はヒトである。植物としては、限定されないが、サトウキビ、トウモロコシ、コムギ、イネ、アブラヤシ、ジャガイモ、ダイズ、野菜、キャッサバ、サトウダイコン、トマト、オオムギ、バナナ、スイカ、タマネギ、サツマイモ、キュウリ、リンゴ、種子綿、オレンジなどが挙げられる。

【０２５０】

本明細書中で使用される場合、「提供する」、「投与する」、「導入する」という用語は、本明細書中では交換可能に使用され、所望の部位への系の少なくとも部分的な局在化をもたらす方法または経路による対象への本発明の系の配置を指す。この系は、対象における所望の位置への送達をもたらすいずれかの適切な経路によって投与され得る。

【０２５１】

本明細書で使用される「ＤＮＡ配列を改変する」という句は、関心対象のＤＮＡ配列の少なくとも１つの物理的特徴を修飾することを指す。ＤＮＡの改変には、例えば、一本鎖または二本鎖ＤＮＡの切断、１またはそれを超えるヌクレオチドの欠失または挿入、およびＤＮＡ配列の構造的完全性またはヌクレオチド配列に影響を与えるその他の修飾が含まれる。ゲノムＤＮＡにおける標的配列の修飾は、例えば、遺伝子修正、遺伝子置換、遺伝子タグ付け、導入遺伝子挿入、ヌクレオチド欠失、遺伝子破壊、遺伝子変異、遺伝子ノックダウンなどをもたらし得る。

【０２５２】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の系および方法は、遺伝子中の１またはそれを超える欠陥または変異を修正するために使用され得る（「遺伝子修正（ｇｅｎｅ ｃｏｒｒｅｃｔｉｏｎ）」と呼ばれる）。このような事例では、標的ゲノムＤＮＡ配列は遺伝子の欠陥のあるバージョンをコードし、系は、該遺伝子の野生型または修正されたバージョンをコードするドナー核酸分子をさらに含む。したがって、言い換えれば、標的ゲノムＤＮＡ配列は「疾患関連」遺伝子である。「疾患関連遺伝子」という用語は、その遺伝子産物が、疾患に罹患していない個体から得られた組織または細胞と比較して、疾患に罹患した個体から得られた細胞において異常なレベルでまたは異常な形態で発現される任意の遺伝子またはポリヌクレオチドを指す。疾患関連遺伝子は、異常に高いレベルまたは異常に低いレベルで発現され得、変化した発現は、疾患の発生および／または進行と相関する。疾患関連遺伝子は、その変異または遺伝的変異（ｇｅｎｅｔｉｃ ｖａｒｉａｔｉｏｎ）が直接的に原因である遺伝子、または疾患の病因に関与する遺伝子（複数可）と連鎖不平衡にある遺伝子も指す。このような「単一遺伝子（ｓｉｎｇｌｅ ｇｅｎｅ）」または「単一遺伝子（ｍｏｎｏｇｅｎｉｃ）」疾患の原因となる遺伝子の例には、アデノシンデアミナーゼ、α－１アンチトリプシン、嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス調節因子（ＣＦＴＲ）、β－ヘモグロビン（ＨＢＢ）、眼皮膚白皮症ＩＩ（ＯＣＡ２）、ハンチンチン（ＨＴＴ）、筋緊張性ジストロフィータンパク質キナーゼ（ＤＭＰＫ）、低密度リポタンパク質受容体（ＬＤＬＲ）、アポリポタンパク質Ｂ（ＡＰＯＢ）、ニューロフィブロミン１（ＮＦ１）、多嚢胞性腎疾患１（ＰＫＤ１）、多嚢胞性腎疾患２（ＰＫＤ２）、凝固因子ＶＩＩＩ（Ｆ８）、ジストロフィン（ＤＭＤ）、リン酸調節エンドペプチダーゼホモログ、Ｘ連鎖性（ＰＨＥＸ）、メチル－ＣｐＧ結合タンパク質２（ＭＥＣＰ２）およびユビキチン特異的ペプチダーゼ９Ｙ、Ｙ連鎖性（ＵＳＰ９Ｙ）が含まれるが、これらに限定されない。他の単一遺伝子（ｓｉｎｇｌｅ ｇｅｎｅ）または単一遺伝子（ｍｏｎｏｇｅｎｉｃ）疾患は当技術分野で公知であり、例えば、本明細書に参考として援用されるＣｈｉａｌ，Ｈ．Ｒａｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ：Ｌｅａｒｎｉｎｇ Ａｂｏｕｔ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｔｈｒｏｕｇｈ Ｇｅｎｅ Ｍａｐｐｉｎｇ，ＳＮＰｓ，ａｎｄ Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ Ｄａｔａ，Ｎａｔｕｒｅ Ｅｄｕｃａｔｉｏｎ １（１）：１９２（２００８）；Ｏｎｌｉｎｅ Ｍｅｎｄｅｌｉａｎ Ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ ｉｎ Ｍａｎ（ＯＭＩＭ）；およびＨｕｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｍｕｔａｔｉｏｎ Ｄａｔａｂａｓｅ（ＨＧＭＤ）に記載されている。

【０２５３】

本発明は、ヒトゲノムにおける治療的に関連する遺伝子座での大きな導入遺伝子のノックインを提供する。特定の実施形態では、遺伝子座は、細胞特異的発現または組織特異的発現を提供する。特定の実施形態では、本発明は、アルブミン（ＡＬＢ）遺伝子座への核酸の挿入を含む。ＡＬＢ遺伝子座は、ヒト肝細胞における肝臓標的化を提供し、高度に発現され、肝臓特異的な様式である。特定の実施形態では、本発明は、ＡＡＶＳ１遺伝子座への核酸の挿入を含む。ＡＡＶＳ１遺伝子座は、特定の組織型で十分に発現され、多種多様な処置に使用することができ、肝臓での発現が低い遺伝子治療のためのセーフハーバー遺伝子座である。米国特許出願公開第２０１８／０２１４４９０号Ａ１は、ヒト細胞におけるＡＡＶＳ１、ＨＰＲＴおよびＣＣＲ５遺伝子、ならびにマウス細胞におけるＲｏｓａ２６等のセーフハーバー遺伝子座に導入遺伝子を標的化することを含む、リソソーム蓄積症のための遺伝子治療を記載している。米国特許第９２６７１５４号は、ほとんどの組織で広く発現されるＰＰＰ１Ｒ１２Ｃ遺伝子座への外因性核酸配列の組み込みを記載している。導入遺伝子（例えば、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする）をＴ細胞受容体α定常（ＴＲＡＣ）遺伝子座に標的化することによる細胞特異的発現を記載する。これらは、本発明に従って標的とすることができる遺伝子座に関して例示的かつ非限定的である。

【０２５４】

別の実施形態において、標的ゲノムＤＮＡ配列は、その変異が、他の遺伝子中の変異と相まって特定の疾患に寄与する遺伝子を含むことができる。単純な（例えば、メンデル）遺伝パターンを欠く、複数の遺伝子の寄与によって引き起こされる疾患は、当技術分野では「多因子性」または「多遺伝子性」疾患と呼ばれている。多因子性または多遺伝子性疾患の例には、喘息、糖尿病、てんかん、高血圧、双極性障害および統合失調症が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の発達異常も、多因子性または多遺伝子性パターンで遺伝することがあり得、例えば、口唇裂／口蓋裂、先天性心欠損および神経管欠損が含まれる。

【０２５５】

別の実施形態において、標的ゲノムＤＮＡ配列を改変する方法は、標的配列を切断し、外因的に提供されたドナー核酸分子の非存在下において細胞が切断された配列を修復できるようにすることによって、細胞中の標的配列から核酸を欠失させるために使用することができる。この様式での核酸配列の欠失は、例えば、神経細胞中の疾患を引き起こすトリヌクレオチドリピート配列を除去するために、遺伝子ノックアウトまたはノックダウンを作製するために、および研究において疾患モデルのために変異を生成するためになど、様々な用途において使用することができる。

【０２５６】

「ドナー核酸分子」という用語は、標的ＤＮＡ（例えばゲノムＤＮＡ）に挿入されるヌクレオチド配列を指す。上述のように、ドナーＤＮＡは、例えば、遺伝子もしくは遺伝子の一部、タグもしくは局在化配列をコードする配列または調節エレメントを含み得る。ドナー核酸分子はあらゆる長さであり得る。いくつかの実施形態では、ドナー核酸分子は、１０～１０，０００ヌクレオチド長である。例えば、約１００～５，０００ヌクレオチド長、約２００～２，０００ヌクレオチド長、約５００～１，０００ヌクレオチド長、約５００～５，０００ヌクレオチド長、約１，０００～５，０００ヌクレオチド長または約１，０００～１０，０００ヌクレオチド長である。

【０２５７】

開示される系および方法は、特にキロ塩基スケールの核酸を用いた低効率およびオフターゲット事象を含む、従来の遺伝子編集中に遭遇する課題を克服する。いくつかの態様では、開示される系および方法は、遺伝子編集の効率を改善する。例えば、開示される系および方法は、実施例２、３および５に示されるように、従来のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系および方法よりも２倍～１０倍高い効率を有し得る。いくつかの実施形態では、効率の改善は、オフターゲット事象の減少を伴う。オフターゲット事象は、従来のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系および方法と比較して５０％を超えて減少し得、例えば、オフターゲット事象の約９０％の減少が実施例３で示される。遺伝子編集系の全体的な精度を高める別の態様

は、ＨＤＲ編集の副産物であるオンターゲット挿入欠失（インデル）を減少させることである。いくつかの実施形態では、開示された系および方法は、実施例３で示されるように、オンターゲットインデルを従来のＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系および方法と比較して９０％超減少させる。

【０２５８】

本発明は、本明細書中に記載の方法のいずれかを実施するために有用、必要または十分な１またはそれを超える試薬または他の構成成分を含有するキットをさらに提供する。例えば、キットは、ＣＲＩＳＰＲ試薬（Ｃａｓタンパク質、ガイドＲＮＡ、ベクター、組成物など）、リコンビニアリング試薬（組換えタンパク質－アプタマー結合タンパク質融合タンパク質、アプタマー配列、ベクター、組成物など）形質移入または投与試薬、陰性および陽性対照試料（例えば、細胞、鋳型ＤＮＡ）、細胞、１またはそれを超える構成成分を収容する容器（例えば、微小遠心管、箱）、検出可能な標識、検出および分析機器、ソフトウェア、指示などを含み得る。

【０２５９】

ＲＮＡは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レンチウイルス、アデノウイルスもしくは他のウイルスベクタータイプ、またはそれらの組み合わせを使用して送達され得る。ＲＮＡは、１またはそれを超えるウイルスベクターにパッケージングすることができる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、例えば、筋肉内注射によって目的の組織に送達され、他の場合、ウイルス送達は、静脈内、経皮、鼻腔内、経口、粘膜、または他の送達方法によるものである。そのような送達は、単回用量または複数回用量のいずれかによるものであり得る。当業者は、本明細書において送達される実際の投与量が、選択されるベクター、標的細胞、生物または組織、処置される対象の全身症状、求められる形質転換／改変の程度、投与経路、投与様式、求められる形質転換／改変の種類などの種々の因子に応じて大きく異なり得ることを理解している。

【０２６０】

そのような投与量は、例えば、担体（水、生理食塩水、エタノール、グリセロール、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム、ゼラチン、デキストラン、寒天、ペクチン、落花生油、ゴマ油など）、希釈剤、薬学的に許容され得る担体（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、薬学的に許容され得る賦形剤、および／または当技術分野で公知の他の化合物をさらに含有し得る。そのような投与製剤は、当業者によって容易に確認することができる。投与量は、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などの鉱酸塩；および酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などの有機酸の塩などの１またはそれを超える薬学的に許容され得る塩をさらに含有してもよい。さらに、湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝物質、ゲルまたはゲル化材料、香味料、着色剤、ミクロスフェア、ポリマー、懸濁剤などの補助物質も本明細書に存在し得る。さらに、特に剤形が再構成可能な形態である場合、保存剤、保湿剤、懸濁化剤、界面活性剤、酸化防止剤、固化防止剤、充填剤、キレート剤、コーティング剤、化学安定剤などの１またはそれを超える他の従来の医薬成分も存在し得る。適切な例示的な成分には、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリソルベート８０、フェニルエチルアルコール、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、エチルバニリン、グリセリン、フェノール、パラクロロフェノール、ゼラチン、アルブミン、およびそれらの組み合わせが含まれる。薬学的に許容され得る賦形剤の完全な議論は、参照により本明細書に組み込まれる、ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ（Ｍａｃｋ　Ｐｕｂ．Ｃｏ．，Ｎ．Ｊ．１９９１）で利用可能である。

【０２６１】

本明細書の一実施形態では、送達は、少なくとも1×10^{5}個のアデノウイルスベクター粒子（粒子ユニット、ｐｕとも呼ばれる）を含有する単一ブースター用量であり得るアデノウイルスによるものである。本明細書の一実施形態では、用量は好ましくは、少なくとも約1×10^{6}粒子（例えば、約1×10^{6}～$1\times1\times10^{12}$個の粒子）、より好ましくは少なくとも約1×10^{10}粒子、より好ましくは少なくとも約1×10^{8}粒子（例

えば、約１×１０^{8}～１×１０^{11}個の粒子または約１×１０^{8}～１×１０^{12}個の粒子）、最も好ましくは少なくとも約１×１０^{10}粒子（例えば、約１×１０^{9}～１×１０^{10}個の粒子または約１×１０^{9}～１×１０^{12}個の粒子）、またはさらに少なくとも約１×１０^{10}粒子（例えば、約１×１０^{10}～１×１０^{12}個の粒子）のアデノウイルスベクターである。あるいは、用量は、約１×１０^{14}個以下の粒子、好ましくは約１×１０^{13}個以下の粒子、さらにより好ましくは約１×１０^{12}個以下の粒子、さらにより好ましくは約１×１０^{11}個以下の粒子、最も好ましくは約１×１０^{10}個以下の粒子（例えば、約１×１０^{9}個以下の粒子）を含む。したがって、用量は、例えば、約１×１０^{6}粒子単位（ｐｕ）、約２×１０^{6}ｐｕ、約４×１０^{6}ｐｕ、約１×１０^{7}ｐｕ、約２×１０^{7}ｐｕ、約４×１０^{7}ｐｕ、約１×１０^{8}ｐｕ、約２×１０^{8}ｐｕ、約４×１０^{8}ｐｕ、約１×１０^{9}ｐｕ、約２×１０^{9}ｐｕ、約４×１０^{9}ｐｕ、約１×１０^{10}ｐｕ、約２×１０^{10}ｐｕ、約４×１０^{10}ｐｕ、約１×１０^{11}ｐｕ、約２×１０^{11}ｐｕ、約４×１０^{11}ｐｕ、約１×１０^{12}ｐｕ、約２×１０^{12}ｐｕ、または約４×１０^{12}ｐｕのアデノウイルスベクターの単回用量を含有し得る。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第８，４５４，９７２号（Ｎａｂｅｌら、２０１３年６月４日登録）のアデノウイルスベクター、およびそのｃｏｌ　２９、３６～５８行目にある投与量を参照されたい。本明細書の一実施形態では、アデノウイルスは複数回投与によって送達される。

【０２６２】

本明細書の一実施形態では、送達はＡＡＶを介する。ヒトへのＡＡＶのインビボ送達のための治療上有効な投与量は、約１×１０^{10}～約１×１０^{10}個の機能性ＡＡＶ／ｍｌ溶液を含有する約２０～約５０ｍｌの生理食塩水の範囲であると考えられる。投与量は、治療上の利益と任意の副作用とのバランスをとるように調整することができる。本明細書の一実施形態では、ＡＡＶ用量は、一般に、約１×１０^{5}～１×１０^{50}ゲノムＡＡＶ、約１×１０^{8}～１×１０^{20}ゲノムＡＡＶ、約１×１０^{10}～約１×１０^{16}ゲノムまたは約１×１０^{11}～約１×１０^{16}ゲノムＡＡＶの濃度の範囲である。ヒト投与量は、約１×１０^{13}ゲノムのＡＡＶであり得る。そのような濃度は、約０．００１ｍｌ～約１００ｍｌ、約０．０５～約５０ｍｌ、または約１０～約２５ｍｌの担体溶液で送達され得る。他の有効投与量は、用量反応曲線を確立する日常的な試験を通して当業者によって容易に確立され得る。例えば、２０１３年３月２６日に登録されたＨａｊｊａｒらによる米国特許第８，４０４，６５８号のｃｏｌ．２７、４５～６０行目を参照されたい。

【０２６３】

本明細書の一実施形態では、送達はプラスミドを介する。そのようなプラスミド組成物では、投与量は、応答を誘発するのに十分な量のプラスミドでなければならない。例えば、プラスミド組成物中のプラスミドＤＮＡの適切な量は、約０．１～約２ｍｇ、または約１μｇ～約１０μｇであり得る。

【０２６４】

本明細書における用量は、平均７０ｋｇの個体に基づく。投与頻度は、医療または獣医学の施術者（例えば、医師、獣医）、または当該分野における科学者の範囲内である。実験で使用したマウスは約２０ｇである。２０ｇのマウスに投与されたものから、７０ｋｇの個体に外挿することができる。

【０２６５】

レンチウイルスは、有糸分裂細胞および有糸分裂後細胞の両方に感染し、それらの遺伝子を発現する能力を有する複雑なレトロウイルスである。最も一般的に知られているレンチウイルスはヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）であり、広範囲の細胞型を標的とするために他のウイルスのエンベロープ糖タンパク質を使用する。

【０２６６】

レンチウイルスは、以下のように調製され得る。ｐＣａｓＥＳ１０（レンチウイルス移入プラスミド骨格を含有する）をクローニングした後、低継代（ｐ＝５）のＨＥＫ２９３ＦＴを、１０％ウシ胎児血清を含み抗生物質を含まないＤＭＥＭ中で形質移入の前日に５０％コンフルエンスまでＴ－７５フラスコに播種した。２０時間後、培地をＯｐｔｉＭＥ

Ｍ（無血清）培地に交換し、４時間後に形質移入を行った。細胞を１０μｇのレンチウイルス移入プラスミド（ｐＣａｓＥＳ１０）および以下のパッケージングプラスミド：５μｇのｐＭＤ２。Ｇ（ＶＳＶ－ｇシュードタイプ）、および７．５ｕｇのｐｓＰＡＸ２（ｇａｇ／ｐｏｌ／ｒｅｖ／ｔａｔ）で形質移入した。形質移入は、カチオン性脂質送達剤（５０ｕＬのリポフェクタミン２０００および１００ｕｌのＰｌｕｓ試薬）を含む４ｍＬのＯｐｔｉＭＥＭ中で行った。６時間後、培地を１０％ウシ胎児血清を含む抗生物質非含有ＤＭＥＭに交換した。

【０２６７】

レンチウイルスは、以下のように精製され得る。４８時間後にウイルス上清を回収した。最初に上清から残屑を清澄化し、０．４５ｕｍ低タンパク質結合（ＰＶＤＦ）フィルタを通して濾過した。次いで、それらを超遠心機で２４，０００ｒｐｍで２時間回転させた。ウイルスペレットを５０ｕｌのＤＭＥＭに４℃で一晩再懸濁した。次いで、それらを分注し、直ちに－８０℃で凍結した。

【０２６８】

別の実施形態では、ウマ伝染性貧血ウイルス（ＥＩＡＶ）に基づく最小の非霊長類レンチウイルスベクターも、特に眼遺伝子治療のために企図される（例えば、Ｗｉｌｅｙ　ＩｎｔｅｒＳｃｉｅｎｃにおいて２００５年１１月２１日にオンライン公開されたＢａｌａｇａａｎ，Ｊ　Ｇｅｎｅ　Ｍｅｄ　２００６；８：２７５－２８５を参照；ウェブサイト：ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ．ｗｉｌｅｙ．ｃｏｍ．ＤＯＩ：１０．１００２／ｊｇｍ．８４５で入手可能である）。別の実施形態では、ウェブ形態の加齢性黄斑変性症を処置するために網膜下注射を介して送達される血管新生抑制タンパク質エンドステインおよびアンジオスタチンを発現するウマ感染性貧血ウイルスに基づくレンチウイルス遺伝子治療ベクターであるＲｅｔｉｎｏＳｔａｔ（登録商標）もまた企図され（例えば、Ｂｉｎｌｅｙら、ＨＵＭＡＮ　ＧＥＮＥ　ＴＨＥＲＡＰＹ　２３：９８０－９９１（２０１２年９月）を参照）、本発明の系に対して改変され得る。

【０２６９】

レンチウイルスベクターは、パーキンソン病の処置と同様に開示されており、例えば、米国特許公開番号２０１２０２９５９６０ならびに米国特許第７，３０３，９１０号および同第７，３５１，５８５号を参照されたい。レンチウイルスベクターはまた、眼疾患の処置のために開示されており、例えば、米国特許公開番号２００６０２８１１８０、２００９０００７２８４、ＵＳ２０１１０１１７１８９；ＵＳ２００９００１７５４３；ＵＳ２００７００５４９６１、ＵＳ２０１００３１７１０９を参照されたい。レンチウイルスベクターはまた、脳への送達のために開示されており、例えば、米国特許公開番号ＵＳ２０１１０２９３５７１；ＵＳ２０１１０２９３５７１、ＵＳ２００４００１３６４８、ＵＳ２００７００２５９７０、ＵＳ２００９０１１１１０６および米国特許第７，２５９，０１５号を参照されたい。

【０２７０】

いくつかの種類の粒子送達系および／または製剤は、多様な生物医学的用途に有用であることが知られている。一般に、粒子は、その輸送および特性に関して全体単位として挙動する小さな物体として定義される。粒子は、直径に従ってさらに分類される。粗粒子は、２，５００～１０，０００ナノメートルの範囲をカバーする。微粒子は、１００～２，５００ナノメートルの間のサイズである。超微粒子またはナノ粒子は、一般に、１～１００ナノメートルのサイズである。１００ｎｍの限界の基礎は、粒子をバルク材料から区別する新規な特性が、典型的には１００ｎｍ未満の臨界長さスケールで発現するという事実である。

【０２７１】

本明細書で使用される場合、粒子送達系／製剤は、本発明による粒子を含む任意の生物学的送達系／製剤として定義される。本発明による粒子は、１００ミクロン（μｍ）未満の最大寸法（例えば、直径）を有する任意の実体である。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、１０未満の最大寸法を有する。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、

２０００ナノメートル（ｎｍ）未満の最大寸法を有する。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、１０００ナノメートル（ｎｍ）未満の最大寸法を有する。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、９００ｎｍ、８００ｎｍ、７００ｎｍ、６００ｎｍ、５００ｎｍ、４００ｎｍ、３００ｎｍ、２００ｎｍ、または１００ｎｍ未満の最大寸法を有する。典型的には、本発明の粒子は、５００ｎｍまたはそれ未満の最大寸法（例えば、直径）を有する。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、２５０ｎｍまたはそれ未満の最大寸法（例えば、直径）を有する。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、２００ｎｍまたはそれ未満の最大寸法（例えば、直径）を有する。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、１５０ｎｍまたはそれ未満の最大寸法（例えば、直径）を有する。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、１００ｎｍまたはそれ未満の最大寸法（例えば、直径）を有する。例えば５０ｎｍまたはそれ未満の最大寸法を有するより小さい粒子が、本発明のいくつかの実施形態において使用される。いくつかの実施形態では、本発明の粒子は、２５ｎｍ～２００ｎｍの範囲の最大寸法を有する。

【０２７２】

粒子特性評価（例えば、形態、寸法などを特徴付けることを含む）は、様々な異なる技術を使用して行われる。一般的な技術は、電子顕微鏡法（ＴＥＭ、ＳＥＭ）、原子間力顕微鏡法（ＡＦＭ）、動的光散乱（ＤＬＳ）、Ｘ線光電子分光法（ＸＰＳ）、粉末Ｘ線回折（ＸＲＤ）、フーリエ変換赤外分光法（ＦＴＩＲ）、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化飛行時間型質量分析法（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）、紫外可視分光法、二重偏光干渉法および核磁気共鳴（ＮＭＲ）である。本発明の任意のインビトロ、エクスビボおよび／またはインビボ適用のための送達に最適なサイズの粒子を提供するために、天然粒子（例えば負荷前）に関して、またはカーゴの負荷後に（本明細書において、カーゴとは、１またはそれを超えるＲＮＡおよび／またはそれをコードするベクターを指し、追加の構成成分、担体および／または賦形剤を含み得る）、特性評価（寸法測定）を行ってもよい。特定の好ましい実施形態では、粒子寸法（例えば、直径）の特性評価は、動的レーザー散乱（ＤＬＳ）を使用した測定に基づく。

【０２７３】

本発明の範囲内の粒子送達系は、固体、半固体、エマルジョン、またはコロイド状粒子を含むがこれらに限定されない任意の形態で提供され得る。そのようなものとして、本明細書中に記載される任意の送達系（例えば、脂質に基づく系、リポソーム、ミセル、微小胞、エキソソームまたは遺伝子銃が含まれるが、これらに限定されない）が、本発明の範囲内で粒子送達系として提供され得る。

【０２７４】

本発明に関して、ナノ粒子または脂質エンベロープを使用して送達される系の１またはそれを超える構成成分を有することが好ましい。ＣＲＩＳＰＲ酵素ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡは、ナノ粒子または脂質エンベロープを使用して同時に送達され得る。他の送達系またはベクターを本発明のナノ粒子態様と併せて使用してもよい。

【０２７５】

一般に、「ナノ粒子」は、１０００ｎｍ未満の直径を有する任意の粒子を指す。特定の好ましい実施形態では、本発明のナノ粒子は、５００ｎｍまたはそれ未満の最大寸法（例えば、直径）を有する。他の好ましい実施形態では、本発明のナノ粒子は、２５ｎｍ～２００ｎｍの範囲の最大寸法を有する。他の好ましい実施形態では、本発明のナノ粒子は、１００ｎｍまたはそれ未満の最大寸法を有する。他の好ましい実施形態では、本発明のナノ粒子は、３５ｎｍ～６０ｎｍの範囲の最大寸法を有する。

【０２７６】

本発明に包含されるナノ粒子は、異なる形態で、例えば、固体ナノ粒子（例えば、銀、金、鉄、チタンなどの金属）、非金属、脂質に基づく固体、ポリマー）、ナノ粒子の懸濁液、またはそれらの組み合わせとして提供され得る。金属、誘電体、および半導体ナノ粒子、ならびにハイブリッド構造（例えば、コア－シェルナノ粒子）を調製することができる。半導体材料で作られたナノ粒子は、電子エネルギーレベルの量子化が起こるのに十分

小さい（典型的には１０ｎｍ未満）場合、量子ドットと標識することもできる。そのようなナノスケール粒子は、生物医学的用途において薬物担体またはイメージング剤として使用され、本発明において同様の目的に適合させることができる。

【０２７７】

半固体および軟質ナノ粒子が製造されており、本発明の範囲内である。半固体の性質のプロトタイプナノ粒子はリポソームである。様々なタイプのリポソームナノ粒子が現在、抗癌剤およびワクチンの送達系として臨床的に使用されている。一方の半分が親水性であり、他方の半分が疎水性であるナノ粒子は、ヤヌス粒子と呼ばれ、エマルジョンの安定化に特に有効である。それらは水／油界面で自己集合し、固体界面活性剤として作用することができる。

【０２７８】

例えば、Ｓｕ Ｘ，Ｆｒｉｃｋｅ Ｊ，Ｋａｖａｎａｇｈ Ｄ Ｇ，Ｉｒｖｉｎｅ Ｄ Ｊ（「Ｉｎ ｖｉｔｒｏ ａｎｄ ｉｎ ｖｉｖｏ ｍＲＮＡ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｕｓｉｎｇ ｌｉｐｉｄ－ｅｎｖｅｌｏｐｅｄ ｐＨ－ｒｅｓｐｏｎｓｉｖｅ ｐｏｌｙｍｅｒ ｎａｎｏｐａｒｔｉｃｌｅｓ」Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ．２０１１ Ｊｕｎ．６；８（３）：７７４－８７．ｄｏｉ：１０．１０２１／ｍｐ１００３９０ｗ．Ｅｐｕｂ ２０１１ Ａｐｒ．１）は、リン脂質二重層シェルに包まれたポリ（β－アミノエステル）（ＰＢＡＥ）コアを有する生分解性コアシェル構造ナノ粒子を記載している。これらは、インビボｍＲＮＡ送達のために開発された。エンドソーム破壊を促進するためにｐＨ応答性ＰＢＡＥ構成成分を選択し、一方で、ポリカチオンコアの毒性を最小限に抑えるために脂質表面層を選択した。したがって、これらは、本発明のＲＮＡを送達するために好ましい。

【０２７９】

一実施形態では、自己集合性生体接着性ポリマーに基づくナノ粒子が企図され、これはペプチドの経口送達、ペプチドの静脈内送達およびペプチドの経鼻送達に、全て脳に適用され得る。疎水性薬物の経口吸収および眼送達などの他の実施形態も企図される。分子エンベロープ技術は、保護され、疾患部位に送達される操作されたポリマーエンベロープを含む（例えば、Ｍａｚｚａ，Ｍ．ら、ＡＣＳＮａｎｏ，２０１３．７（２）：１０１６－１０２６；Ｓｉｅｗ，Ａ．ら、Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ，２０１２．９（１）：１４－２８；Ｌａｌａｔｓａ，Ａ．ら、Ｊ Ｃｏｎｔｒ Ｒｅｌ，２０１２．１６１（２）：５２３－３６；Ｌａｌａｔｓａ，Ａ．ら、，Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ，２０１２．９（６）：１６６５－８０；Ｌａｌａｔｓａ，Ａ．ら、Ｍｏｌ Ｐｈａｒｍ，２０１２．９（６）：１７６４－７４；Ｇａｒｒｅｔｔ，Ｎ．Ｌ．ら、Ｊ Ｂｉｏｐｈｏｔｏｎｉｃｓ，２０１２．５（５－６）：４５８－６８；Ｇａｒｒｅｔｔ，Ｎ．Ｌ．ら、Ｊ Ｒａｍａｎ Ｓｐｅｃｔ，２０１２．４３（５）：６８１－６８８；Ａｈｍａｄ，Ｓ．ら、Ｊ Ｒｏｙａｌ Ｓｏｃ Ｉｎｔｅｒｆａｃｅ ２０１０．７：Ｓ４２３－３３；Ｕｃｈｅｇｂｕ，Ｉ．Ｆ．Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ，２００６．３（５）：６２９－４０；Ｑｕ，Ｘ．ら、Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ，２００６．７（１２）：３４５２－９およびＵｃｈｅｇｂｕ，Ｉ．Ｆ．ら、Ｉｎｔ Ｊ Ｐｈａｒｍ，２００１．２２４：１８５－１９９を参照されたい）。標的組織に応じて、単回または複数回用量で、約５ｍｇ／ｋｇの用量が企図される。

【０２８０】

一実施形態では、ＭＩＴのＤａｎ Ａｎｄｅｒｓｏｎの研究室によって開発された腫瘍成長を停止させるために癌細胞にＲＮＡを送達することができるナノ粒子を、本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系に使用および／または適合させてもよい。特に、Ａｎｄｅｒｓｏｎ研究室は、新しい生体材料およびナノ製剤の合成、精製、特性評価および製剤化のための完全に自動化されたコンビナトリアル系を開発した。例えば、Ａｌａｂｉら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０１３ Ａｕｇ．６；１１０（３２）：１２８８１－６；Ｚｈａｎｇら、Ａｄｖ Ｍａｔｅｒ．２０１３ Ｓｅｐ．６；２５（３３）：４６４１－５；Ｊｉａｎｇら、Ｎａｎｏ Ｌｅｔｔ．２０１３ Ｍａｒ．１３；１３（３）：１０５９－６４；Ｋａｒａｇｉａｎｎｉｓら、ＡＣＳ Ｎａｎｏ．２０１２ Ｏｃｔ

．２３；６（１０）：８４８４－７；Ｗｈｉｔｅｈｅａｄら、ＡＣＳ　Ｎａｎｏ．２０１２　Ａｕｇ．２８；６（８）：６９２２－９およびＬｅｅら、Ｎａｔ　Ｎａｎｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１２　Ｊｕｎ．３；７（６）：３８９－９３を参照されたい。

【０２８１】

米国特許出願第２０１１０２９３７０３号は、本発明のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ系を送達するために適用され得るポリヌクレオチドの投与においても特に有用なリピドイド化合物に関する。一態様では、アミノアルコールリピドイド化合物を、細胞または対象に送達される薬剤と組み合わせて、微粒子、ナノ粒子、リポソームまたはミセルを形成する。粒子、リポソームまたはミセルによって送達される薬剤は、気体、液体または固体の形態であってもよく、薬剤は、ポリヌクレオチド、タンパク質、ペプチドまたは小分子であってもよい。アミノアルコールリピドイド化合物は、他のアミノアルコールリピドイド化合物、ポリマー（合成または天然）、界面活性剤、コレステロール、炭水化物、タンパク質、脂質などと組み合わせて粒子を形成し得る。次いで、これらの粒子を必要に応じて医薬賦形剤と組み合わせて医薬組成物を形成してもよい。

【０２８２】

米国特許公開第０１１０２９３７０３号はまた、アミノアルコールリピドイド化合物を調製する方法を提供する。１またはそれを超える当量のアミンを、適切な条件下で１またはそれを超える当量のエポキシド末端化合物と反応させて、本発明のアミノアルコールリピドイド化合物を形成させる。特定の実施形態では、アミンの全てのアミノ基は、エポキシド末端化合物と完全に反応して第三級アミンを形成する。他の実施形態では、アミンの全てのアミノ基は、エポキシド末端化合物と完全に反応して第三級アミンを形成するのではなく、それにより、アミノアルコールリピドイド化合物中に第一級または第二級アミンを生じる。これらの第一級または第二級アミンは、そのまま残されるか、または異なるエポキシド末端化合物などの別の求電子剤と反応することができる。当業者によって理解されるように、アミンを過剰未満のエポキシド末端化合物と反応させると、様々な数のテールを有する複数の異なるアミノアルコールリピドイド化合物が得られる。特定のアミンは、２つのエポキシド由来化合物テールで完全に官能化され得るが、他の分子はエポキシド由来化合物テールで完全に官能化されない。例えば、ジアミンまたはポリアミンは、分子の様々なアミノ部分から１、２、３、または４個のエポキシド由来化合物テールを含んでもよく、第１級、第２級、および第３級アミンを生じる。特定の実施形態では、全てのアミノ基は完全に官能化されていない。特定の実施形態では、２つの同じタイプのエポキシド末端化合物が使用される。他の実施形態では、２またはそれを超える異なるエポキシド末端化合物が使用される。アミノアルコールリピドイド化合物の合成は、溶媒を用いてまたは用いずに行われ、合成は、３０～１００Ｃの範囲のより高い温度、好ましくはおよそ５０～９０Ｃで行われ得る。調製されたアミノアルコールリピドイド化合物は、必要に応じて精製されてもよい。例えば、アミノアルコールリピドイド化合物の混合物を精製して、特定数のエポキシド由来化合物テールを有するアミノアルコールリピドイド化合物を得てもよい。または、混合物を精製して、特定の立体異性体または位置異性体を得てもよい。アミノアルコールリピドイド化合物は、ハロゲン化アルキル（例えば、ヨウ化メチル）または他のアルキル化剤を用いてアルキル化されていてもよく、および／またはアシル化されていてもよい。

【０２８３】

米国特許公開第０１１０２９３７０３号はまた、本発明の方法によって調製されたアミノアルコールリピドイド化合物のライブラリーを提供する。これらのアミノアルコールリピドイド化合物は、液体ハンドラー、ロボット、マイクロタイタープレート、コンピュータなどを含むハイスループット技術を用いて調製および／またはスクリーニングされ得る。特定の実施形態では、アミノアルコールリピドイド化合物を、ポリヌクレオチドまたは他の薬剤（例えば、タンパク質、ペプチド、小分子）を細胞に形質移入する能力についてスクリーニングする。

【０２８４】

米国特許出願公開第２０１３０３０２４０１号明細書は、コンビナトリアル重合を使用して調製されたクラスのポリ（β－アミノアルコール）（ＰＢＡＡ）に関する。本発明のＰＢＡＡは、コーティング（医療機器またはインプラント用のフィルムまたは多層フィルムのコーティングなど）、添加剤、材料、賦形剤、非バイオファウリング剤、マイクロパターニング剤、および細胞カプセル化剤として、バイオテクノロジーおよび生物医学的用途に使用され得る。表面コーティングとして使用した場合、これらのＰＢＡＡは、それらの化学構造に応じて、インビトロおよびインビボの両方で異なるレベルの炎症を誘発した。このクラスの材料の大きな化学的多様性により、本発明者らはインビトロでマクロファージ活性化を阻害するポリマーコーティングを同定することができた。さらに、これらのコーティングは、カルボキシル化ポリスチレン微粒子の皮下移植後に、炎症細胞の動員を減少させ、線維症を減少させる。これらのポリマーは、細胞カプセル化のための高分子電解質複合体カプセルを形成するために使用され得る。本発明はまた、抗菌コーティング、ＤＮＡまたはｓｉＲＮＡ送達、および幹細胞組織工学などの多くの他の生物学的用途を有し得る。米国特許出願公開第２０１３０３０２４０１号明細書の教示は、本発明の系に適用することができる。

【０２８５】

別の実施形態では、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）が企図される。特に、脂質ナノ粒子に封入された抗トランスサイレチン低分子干渉ＲＮＡ（例えば、Ｃｏｅｌｈｏら、Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ２０１３；３６９：８１９－２９を参照）を本発明の系に適用してもよい。静脈内投与される体重ｋｇあたり約０．０１～約１ｍｇの用量が企図される。注入関連反応のリスクを低下させるための医薬が企図され、例えばデキサメタゾン、アセタミノフェン、ジフェンヒドラミンまたはセチリジン、およびラニチジンが企図される。５つの用量について４週間ごとに約０．３ｍｇ／キログラムの複数の用量も企図される。脂質としては、限定されないが、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ４、Ｃ１２－２００およびコリピドであるジステロイルホスファチジルコリン、コレステロール、およびＰＥＧ－ＤＭＧが挙げられ、これらは、自発的小胞形成手順を用いてｓｉＲＮＡ（例えば、Ｎｏｖｏｂｒａｎｔｓｅｖａ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ－Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ（２０１２）１，ｅ４；ｄｏｉ：１０．１０３８／ｍｔｎａ．２０１１．３参照）の代わりに配合されたＲＮＡであり得る。構成成分モル比は、約５０／１０／３８．５／１．５（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡまたはＣ１２－２００／ジステロイルホスファチジルコリン／コレステロール／ＰＥＧ－ＤＭＧ）であり得る。最終的な脂質：ｓｉＲＮＡ重量比は、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡおよびＣ１２－２００脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）の場合、それぞれ約１２：１および９：１であり得る。製剤は、９０％を超える捕捉効率で約８０ｎｍの平均粒径を有し得る。３ｍｇ／ｋｇ用量が企図され得る。

【０２８６】

ＬＮＰは、ｓｉＲＮＡを肝臓に送達するのに非常に有効であることが示されており（例えば、Ｔａｂｅｒｎｅｒｏら、Ｃａｎｃｅｒ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，Ａｐｒｉｌ ２０１３，Ｖｏｌ．３，Ｎｏ．４，ｐａｇｅｓ ３６３－４７０を参照）、したがって、ＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓを肝臓に送達することが企図されている。２週間ごとに６ｍｇ／ｋｇのＬＮＰ（またはＣＲＩＳＰＲ－ＣａｓのＲＮＡ）の約４回の投与量が企図され得る。Ｔａｂｅｒｎｅｒｏらは、０．７ｍｇ／ｋｇで投与した最初の２サイクルのＬＮＰ後に腫瘍退縮が観察され、６サイクルの終わりまでに患者はリンパ節転移の完全な退縮および肝腫瘍の実質的な縮小を伴う部分奏効を達成したことを実証した。この患者では４０回の投与後に完全奏効が得られ、この患者は寛解状態を維持し、２６ヶ月間にわたる投与を受けた後に処置を完了した。ＶＥＧＦ経路阻害剤による以前の治療後に進行していたＲＣＣおよび腎臓、肺、およびリンパ節を含む肝外疾患部位を有する２人の患者は、およそ８～１２ヶ月間、全ての部位で安定した疾患を有し、ＰＮＥＴおよび肝転移を有する患者は、１８ヶ月間（３６用量）延長試験を継続し、疾患が安定した。

【０２８７】

しかしながら、ＬＮＰの電荷を考慮しなければならない。カチオン性脂質として、負に

荷電した脂質と組み合わせて、細胞内送達を促進する非二重層構造を誘導した。静脈内注射後に荷電ＬＮＰが循環から迅速に除去されるので、７未満のｐＫａ値を有するイオン化可能なカチオン性脂質が開発された（例えば、Ｒｏｓｉｎら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９，ｎｏ．１２，ｐａｇｅｓ　１２８６－２２００，Ｄｅｃｅｍｂｅｒ　２０１１を参照のこと）。負に荷電したポリマー、例えばｓｉＲＮＡオリゴヌクレオチドを、イオン化可能な脂質が正の電荷を示す低ｐＨ値（例えば、ｐＨ４）でＬＮＰに負荷することができる。しかし、生理学的ｐＨ値では、ＬＮＰは、より長い循環時間に適合する低い表面電荷を示す。４種のイオン化可能なカチオン性脂質、すなわち１，２－ジリノイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキシ－３－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシ－ケト－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＫＤＭＡ）、および１，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ）に注目した。これらの脂質を含有するＬＮＰ　ｓｉＲＮＡ系は、インビボで肝細胞において顕著に異なる遺伝子サイレンシング特性を示し、効力は、第ＶＩＩ因子遺伝子サイレンシングモデルを使用した一連のＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ＞ＤＬｉｎＫＤＭＡ＞ＤＬｉｎＤＭＡ＞＞ＤＬｉｎＤＡＰに従って変動することが示されている（例えば、Ｒｏｓｉｎら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９，ｎｏ．１２，ｐａｇｅｓ　１２８６－２２００，Ｄｅｃｅｍｂｅｒ　２０１１を参照されたい）。特にＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡを含有する製剤について、１μｇ／ｍｌレベルの投与量が企図され得る。ＬＮＰの調製およびＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓカプセル化は、Ｒｏｓｉｎら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９，ｎｏ．１２，ｐａｇｅｓ　１２８６－２２００，Ｄｅｃｅｍｂｅｒ　２０１１）から使用および／または適合され得る。カチオン性脂質１，２－ジリノイル－３－ジメチルアンモニウム－プロパン（ＤＬｉｎＤＡＰ）、１，２－ジリノレイルオキシ－３－Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジリノレイルオキシケト－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＫ－ＤＭＡ）、１，２－ジリノレイル－４－（２－ジメチルアミノエチル）－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ）、（３－ｏ－［２’’－（メトキシポリエチレングリコール２０００）スクシノイル］－１，２－ジミリストイル－ｓｎ－グリコール（ＰＥＧ－Ｓ－ＤＭＧ）、およびＲ－３－［（ｗ－メトキシ－ポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－１，２－ジミリスチロキシルプロピル－３－アミン（ＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧ）は、Ｔｅｋｍｉｒａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（カナダ、バンクーバー）によって提供され得るか、または合成され得る。コレステロールは、Ｓｉｇｍａ（Ｓｔ　Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏ．）から購入することができる。特定のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ　ＲＮＡは、ＤＬｉｎＤＡＰ、ＤＬｉｎＤＭＡ、ＤＬｉｎＫ－ＤＭＡ、およびＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ（カチオン性脂質：ＤＳＰＣ：ＣＨＯＬ：ＰＥＧ－ＤＭＧまたはＰＥＧ－Ｃ－ＤＯＭＧ、モル比４０：１０：４０：１０）を含有するＬＮＰにカプセル化され得る。必要に応じて、０．２％　ＳＰ－ＤｉＯＣ１８（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、バーリントン、カナダ）を組み込んで、細胞取り込み、細胞内送達および体内分布を評価してもよい。カプセル化は、カチオン性脂質：ＤＳＰＣ：コレステロール：ＰＥＧ－ｃ－ＤＯＭＧ（４０：１０：４０：１０モル比）で構成される脂質混合物をエタノールに溶解して、１０ｍｍｏｌ／１の最終脂質濃度にすることによって実施され得る。脂質のこのエタノール溶液を５０ｍｍｏｌ／１クエン酸、ｐＨ４．０に滴下して多層小胞を形成し、３０％エタノール（ｖｏｌ／ｖｏｌ）の最終濃度を生成してもよい。大きな単層小胞は、押出機（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ　Ｌｉｐｉｄｓ、バンクーバー、カナダ）を使用して積層された２つの８０ｎｍ　Ｎｕｃｌｅｐｏｒｅポリカーボネートフィルタを通して多層小胞を押し出した後に形成され得る。カプセル化は、３０％エタノール（ｖｏｌ／ｖｏｌ）を含有する５０ｍｍｏｌ／１クエン酸、ｐＨ４．０に２ｍｇ／ｍｌで溶解したＲＮＡを、押し出された予め形成された大きな単層小胞に滴下して、３１℃で３０分間、一定に混合しながら０．０６／１（ｗｔ／ｗｔ）の最終ＲＮＡ／脂質重量比までインキュベートすることによって達成され得る。エタノールの除去および製剤緩衝液の中和を、Ｓｐｅｃｔｒａ／Ｐｏ

ｒ２再生セルロース透析膜を使用して、ｐＨ７．４のリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）に対して１６時間透析することによって行った。ナノ粒子サイズ分布は、ＮＩＣＯＭＰ　３７０粒子サイザー、小胞／強度モード、およびガウシアンフィッティング（Ｎｉｃｏｍｐ　Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｓｉｚｉｎｇ，Ｓａｎｔａ　Ｂａｒｂａｒａ，Ｃａｌｉｆ．）を使用した動的光散乱によって決定され得る。３つ全てのＬＮＰ系の粒径は、直径約７０ｎｍであり得る。ｓｉＲＮＡカプセル化効率は、透析前後に採取した試料からＶｉｖａＰｕｒｅＤ　ＭｉｎｉＨカラム（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　Ｓｔｅｄｉｍ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）を用いて遊離ｓｉＲＮＡを除去することによって決定され得る。封入されたＲＮＡは、溶出ナノ粒子から抽出され、２６０ｎｍで定量され得る。Ｗａｋｏ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ　ＵＳＡ（バージニア州リッチモンド）からのコレステロールＥ酵素アッセイを使用して、小胞中のコレステロール含有量の測定によって、ｓｉＲＮＡ対脂質比を決定した。ＰＥＧ化リポソーム（またはＬＮＰ）も送達に使用することができる。

【０２８８】

大きなＬＮＰの調製は、Ｒｏｓｉｎら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，ｖｏｌ．１９，ｎｏ．１２，ｐａｇｅｓ　１２８６－２２００，Ｄｅｃｅｍｂｅｒ　２０１１）から使用および／または適合され得る。脂質プレミックス溶液（２０．４ｍｇ／ｍｌの総脂質濃度）は、ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＳＰＣ、およびコレステロールを５０：１０：３８．５のモル比で含有するエタノール中で調製され得る。酢酸ナトリウムを０．７５：１（酢酸ナトリウム：ＤＬｉｎＫＣ２－ＤＭＡ）のモル比で脂質プレミックスに添加してもよい。その後、激しく撹拌しながら混合物を１．８５体積のクエン酸緩衝液（１０ｍｍｏｌ／１、ｐＨ３．０）と合わせることによって脂質を水和させ、３５％エタノールを含有する水性緩衝液中で自発的にリポソームを形成させ得る。リポソーム溶液は、時間依存的な粒径の増大を可能にするために３７℃でインキュベートされ得る。動的光散乱（Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　Ｎａｎｏ　ＺＳ，Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒｓｈｉｒｅ，ＵＫ）によるリポソームサイズの変化を調べるために、インキュベーション中の様々な時点でアリコートが除去され得る。所望の粒径が達成されたら、ＰＥＧ脂質水溶液（ストック＝３５％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）エタノール中１０ｍｇ／ｍｌのＰＥＧ－ＤＭＧ）をリポソーム混合物に添加して、総脂質の３．５％の最終ＰＥＧモル濃度を得てもよい。ＰＥＧ－脂質を添加すると、リポソームはそれらのサイズを有し、さらなる成長を効果的に停止させるはずである。次いで、ＲＮＡを、およそ１：１０（ｗｔ：ｗｔ）のｓｉＲＮＡ対総脂質比で空のリポソームに添加し、続いて３７℃で３０分間インキュベートして、負荷されたＬＮＰが形成され得る。その後、混合物をＰＢＳ中で一晩透析し、０．４５μｍシリンジフィルタで濾過してもよい。

【０２８９】

Ｓｐｈｅｒｉｃａｌ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ（ＳＮＡ（商標））構築物および他のナノ粒子（特に金ナノ粒子）もまた、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を意図された標的に送達する手段として企図される。重要なデータは、核酸官能化金ナノ粒子に基づくＡｕｒａＳｅｎｓｅ　ＴｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓのＳｐｈｅｒｉｃａｌ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ（ＳＮＡ（商標））構築物が、以下のような複数の重要な成功要因に基づく代替プラットフォームよりも優れていることを示している。

【０２９０】

高いインビボ安定性。それらの高密度負荷のために、カーゴ（ＤＮＡまたはｓｉＲＮＡ）の大部分は細胞内の構築物に結合したままであり、核酸安定性および酵素分解に対する耐性を付与する。

【０２９１】

送達性。研究された全ての細胞型（例えば、ニューロン、腫瘍細胞株など）について、構築物は、担体または形質移入剤を必要とせずに９９％の形質移入効率を示す。

【０２９２】

治療標的化。構築物の独特の標的結合親和性および特異性は、一致した標的配列に対する優れた特異性（すなわち、限られたオフターゲット効果）を可能にする。

【０２９３】
優れた有効性。構築物は、主要な従来の形質移入試薬（リポフェクトアミン２０００およびＣｙｔｏｆｅｃｔｉｎ）よりも有意に優れている。
【０２９４】
低毒性。構築物は、明らかな毒性を伴わずに様々な培養細胞、初代細胞および組織に入ることができる。
【０２９５】
有意な免疫応答なし。構築物は、全ゲノムマイクロアレイ研究およびサイトカイン特異的タンパク質アッセイによって測定される全体的な遺伝子発現の最小限の変化を誘発する。
【０２９６】
化学的適応性。任意の数の単剤またはコンビナトリアル剤（例えば、タンパク質、ペプチド、小分子）を使用して、構築物の表面を適応させることができる。
【０２９７】
核酸に基づく治療のためのこのプラットフォームは、炎症および感染症、癌、皮膚障害および心血管疾患を含む多数の疾患状態に適用可能であり得る。
【０２９８】
引用文献には以下が含まれる：Ｃｕｔｌｅｒら、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１１　１３３：９２５４－９２５７、Ｈａｏら、Ｓｍａｌｌ．２０１１　７：３１５８－３１６２、Ｚｈａｎｇら、ＡＣＳ　Ｎａｎｏ．２０１１　５：６９６２－６９７０、Ｃｕｔｌｅｒら、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１２　１３４：１３７６－１３９１、Ｙｏｕｎｇら、Ｎａｎｏ　Ｌｅｔｔ．２０１２　１２：３８６７－７１、Ｚｈｅｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２０１２　１０９：１１９７５－８０、Ｍｉｒｋｉｎ，Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ　２０１２　７：６３５－６３８　Ｚｈａｎｇら、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．２０１２　１３４：１６４８８－１６９１、Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，Ｎａｔｕｒｅ　２０１３　４９５：Ｓ１４－Ｓ１６、Ｃｈｏｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２０１３　１１０（１９）：７６２５－７６３０、Ｊｅｎｓｅｎら、Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．５，２０９ｒａ１５２（２０１３）およびＭｉｒｋｉｎ，ら、Ｓｍａｌｌ，ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１００２／ｓｍｌｌ．２０１３０２１４３。
【０２９９】
ｓｉＲＮＡを有する自己集合性ナノ粒子は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）の遠位端に結合したＡｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ（ＲＧＤ）ペプチドリガンドでＰＥＧ化されるポリエチレンイミン（ＰＥＩ）を用いて、例えば、インテグリンを発現する腫瘍血管新生を標的化するための手段として構築され得、ｓｉＲＮＡ阻害性血管内皮成長因子受容体－２（ＶＥＧＦ　Ｒ２）発現を送達するために使用され、それにより、腫瘍血管新生がもたらされる（例えば、Ｓｃｈｉｆｆｅｌｅｒｓら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２００４，Ｖｏｌ．３２，Ｎｏ．１９）。等量のカチオン性ポリマーおよび核酸の水溶液を混合して、２～６の範囲の正味モル過剰のイオン化可能な窒素（ポリマー）対リン酸（核酸）を得ることによって、ナノプレックスが調製され得る。カチオン性ポリマーと核酸との間の静電相互作用は、約１００ｎｍの平均粒径分布を有するポリプレックスの形成をもたらし、したがって本明細書ではナノプレックスと呼ばれる。Ｓｃｈｉｆｆｅｌｅｒｓらの自己集合性ナノ粒子における送達のために、約１００～２００ｍｇのＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの投与量が想定される。
【０３００】
Ｂａｒｔｌｅｔｔら（ＰＮＡＳ、２００７年９月２５日、第１０４巻、Ｎｏ．３９）のナノプレックスを本発明に適用してもよい。Ｂａｒｔｌｅｔｔらのナノプレックスは、等量のカチオン性ポリマーおよび核酸の水溶液を混合して、２～６の範囲の正味モル過剰のイオン化可能な窒素（ポリマー）対リン酸（核酸）を得ることによって調製され得る。カチオン性ポリマーと核酸との間の静電相互作用は、約１００ｎｍの平均粒径分布を有する

ポリプレックスの形成をもたらし、したがって本明細書ではナノプレックスと呼ばれる。ＢａｒｔｌｅｔｔらのＤＯＴＡ－ｓｉＲＮＡは、以下のように合成した：１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸モノ（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル）（ＤＯＴＡ－ＮＨＳｅｓｔｅｒ）をＭａｃｒｏｃｙｃｌｉｃｓ（テキサス州ダラス）から注文した。炭酸緩衝液（ｐＨ９）中１００倍モル過剰のＤＯＴＡ－ＮＨＳ－エステルを含むアミン修飾ＲＮＡセンス鎖を微小遠心管に添加した。内容物を室温で４時間撹拌することによって反応させた。ＤＯＴＡ－ＲＮＡセンスコンジュゲートをエタノール沈殿させ、水に再懸濁し、未修飾アンチセンス鎖にアニーリングしてＤＯＴＡ－ｓｉＲＮＡを得た。全ての液体をＣｈｅｌｅｘ－１００（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，Ｃａｌｉｆ．）で前処理して微量金属汚染物質を除去した。Ｔｆ標的化および非標的化ｓｉＲＮＡナノ粒子は、シクロデキストリン含有ポリカチオンを使用することによって形成され得る。典型的には、ナノ粒子は、３（＋／－）の電荷比および０．５ｇ／リットルのｓｉＲＮＡ濃度で水中で形成された。標的化ナノ粒子の表面上のアダマンタン－ＰＥＧ分子の１％をＴｆで修飾した（アダマンタン－ＰＥＧ－Ｔｆ）。ナノ粒子を注射用の５％（ｗｔ／ｖｏｌ）グルコース担体溶液に懸濁した。

【０３０１】

Ｄａｖｉｓら（Ｎａｔｕｒｅ，Ｖｏｌ ４６４，１５ Ａｐｒ．２０１０）は、標的化ナノ粒子送達系を用いたｓｉＲＮＡ臨床試験を実施している（臨床試験登録番号ＮＣＴ００６８９０６５）。標準治療に難治性の固形癌を有する患者に、２１日間のサイクルの第１、３、８および１０日目に３０分間の静脈内注入によって標的化ナノ粒子の用量を投与する。ナノ粒子は、以下を含有する合成送達系からなる。（１）線状シクロデキストリン系ポリマー（ＣＤＰ）、（２）癌細胞の表面上のＴＦ受容体（ＴＦＲ）と係合するようにナノ粒子の外側に提示されたヒトトランスフェリンタンパク質（ＴＦ）標的化リガンド、（３）親水性ポリマー（生体液中のナノ粒子安定性を促進するために使用されるポリエチレングリコール（ＰＥＧ））、および（４）ＲＲＭ２の発現を減少させるように設計されたｓｉＲＮＡ（臨床で使用される配列は以前はｓｉＲ２Ｂ＋５と示されていた）。ＴＦＲは、悪性細胞においてアップレギュレートされることが長い間知られており、ＲＲＭ２は確立された抗癌標的である。これらのナノ粒子（ＣＡＬＡＡ－０１として示される臨床バージョン）は、非ヒト霊長類における複数回投与研究において十分に忍容性であることが示されている。慢性骨髄性白血病を有する１人の患者にリポソーム送達によってｓｉＲＮＡを投与したが、Ｄａｖｉｓらの臨床試験は、標的化送達系を用いてｓｉＲＮＡを全身送達し、固形癌を有する患者を処置するための最初のヒト試験である。標的化送達系がヒト腫瘍への機能的ｓｉＲＮＡの効果的な送達を提供することができるかどうかを確認するために、Ｄａｖｉｓらは、３つの異なる投与コホートからの３人の患者からの生検を調査した。患者Ａ、ＢおよびＣは、いずれも転移性メラノーマを有し、それぞれ１８、２４および３０ｍｇのｍ$^{-2}$ ｓｉＲＮＡのＣＡＬＡＡ－０１用量を受けた。本発明のＣＲＩＳＰＲ Ｃａｓ系についても同様の用量が企図され得る。本発明の送達は、線状シクロデキストリン系ポリマー（ＣＤＰ）、癌細胞の表面上のＴＦ受容体（ＴＦＲ）と係合するようにナノ粒子の外側に提示されたヒトトランスフェリンタンパク質（ＴＦ）標的化リガンドおよび／または親水性ポリマー（例えば、生体液中のナノ粒子安定性を促進するために使用されるポリエチレングリコール（ＰＥＧ））を含有するナノ粒子を用いて達成され得る。

【０３０２】

本発明による送達または投与は、リポソームを用いて行うことができる。リポソームは、内部の水性区画を取り囲む単層または多層の脂質二重層と、比較的不透過性の外側の親油性リン脂質二重層とから構成される球状の小胞構造である。リポソームは、生体適合性で非毒性であり、親水性薬物分子と親油性薬物分子の両方を送達し、それらのカーゴを血漿酵素による分解から保護し、それらの負荷を生体膜および血液脳関門（ＢＢＢ）を横切って輸送することができるので、薬物送達担体としてかなり注目されている（レビューについては、例えば、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１

２　ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照されたい）。

【０３０３】

リポソームは、いくつかの異なるタイプの脂質から作製することができるが、リン脂質が、薬物担体としてリポソームを生成するために最も一般的に使用される。リポソーム形成は、脂質膜を水溶液と混合すると自発的に起こるが、ホモジナイザー、超音波処理機または押出装置を用いて、振とうの形で力を加えることにより促進することもできる（レビューについては、例えば、Ｓｐｕｃｈ　ａｎｄ　Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ　ＩＤ　４６９６７９，１２　ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照されたい）。

【０３０４】

構造および特性を改変するために、いくつかの他の添加剤をリポソームに添加してもよい。例えば、リポソーム構造の安定化を助け、リポソーム内部カーゴの漏出を防ぐために、コレステロールまたはスフィンゴミエリンのいずれかをリポソーム混合物に添加してもよい。さらに、水素化卵ホスファチジルコリンまたは卵ホスファチジルコリン、コレステロール、およびリン酸ジセチルからリポソームを調製し、それらの平均小胞サイズを約５０および１００ｎｍに調整した（レビューについては、例えば、Ｓｐｕｃｈ　ａｎｄ　Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ　ＩＤ　４６９６７９，１２　ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照されたい）。

【０３０５】

従来のリポソーム製剤は、主に天然リン脂質および脂質、例えば１，２－ジステアロリル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、スフィンゴミエリン、卵ホスファチジルコリンおよびモノシアロガングリオシドから構成される。この製剤はリン脂質のみで構成されているため、リポソーム製剤は多くの課題に直面しており、その１つは血漿中の不安定性である。これらの課題を克服するためのいくつかの試みが、具体的には脂質膜の操作においてなされてきた。これらの試みの１つは、コレステロールの操作に焦点を当てた。従来の製剤へのコレステロールの添加は、カプセル化された生物活性化合物の血漿中への迅速な放出を減少させるか、または１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）は安定性を増加させる（レビューについては、例えば、Ｓｐｕｃｈ　ａｎｄ　Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ　ＩＤ　４６９６７９，１２　ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照されたい）。

【０３０６】

特に有利な実施形態では、Ｔｒｏｊａｎ　Ｈｏｒｓｅリポソーム（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｒｏｊａｎ　Ｈｏｒｓｅｓとしても知られている）が望ましく、プロトコルはｃｓｈｐｒｏｔｏｃｏｌｓ．ｃｓｈｌｐ．ｏｒｇ／ｃｏｎｔｅｎｔ／２０１０／４／ｐｄｂ．ｐｒｏｔ５４０７．ｌｏｎｇに見出すことができる。これらの粒子は、血管内注射後に脳全体への導入遺伝子の送達を可能にする。限定するものではないが、表面にコンジュゲートされた特異的抗体を有する中性脂質粒子は、エンドサイトーシスを介した血液脳関門の横断を可能にすると考えられる。出願人は、胚操作を必要とせずに全脳トランスジェニック動物を可能にする血管内注射を介して脳にヌクレアーゼのＣＲＩＳＰＲファミリーを送達するためにＴｒｏｊａｎ　Ｈｏｒｓｅリポソームを利用することを主張する。約１～５ｇの核酸分子、例えばＤＮＡ、ＲＮＡが、リポソームにおけるインビボ投与のために企図され得る。

【０３０７】

別の実施形態では、系は、安定な核酸－脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）などのリポソーム中で投与され得る（例えば、Ｍｏｒｒｉｓｓｅｙら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏ

ｇｙ，Ｖｏｌ．２３，Ｎｏ．８，Ａｕｇｕｓｔ　２００５を参照）。ＳＮＡＬＰにおいて標的とされる特定のＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの約１、３または５ｍｇ／ｋｇ／日の毎日の静脈内注射が企図される。毎日の処置は、約３日間にわたって行われ、次いで、約５週間にわたって毎週行われてもよい。別の実施形態では、ａｂｐｉｔ　１または２．５ｍｇ／ｋｇの用量で静脈内注射によって投与される特異的ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ封入ＳＮＡＬＰ）も企図される（例えば、Ｚｉｍｍｅｒｍａｎら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，Ｖｏｌ．４４１，４　Ｍａｙ　２００６を参照）。ＳＮＡＬＰ製剤は、２：４０：１０：４８のモルパーセント比で、脂質３－Ｎ－［（ｗメトキシポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－１，２－ジミリスチロキシ－プロピルアミン（ＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡ）、１，２－ジリノレイロキシ－Ｎ，Ｎ－ジメチル－３－アミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ）およびコレステロールを含有し得る（例えば、Ｚｉｍｍｅｒｍａｎら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，Ｖｏｌ．４４１，４　Ｍａｙ　２００６を参照）。

【０３０８】

別の実施形態では、安定な核酸－脂質粒子（ＳＮＡＬＰ）は、高度に血管新生したＨｅｐＧ２由来肝腫瘍への効果的な送達分子であるが、血管新生が不十分なＨＣＴ－１１６由来肝腫瘍では効果的な送達分子ではないことが証明されている（例えば、Ｌｉ，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ（２０１２）１９，７７５－７８０を参照）。ＳＮＡＬＰリポソームは、２５：１の脂質／ｓｉＲＮＡ比および４８／４０／１０／２のモル比のコレステロール／Ｄ－Ｌｉｎ－ＤＭＡ／ＤＳＰＣ／ＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡを使用して、Ｄ－Ｌｉｎ－ＤＭＡおよびＰＥＧ－Ｃ－ＤＭＡをジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、コレステロールおよびｓｉＲＮＡと製剤化することによって調製され得る。得られたＳＮＡＬＰリポソームのサイズは約８０～１００ｎｍである。

【０３０９】

さらに別の実施形態では、ＳＮＡＬＰは、合成コレステロール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ　Ｌｏｕｉｓ，Ｍｏ．，ＵＳＡ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ，Ａｌａｂａｓｔｅｒ，Ａｌａ．，ＵＳＡ）、３－Ｎ－［（ｗ－メトキシポリ（エチレングリコール）２０００）カルバモイル］－１，２－ジミリスチロキシプロピルアミン、およびカチオン性１，２－ジリノレイルオキシ－３－Ｎ，Ｎジメチルアミノプロパンを含み得る（例えば、Ｇｅｉｓｂｅｒｔら、Ｌａｎｃｅｔ　２０１０；３７５：１８９６－９０５参照）。例えばボーラス静脈内注入として投与される用量あたり約２ｍｇ／ｋｇの総ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓの投与量が企図され得る。

【０３１０】

さらに別の実施形態では、ＳＮＡＬＰは、合成コレステロール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＳＰＣ；Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ　Ｉｎｃ．）、ＰＥＧ－ｃＤＭＡ、および１，２－ジリノレイルオキシ－３－（Ｎ；Ｎ－ジメチル）アミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）を含み得る（例えば、Ｊｕｄｇｅ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１９：６６１－６７３（２００９）を参照）。インビボ研究に使用される製剤は、約９：１の最終脂質／ＲＮＡ質量比を含み得る。

【０３１１】

アミノ脂質２，２－ジリノレイル－４－ジメチルアミノエチル－［１，３］－ジオキソラン（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ）などの他のカチオン性脂質を利用して、ＳｉＲＮＡと同様にＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓをカプセル化することができる（例えば、Ｊａｙａｒａｍａｎ，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔ．Ｅｄ．２０１２，５１，８５２９－８５３３を参照）。以下の脂質組成を有する予め形成された小胞も企図され得る：アミノ脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、コレステロール、および（Ｒ）－２，３－ビス（オクタデシルオキシ）プロピル－１－（メトキシポリ（エチレングリコール）２０００）プロピルカルバメート（ＰＥＧ－脂質）をそれぞれモル比４０／１０／４０／１０、およびＦＶＩＩ　ｓｉＲＮＡ／総脂質比がおよそ０．０５（ｗ／ｗ）。７０～９０ｎｍの

範囲の狭い粒径分布および０．１１＿０．０４（ｎ＝５６）の低い多分散性指数を確保するために、ＣＲＩＳＰＲ　Ｃａｓ　ＲＮＡを添加する前に、粒子を８０ｎｍ膜を通して最大３回押し出すことができる。非常に強力なアミノ脂質１６を含有する粒子を使用することができ、４つの脂質構成成分１６、ＤＳＰＣ、コレステロールおよびＰＥＧ－脂質のモル比（５０／１０／３８．５／１．５）が、インビボ活性を増強するためにさらに最適化され得る。

【０３１２】

当技術分野で公知のいずれかの適切なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ遺伝子編集系のいずれかの要素を、必要に応じて本明細書中に記載の系および方法において使用し得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ遺伝子編集技術は、例えば、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１４／００６８７９７号；米国特許第８，６９７，３５９号；第８，７７１，９４５号；および第８，９４５，８３９号；ＵＳ２０１０／００７６０５７；ＵＳ２０１１／０１８９７７６；ＵＳ２０１１／０２２３６３８；ＵＳ２０１３／０１３０２４８；ＷＯ／２００８／１０８９８９；ＷＯ／２０１０／０５４１０８；ＷＯ／２０１２／１６４５６５；ＷＯ／２０１３／０９８２４４；ＷＯ／２０１３／１７６７７２；ＵＳ２０１５００５０６９９；ＵＳ２０１５００４５５４６；ＵＳ２０１５００３１１３４；ＵＳ２０１５００２４５００；ＵＳ２０１４０３７７８６８；ＵＳ２０１４０３５７５３０；ＵＳ２０１４０３４９４００；ＵＳ２０１４０３３５６２０；ＵＳ２０１４０３３５０６３；ＵＳ２０１４０３１５９８５；ＵＳ２０１４０３１０８３０；ＵＳ２０１４０３１０８２８；ＵＳ２０１４０３０９４８７；ＵＳ２０１４０３０４８５３；ＵＳ２０１４０２９８５４７；ＵＳ２０１４０２９５５５６；ＵＳ２０１４０２９４７７３；ＵＳ２０１４０２８７９３８；ＵＳ２０１４０２７３２３４；ＵＳ２０１４０２７３２３２；ＵＳ２０１４０２７３２３１；ＵＳ２０１４０２７３２３０；ＵＳ２０１４０２７１９８７；ＵＳ２０１４０２５６０４６；ＵＳ２０１４０２４８７０２；ＵＳ２０１４０２４２７０２；ＵＳ２０１４０２４２７００；ＵＳ２０１４０２４２６９９；ＵＳ２０１４０２４２６６４；ＵＳ２０１４０２３４９７２；ＵＳ２０１４０２２７７８７；ＵＳ２０１４０２１２８６９；ＵＳ２０１４０２０１８５７；ＵＳ２０１４０１９９７６７；ＵＳ２０１４０１８９８９６；ＵＳ２０１４０１８６９５８；ＵＳ２０１４０１８６９１９；ＵＳ２０１４０１８６８４３；ＵＳ２０１４０１７９７７０；ＵＳ２０１４０１７９００６；およびＵＳ２０１４０１７０７５３で詳細に記載されている。

【０３１３】

本発明およびその利点を詳細に説明してきたが、添付の特許請求の範囲に定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本明細書において様々な変更、置換および変更を行うことができることを理解されたい。

【０３１４】

本発明は、例示のみを目的として与えられ、決して本発明を限定することを意図しない以下の実施例においてさらに説明される。

【実施例】

【０３１５】

実施例１－材料および方法

ＲｅｃＥ／Ｔ相同スクリーニング　ＲｅｆＳｅｑ非冗長性タンパク質データベースを、２０１９年１０月２９日にＮＣＢＩからダウンロードした。タンパク質相同体を検索するために、位置特異的反復（ＰＳＩ）－ＢＬＡＳＴ[1]を使用して、クエリとして大腸菌Ｒａｃプロファージ ＲｅｃＴ（ＮＰ＿４１５８６５．１）およびＲｅｃＥ（ＮＰ＿４１５８６６．１）を用いてデータベースを検索した。ヒットをＣＤ－ＨＩＴ２でクラスター化し、代表的な配列を、ＭＵＳＣＬＥ[3]との多重アライメントのために各クラスターから選択した。次に、デフォルトパラメータによる最尤ツリー再構成（ｍａｘｉｍｕｍ　ｌｉｋｅｌｉｈｏｏｄ　ｔｒｅｅ　ｒｅｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ）に対してＦａｓｔＴｒｅｅ４を使用した。ＲｅｃＥＴ相同体の多様なセットを選択し、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔによって合成し、試験のためにｐＭＰＨ＿ＭＣＰベクターにクローニングした。

【０３１６】
プラスミド構築　ｐＸ３３０、ｐＭＰＨおよびｐＵ６－（ＢｂｓＩ）＿ＣＢｈ－Ｃａｓ９－Ｔ２Ａ－ＢＦＰプラスミドをＡｄｄｇｅｎｅから得た。試験したエフェクターＤＮＡ断片は、ＩＤＴ，ＧｅｎｅｗｉｚおよびＧｅｎＳｃｒｉｐｔから注文された。ＮＥＢｕｉｌｄｅｒ　ＨｉＦｉ　ＤＮＡ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ）を使用して、骨格に断片をＧｉｂｓｏｎアセンブルした。Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅクローニングを使用して全てのｓｇＲＮＡ（表３）を骨格に挿入した。全てのコンストラクトに対して、準備したプラスミドのサンガーシーケンシングで配列確認を行った。

【表３】

表3. sgRNAに対する配列

プライマー名	ゲノム標的	配列
sp-EMX1	*EMX1*	GTCACCTCCAATGACTAGGG (配列番号21)
sp-VEGFA	*VEGFA*	GGTGAGTGAGTGTGTGCGTG (配列番号22)
sp-DYNLT1	*DYNLT1*	AAGGCCATAGGCTGGACTGC (配列番号23)
sp-HSP90AA1	*HSP90AA1*	GTAGACTAATCTCTGGCTGA (配列番号24)
sp-OCT4	*OCT4*	TCTCCCATGCATTCAAACTG (配列番号25)
sp-AAVS1	*AAVS1*	ACCCCACAGTGGGGCCACTA (配列番号26)
nsp-EMX1-ガイド1	*EMX1*	GTCACCTCCAATGACTAGGG (配列番号27)
nsp-EMX1-ガイド2	*EMX1*	GTCACCTCCAATGACTAGGG (配列番号28)
nsp-DYNLT1-ガイド1	*DYNLT1*	AAGGCCATAGGCTGGACTGC (配列番号29)
nsp-DYNLT1-ガイド2	*DYNLT1*	GGCACTGACGATGCAGTACA (配列番号30)
nsp-HSP90AA1-ガイド1	*HSP90AA1*	GTAGACTAATCTCTGGCTGA (配列番号31)
nsp-HSP90AA1-ガイド2	*HSP90AA1*	TCGTCATCTCCTTCAAGGGG (配列番号32)
nsp-OCT4-ガイド1	*OCT4*	ATGCATGGGAGAGCCCAGAG (配列番号33)
nsp-OCT4-ガイド2	*OCT4*	GCCTGCCCTTCTAGGAATGG (配列番号34)

【０３１７】
１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ、ＨｙＣｌｏｎｅ）、１００Ｕ／ｍＬペニシリンおよび１００μｇ／ｍＬストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を含むダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中、３７℃、５％CO_2で、細胞培養ヒト胎児腎臓（ＨＥＫ）２９３Ｔ、ＨｅＬａおよびＨｅｐＧ２を維持した。

【０３１８】
ｍＴｅＳＲ１培地（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中、３７℃、５％CO_2でｈＥＳ－Ｈ９細胞を維持した。使用の１２時間前に培養プレートをマトリゲル（Ｃｏｒｎｉｎｇ）で予めコーティングし、継代後の最初の２４時間にわたり細胞に１０μＭのＹ２７６３２（Ｓｉｇｍａ）を補充した。培養培地を２４時間ごとに交換した。

【０３１９】
形質移入　形質移入の１２～２４時間前にＨＥＫ２９３Ｔ細胞を９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）に細胞３０，０００個／ウェルの密度で播種し、ウェルあたり２５０ｎｇの総ＤＮＡを形質移入した。形質移入の１日前に、ＨｅＬａおよびＨｅｐＧ２細胞をそれぞれ細胞５０，０００および３０，０００個／ウェルの密度で４８ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）に播種し、ウェルあたり４００ｎｇの総ＤＮＡを形質移入した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　３０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて、製造業者の指示に従って形質移入を実施した。

【０３２０】
エレクトロポレーション　ｈＥＳ－Ｈ９関連形質移入実験のために、Ｐ３　Ｐｒｉｍａｒｙ　Ｃｅｌｌ　４Ｄ－ＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒＴＭ　Ｘ　Ｋｉｔ　Ｓ（Ｌｏｎｚａ）を製造業者のプロトコールに従って使用した。各反応について、ＤＣ１００　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　Ｐｒｏｇｒａｍを使用して、３００，０００個の細胞に対して４μｇの

トータルＤＮＡでヌクレオフェクションを行った。

【０３２１】

蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）ｍＫａｔｅノックイン効率をＣｙｔｏＦＬＥＸフローサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ；Ｓｔａｎｆｏｒｄ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ＦＡＣＳ Ｃｏｒｅ）で分析した。形質移入の７２時間後、細胞をＰＢＳで１回洗浄し、ＴｒｙｐＬＥ Ｅｘｐｒｅｓｓ Ｅｎｚｙｍｅ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で解離させた。次いで、細胞懸濁液を９６ウェルＵ底プレート（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に移し、３００ｘＧで５分間遠心分離した。上清を除去した後、ペレット化した細胞を５０μｌのＰＢＳ中４％ＦＢＳで再懸濁し、調製の３０分以内に細胞を選別した。

【０３２２】

プラスミドＤＮＡおよびＰＣＲ鋳型を用いてＲＦＬＰ ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に対して形質移入を行い、製造業者のプロトコールに従ってＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ ＤＮＡ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｂｉｏｓｅａｒｃｈ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してゲノムＤＮＡのために７２時間後に回収した。ＰＣＲ鋳型の相同アームの外側の特異的プライマーを使用して標的ゲノム領域を増幅させた。ＰＣＲ産物をＭｏｎａｒｃｈ ＰＣＲ＆ＤＮＡ Ｃｌｅａｎｕｐ Ｋｉｔ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ）で精製した。３００ｎｇの精製産物をＢｓｒＧＩ（ＥＭＸ１、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ）またはＸｂａＩ（ＶＥＧＦＡ、ＮＥＢ）で消化し、消化した産物を５％Ｍｉｎｉ－ＰＲＯＴＥＡＮ ＴＢＥゲル（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）上で分析した。

【０３２３】

次世代シーケンシングライブラリの調製 形質移入の７２時間後にＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ ＤＮＡ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｂｉｏｓｅａｒｃｈ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いてゲノムＤＮＡを抽出した。２００ｎｇのトータルＤＮＡをＮＧＳライブラリ調製のために使用した。１回目のＰＣＲ反応のために特異的プライマー（表４）を使用して、関心対象の遺伝子を増幅した。表４に列挙したプライマーを用いた２回目のＰＣＲによって、Ｉｌｌｕｍｉｎａアダプターおよびインデックスバーコードを断片に付加した。Ｍｏｎａｒｃｈ ＤＮＡ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＮＥＢ）を使用して２％アガロースゲル上でのゲル電気泳動によって２回目のＰＣＲの産物を精製した。精製された生成物を、Ｑｕｂｉｔ ｄｓＤＮＡ ＨＳ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）により定量し、製造業者の指示に従ってＩｌｌｕｍｉｎａ ＭｉＳｅｑでシーケンシングを行った。

【表４－１】

表4. PCR鋳型、RFLPおよびNGSに対して使用されるプライマーについての配列

プライマー名	利用用途	ゲノム標的	配列
EMX1-PCR-F	PCR鋳型	*EMX1*	CATTCTGCCTCTCTGTATGGAAAAGAGC（配列番号35）
EMX1-PCR-R	PCR鋳型	*EMX1*	CCCATTGAACTACCTGGGCCTGATTC（配列番号36）
VEGFA-PCR-F	PCR鋳型	*VEGFA*	AGGTTTGAATCATCACGCAGGC（配列番号37）
VEGFA-PCR-R	PCR鋳型	*VEGFA*	ATTCAAGTGGGGAATGGCAAGC（配列番号38）
DYNLT1-PCR-100bp-F	PCR鋳型	*DYNLT1*	TGCCGTAAATGCTGCTCTCT（配列番号 39）
DYNLT1-PCR-200bp-F	PCR鋳型	*DYNLT1*	AGACTTGCCAAGGTTCTTTGTG（配列番号40）
DYNLT1-PCR-400bp-F	PCR鋳型	*DYNLT1*	AGTGACCTGTGTAATTATGCAGAAG（配列番号41）

【表４－２】

DYNLT1-PCR-100bp-R	PCR鋳型	*DYNLT1*	TGAAAGTGCCACAAAACAAAGAGA（配列番号42）
DYNLT1-PCR-200bp-R	PCR鋳型	*DYNLT1*	AAGACAAGTGGCAACGCAG（配列番号43）
DYNLT1-PCR-400bp-R	PCR鋳型	*DYNLT1*	CGTTTATGATACTATGCAGACTATGAAGAAC（配列番号44）
HSP90AA1-PCR-100bp-F	PCR鋳型	*HSP90AA1*	ATGAAGATGACCCTACTGCTGAT（配列番号45）
HSP90AA1-PCR-200bp-F	PCR鋳型	*HSP90AA1*	TACTGTCTTGAAAGCAGATAGAAACC（配列番号46）
HSP90AA1-PCR-600bp-R	PCR鋳型	*HSP90AA1*	GCAGCAAAGAAACACCTGGA（配列番号47）
HSP90AA1-PCR-100bp-R	PCR鋳型	*HSP90AA1*	GTTGTCATGCCATACAGACTTTTT（配列番号48）
HSP90AA1-PCR-200bp-R	PCR鋳型	*HSP90AA1*	AGCATTACTAGCTCTGCTTTAGTG（配列番号49）
HSP90AA1-PCR-600bp-R	PCR鋳型	*HSP90AA1*	TCCACAAGACTGGGTCTGAG（配列番号50）
OCT4-PCR-F	PCR鋳型	*OCT4*	GCGACTATGCACAACGAGAGG（配列番号51）
OCT4-PCR-R	PCR鋳型	*OCT4*	AAGTGTGTCTATCTACTGTGTCCCAG（配列番号52））
AAVS1-PCR-F	PCR鋳型	*AAVS1*	GATGCTCTTTCCGGAGCACT（配列番号53）
AAVS1-PCR-R	PCR鋳型	*AAVS1*	GCCAAGGACTCAAACCCAGAA（配列番号54）
EMX1-RFLP-F	RFLP	*EMX1*	TGGTGGATTTCGGACTACCCT（配列番号55）
EMX1-RFLP-R	RFLP	*EMX1*	TTCGGACTGGAACCGTCAGC（配列番号56）
VEGFA-RFLP-F	RFLP	*VEGFA*	AGACGTTCCTTAGTGCTGGC（配列番号57）
VEGFA-RFLP-R	RFLP	*VEGFA*	AAAAGTTTCAGTGCGACGCC（配列番号58）
DYNLT1 KI PCR-F	ジャンクションPCR	*DYNLT1*	AGGAGGTCCCATCAGATGCT（配列番号59）
HSP90AA1 KI PCR-F	ジャンクションPCR	*HSP90AA1*	GGCTGGACAGCAAACATGGA（配列番号60）
AAVS1 KI PCR-F	ジャンクションPCR	*AAVS1*	GATGCTCTTTCCGGAGCACT（配列番号61）
ジャンクションPCRユニバーサル-R	ジャンクションPCR	*mKate*	TTGCTGCCGTACATGAAGCTG（配列番号62）
EMX1-NGS-F	NGS	*EMX1*	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCAGAAGAAGGGCTCCCATCAC（配列番号63）

【表４－３】

EMX1-NGS-R	NGS	*EMX1*	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgAGCAG CAAGCAGCACTCTG (配列番号 64)
VEGFA-NGS-F	NGS	*VEGFA*	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCCAGCGT CTTCGAGAGTGAGG (配列番号 65)
VEGFA-NGS-R	NGS	*VEGFA*	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgTTGGA ATCCTGGAGTGACCC (配列番号 66)
EMX-OT1-F	オフターゲット	*EMX1 OT-1*	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCACAAAA GCTCCACATGCTAGGA (配列番号 67)
EMX-OT1-R	オフターゲット	*EMX1 OT-1*	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgGCTGA CTTTGGGCTCCTTCT (配列番号 68)
EMX-OT2-F	オフターゲット	*EMX1 OT-2*	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCACACAC TCCCCAGGATCTCA (配列番号 69)
EMX-OT2-R	オフターゲット	*EMX1 OT-2*	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgAATGT CAGCTGAAGCAGGCT (配列番号 70)
EMX-OT3-F	オフターゲット	*EMX1 OT-3*	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGGCTAC CCTGACAACTGCTT (配列番号 71)
EMX-OT3-R	オフターゲット	*EMX1 OT-3*	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgAGGAC AGACATGACAAGGCA (配列番号 72)
VEGFA-OT1-F	オフターゲット	*VEGFA OT-1*	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGCAGGC AAGCTGTCAAGGGT (配列番号 73)
VEGFA-OT1-R	オフターゲット	*VEGFA OT-1*	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCCCTC ACACCCACACCCTCA (配列番号 74)
VEGFA-OT2-F	オフターゲット	*VEGFA OT-2*	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGGAGG GGTGTCATCGTTCTG (配列番号75)
VEGFA-OT2-R	オフターゲット	*VEGFA OT-2*	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgCAAAT TGCGCCATAGCTGGG (配列番号 76)
VEGFA-OT3-F	オフターゲット	*VEGFA OT-3*	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCTGAGCG CTCTTCGTCTTTCC (配列番号 77)
VEGFA-OT3-R	オフターゲット	*VEGFA OT-3*	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATgGCCAG GAACACAGGAATGCTA (配列番号 78)
	ジャンクションPCR		TCCACCCCACAGTGGGGCAAGCTTCTGACC TCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCCT (配列番号 163)
	PCR		TTGACCTGCAGTCCAGCCTANGG (配列番号 164)
	PCR		CCACCGCAAATGCTTCTAGGNGG (配列番号 165

【０３２４】

ハイスループットシーケンシングデータ分析処理された（逆多重化、トリミングおよびマージ）シーケンシングリードを分析して、シーケンシングされたアンプリコンを参照および予想ＨＤＲアンプリコンに対して整列させることによって、ＣＲＩＳＰＲｅｓｓｏ２[5]を使用して編集結果を決定した。多様な編集結果をより良好に捕捉するために、予想される切断部位周囲の１０ｂｐまで定量ウィンドウを拡張させたが、シーケンシングエラーの包含を回避するために置換を無視した。予想されるアンプリコンとのミスマッチを含有しないリードのみをＨＤＲ定量のために検討し、予想されるアンプリコンと部分的に一致したインデルを含有するリードを、全般的な報告されたインデル頻度で含めた。

【０３２５】

統計分析　特に明記しない限り、全ての統計分析および比較はｔ検定を用いて、Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ、ＫｒｉｅｇｅｒおよびＹｅｋｕｔｉｅｌｉの２段階ステップアップ法（参照により本明細書中に組み込まれるＢｅｎｊａｍｉｎｉ，Ｙ．ら、Ｂｉｏｍｅｔｒｉｋａ９３，４９１－５０７（２００６））を用いて１％の偽発見率（ＦＤＲ）で行った。全ての実験は、特に明記しない限り、分析において十分な統計力を確保するために３連で実施した。

【０３２６】

予測されるＣａｓ９オフターゲット部位での編集の決定　既知のＣａｓ９オフターゲット部位でのＲｅｃＴ／ＲｅｃＥオフターゲット編集活性を評価するために、ノックイン分析のための同じゲノムＤＮＡ抽出物を、ＥＭＸ１、ＶＥＧＦＡガイドについての上位の予測されるオフターゲット部位（ウェブベースの分析ツールである予測ＣＲＩＳＰＯＲとし

て高スコア）のＰＣＲ増幅のための鋳型として使用し、プライマー配列を表４に列挙する。

【０３２７】

ｉＧＵＩＤＥオフターゲット分析　以前に発明されたＧｕｉｄｅ－ｓｅｑ（参照により本明細書中に組み込まれるＴｓａｉ，Ｓ．ら、Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　３３，１８７－１９７（２０１５））に基づいて、ｉＧＵＩＤＥパイプライン（参照により本明細書に組み込まれるＮｏｂｌｅｓ，Ｃ．Ｌ．ら、Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ　２０，１４（２０１９））に従ってゲノム全体の偏りのないオフターゲット分析を行った。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に対して、Ｌｏｎｚａ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　４－Ｄ上の２０μＬのＬｏｎｚａ　ＳＦ　Ｃｅｌｌ　Ｌｉｎｅ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎにおいて、製造業者の指示に従ってプログラムＤＳ－１５０で形質移入を行った。３００ｎｇのｇＲＮＡ－Ｃａｓ９プラスミド（または二重ニッカーゼについて１５０ｎｇの各ｇＲＮＡ　Ｃａｓ９ｎプラスミド）、１５０ｎｇのエフェクタープラスミドおよび５ｐｍｏｌの二本鎖オリゴヌクレオチド（ｄｓＯＤＮ）を形質移入した。Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ　ＤＮＡｄｖａｎｃｅ試薬キットを使用して、ゲノムＤＮＡのために７２時間後に細胞を回収した。次いで、４００ｎｇの精製ｇＤＮＡを平均５００ｂｐに断片化し、製造業者の指示に従ってＮＥＢＮｅｘｔ　Ｕｌｔｒａ　ＩＩ　ＦＳ　ＤＮＡ　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｐｒｅｐキットを使用してアダプターと連結した。オリゴタグからライゲーションされたアダプター配列までの２回のネステッドアンカー型ＰＣＲを実施して、標的ＤＮＡを増幅し、増幅されたライブラリを精製し、サイズ選択し、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｍｉｓｅｑ　Ｖ２　ＰＥ３００を使用して配列決定した。公開されたｉＧＵＩＤＥパイプラインを使用して、試料全体にわたって偏りのない比較を保証するダウンサンプリング段階を追加して、シーケンシングデータを分析した。

実施例２

【０３２８】

哺乳動物とは対照的に、細菌、例えばファージラムダＲｅｄおよびＲｅｃＥ／Ｔのための便利なリコンビニアリング編集ツールが利用可能である。微生物のリコンビニアリングは、２つの主要な段階を有する：鋳型ＤＮＡがエキソヌクレアーゼ（Ｅｘｏ）によってチューバックされ、次いで一本鎖アニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）が、必要に応じてヌクレアーゼ阻害剤によって促進される、鋳型による相同組換え修復を支援する。ＲｅｃＥ／Ｔリコンビニアリング活性のＲＮＡガイド標的化のための系を開発し、ＤＮＡ切断なしでキロ塩基（ｋｂ）ヒト遺伝子編集を達成した。

【０３２９】

リコンビニアリング活性を有する候補微生物系を調べた。２方向の推論が検索を誘導した：１）直交性：哺乳動物修復酵素との類似点を最小限にしてタンパク質に優先順位を付ける；２）節減：相互依存性が最小の構成成分を有する系に焦点を合わせる。３つのタンパク質ファミリー：ラムダレッド、ＲｅｃＥ／ＴおよびファージＴ７　ｇｐ６（Ｅｘｏ）およびｇｐ２．５（ＳＳＡＰ）組換え機構が同定された。系統発生学的再構築に基づいて、ＲｅｃＥ／Ｔタンパク質は、真核生物組換えタンパク質から最も離れており、最もコンパクトなものの１つであると判定された（図１）。したがって、下流分析にはＲｅｃＥ／Ｔ系を利用した。

【０３３０】

ＲｅｃＥ／Ｔ相同体についてＮＣＢＩタンパク質データベースを体系的に検索した。携帯型ツールを開発するために、進化的関係および長さを調べた（図２Ａ）。共起分析により、殆どのＲｅｃＥ／Ｔ系が２つのタンパク質のうちの１つのみを有することが明らかになった（図２Ｂ）。プロファージ組み込みは不正確であり得るので、両方の相同体を有する種の１１％をインタクトな機能性に対する証拠として優先した。

【０３３１】

上位１２の候補をコドン最適化し、ＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）融合物を構築して、ＭＳ２　ＲＮＡアプタマーを介してこれらのＲｅｃＥ／Ｔ相同体（以下、リコンビネ

ーター」と呼ぶ）を野生型Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９（ｗｔＣａｓ９）に動員した。ＥｘｏおよびＳＳＡＰとしてのそれらの個々の分子効果を理解するために、それぞれを独立して試験した（図２Ｃ）。最初の結果から、ゲノムノックインアッセイによって決定されるように、大腸菌のＲｅｃＥ／Ｔタンパク質（ＲｅｃＥおよびＲｅｃＴとして単純化）が有望な候補として明らかになった（図２Ｄ）。ＲｅｃＴが僅か２６９アミノ酸（ＡＡ）長である一方で、ＲｅｃＥは、機能研究（参照により本明細書中に組み込まれるＭｕｙｒｅｒｓ，Ｊ．Ｐ．，Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．（２０００）；１４，１９７１－１９８２）に基づいて、ＡＡ５８７（ＲｅｃＥ＿５８７）およびカルボキシ末端ドメイン（ＲｅｃＥ＿ＣＴＤ）から短縮化された。

【０３３２】

ヒト細胞におけるＲｅｃＥ／Ｔリコンビニアリングを検証するために、２つの鋳型を用いて５つのゲノム部位で相同組換え修復（ＨＤＲ）を測定した。ＲｅｃＥバリアント（ＲｅｃＥ＿５８７、ＲｅｃＥ＿ＣＴＤ）は、ノックイン効率の変動性の上昇を示したが、ＲｅｃＴは、全ての場合においてＨＤＲを有意に増強し、ＥＭＸ１およびＶＥＧＦＡの約１６ｂｐ配列を置換し、ＨＳＰ９０ＡＡ１、ＤＹＮＬＴ１、ＡＡＶＳ１の約１ｋｂカセットをノックインした（図３Ａ～Ｅ、図４）。イメージングを用いてこれらの結果を検証し（図３Ｆ）、正確な挿入を確認するためにサンガーシーケンシングを用いて接合部位を配列決定した（図３Ｇ）。これらの活性が真に配列特異的であるかどうかを試験するために、ＭＳ２アプタマーではなくＰＰ７アプタマーを認識するＰＰ７コートタンパク質（ＰＣＰ）を用いた非動員対照を使用した。ＲｅｃＥは動員なしで活性を有したが、一方でＲｅｃＴは動員に依存した方式で効率の上昇を示した（図３Ｈ）。理論により拘束されるものではないが、これは、無差別に作用するＲｅｃＥエキソヌクレアーゼ活性によって説明され得る（図２Ｃ）。ＲｅｃＥ／Ｔリコンビニアリング編集（ＲＥＤＩＴ）ツールはＲＥＤＩＴｖ１と呼ばれ、ＲＥＤＩＴｖ１＿ＲｅｃＴが好ましいバリアントである。

実施例３

【０３３３】

１）細胞型全体にわたる活性、２）ＨＤＲ鋳型の最適なデザインおよび３）特異性を調べるために、ＲＥＤＩＴｖ１に対する３つの試験を行った。ＲＥＤＩＴｖ１活性は、ＨＥＫ、Ａ５４９、ＨｅｐＧ２およびＨｅＬａ細胞において複数のゲノム部位にわたってロバストであった（図５Ａ～５Ｃ、図６Ａ～６Ｃ）。注目すべきことに、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）では、ＲＥＤＩＴｖ１は、ＨＳＰ９０ＡＡ１およびＯＣＴ４においてキロ塩基のノックイン効率の一貫した上昇を示し、Ｃａｓ９－ＨＤＲと比較して最大３．５倍の改善を示した（図５Ｄ～５Ｅ、図６Ｄ～６Ｅ）。異なる鋳型デザインも試験した。ＲＥＤＩＴｖ１は、合計２００ｂｐという短いＨＡ長を使用して効率的なキロ塩基編集を行い、より長いＨＡはより高い効率を支援した。これは、ｋｂスケールのノックインに対して最大１０％の効率（選択なし）、Ｃａｓ９－ＨＤＲに対する５倍の増加および１～２％の典型的な効率より有意に高い効率を達成した（図７）。最後に、予測されたオフターゲット部位（ＯＴＳ）およびＧＵＩＤＥ－ｓｅｑのディープシーケンシングを使用して、ＲＥＤＩＴｖ１精度の精度を決定した。ＲＥＤＩＴｖ１はオフターゲット効果を向上させなかったが、検出可能なＯＴＳがＥＭＸ１およびＶＥＧＦＡについて以前に報告された部位で残った（図５Ｆ～５Ｇ、図８）。簡潔に言えば、ＲＥＤＩＴｖ１は、キロ塩基スケールのゲノムリコンビニアリングを示したが、オフターゲットの問題を保持しており、ＲＥＤＩＴｖ１＿ＲｅｃＴが最も効率が高かった。

実施例４

【０３３４】

望ましくない編集を軽減するために、非切断Ｃａｓ９ニッカーゼ（Ｃａｓ９ｎ）を有するＲＥＤＩＴのバージョンを評価した。オフターゲット問題に対処するために同様の戦略が以前に採用されたが（参照により本明細書中に組み込まれるＲａｎ，Ｆ．Ａ．ら、Ｃｅｌｌ（２０１３），１５４：１３８０－１３８９）、ＨＤＲ効率は低かった。ＲＥＤＩＴを試験して、この系が内因性修復の制限を克服し、ニッキングが介在する組換えを促進し

得るかどうかを判定した。実際、ニッカーゼバージョンは、より高い効率を示し、単一ニッキングおよび二重ニッキングを有するＣａｓ９ｎ（Ｄ１０Ａ）から最良の結果が得られた。このＣａｓ９ｎ（Ｄ１０Ａ）バリアントをＲＥＤＩＴｖ２Ｎと命名した（図９Ａ）。選択なしの５％～１０％のノックインが、ＲＥＤＩＴｖ２Ｎの二重ニッキングを使用して観察されたが、これはｗｔＣａｓ９を使用したＲＥＤＩＴｖ１に匹敵する（図９Ａ、図１０Ａ）。接合部シーケンシングにより、全ての標的に対するノックインの精度が確認された（図１１）。この結果は、Ｃａｓ９ｎ－ＨＤＲよりも６～１０倍の改善を示した。単一ニッキングＲＥＤＩＴｖ２Ｎを用いても、１ｋｂノックインについて約２％の効率が観察され、通常の単一ニッキングＣａｓ９ｎおよびそれほど困難でない１２ｂｐノックイン鋳型を用いた以前の報告（参照により本明細書中に組み込まれるＣｏｎｇ，Ｌ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ．３３９，８１９－８２３）における０．４６％のＨＤＲ効率よりもかなり高いレベルであった（図９Ａ）。

【０３３５】

ＧＵＩＤＥ－ｓｅｑを使用してＲＥＤＩＴｖ２Ｎのオフターゲット活性を調べた。結果は、ＲＥＤＩＴｖ１と比較して、最小のオフターゲット切断およびＯＴＳの約９０％の減少を示した（図９Ｂ）。具体的には、ＤＹＮＬＴ１標的化ガイドについて、最も豊富なＫＩＦ６　ＯＴＳはＲＥＤＩＴｖ１群において有意に富化されたが、ＲＥＤＩＴｖ２Ｎを使用した場合には消失した（図９Ｃ）。ＲＥＤＩＴｖ２Ｎは非常に正確であった（図９Ｂ～９Ｃ、図１２）。

【０３３６】

ＨＤＲ編集の別の副産物は、オンターゲット挿入－欠失（インデル）である。それらは、特に長い配列に対して、遺伝子編集の収量を劇的に低下させ得る。ディープシーケンシングを使用するＥＭＸ１ノックイン実験においてインデル形成を測定した。ＲＥＤＩＴｖ２Ｎは、ｗｔＣａｓ９を使用してその対応物と同じ効率までＨＤＲを上昇させ（図１２Ｃ、上）、望ましくないオンターゲットインデルを９２％減少させた（図１２Ｃ、下）。

【０３３７】

ＧＵＩＤＥ－ｓｅｑ、ＬＡＭ－ＰＣＲおよびＴＬＡからの概念を使用して、ゲノムワイド挿入部位（ＧＩＳ）またはＧＩＳ－ｓｅｑ（図３０Ａ）を同定するためのＮＧＳに基づくアッセイを開発した。ＧＩＳ－ｓｅｑを使用して、ノックイン挿入部位を表すＮＧＳリードクラスター／ピークを得（図３０Ｂ）、オンターゲット部位からの代表的なリードを示した）。ＧＩＳ－ｓｅｑをＤＹＮＬＴ１およびＡＣＴＢ遺伝子座に適用して、ノックイン精度を測定した。シーケンシングの結果は、最尤推定に基づいて高い信頼性を有する部位を考慮すると、ＲＥＤＩＴは、Ｃａｓ９と比較して、同定されたオフターゲット挿入部位が少なかったことを示した（図３０Ｃ）。合わせて、ノックイン連結部のクローナルサンガーシーケンシング（図９Ｃおよび１２）、ＧＵＩＤＥ－ｓｅｑ分析（図９Ｂ）、およびＧＩＳ　ｓｅｑの結果（図３０Ａ～３０Ｃ）は、ＲＥＤＩＴが、不必要な編集事象が少ないキロ塩基長の配列を挿入する能力を有する効率的な方法であり得ることを示した。

実施例５

【０３３８】

標的ＤＮＡの任意のニッキング／切断が全くない場合の長い配列編集能力について、ＲＥＤＩＴを調べた。注目すべきことに、触媒的に不活性であるＣａｓ９（ｄＣａｓ９）を使用してＲＥＤＩＴｖ２Ｄを構築した場合、キロ塩基カセットの正確なゲノムノックインがヒト細胞において観察された（図９Ｄ、上、図１３）。ＲＥＤＩＴｖ２ＤはＲＥＤＩＴｖ２Ｎよりも効率が低い一方で、これは、１～２％の効率および選択なしでキロ塩基スケールでプログラム可能なＤＮＡ損傷のない編集を達成した（図９Ｄ、図１０Ｂ）。２つのプロセスがＲＥＤＩＴｖ２Ｄリコンビニアリングに寄与しているものであり得ると仮定された。１つの可能性は、ｄＣａｓ９巻き戻しによるものであった。ｄＣａｓ９がループの配列特異的形成を誘導するので、ｄＣａｓ９がＤＮＡを巻き戻し得る場合、２つのｄＣａｓ９との二重の結合は、ＲｅｃＥ／Ｔに対するゲノム接近可能性を促進すると予想される。しかし、２つのガイドＲＮＡを送達したときの有意な増加は観察されなかった（図９Ｄ

、下）。別の可能性は、細胞周期中のＤＮＡの巻き戻しにより、ＲｅｃＥ／Ｔが、ｄＣａｓ９結合が媒介する標的領域に接近することが可能になったことであった。異なるＲＥＤＩＴツールを用いて、様々な血清レベル（定型は１０％、低レベルは２％、および、血清なし）で１ｋｂノックインを行った。血清飢餓が細胞増殖を抑止するので、結果は、細胞周期がＲＥＤＩＴｖ２Ｄリコンビニアリングと正に相関したことを示した（図９Ｅ）。無血清処置の際、ＨＤＲ効率はＲＥＤＩＴｖ２Ｄ（ｄＣａｓ９）群において低下しただけであったが、一方でＲＥＤＩＴｖ１（ｗｔＣａｓ９）およびＲＥＤＩＴｖ２Ｎ（Ｄ１０Ａ）は影響を受けず（図９Ｅ、図１４）、これは、ＤＮＡ巻き戻しによってＲｅｃＥ／Ｔが標的領域に接近することが可能になったことを裏付ける。

実施例６

【０３３９】

顕微鏡法による分析により、ＲＥＤＩＴｖ１、特にＲＥＤＩＴｖ１＿ＲｅｃＴの不完全な核標的化が明らかになった（図１５）。したがって、タンパク質リンカーおよび核局在化シグナル（ＮＬＳ）の異なるデザインを試験した（図１５Ａ）。Ｃ末端ＳＶ４０－ＮＬＳを有する伸長したＸＴＥＮ－リンカーは、ＲＥＤＩＴｖ３と呼ばれる好ましい構成として同定された（図１６）。ＲＥＤＩＴｖ３は、ゲノム標的およびＣａｓ９バリアント（ｗｔＣａｓ９、Ｃａｓ９ｎ、ｄＣａｓ９）にわたって、ＲＥＤＩＴｖ２よりもＨＤＲ効率の２～３倍の増加をさらに達成した（図１７）。

【０３４０】

最後に、ヒト幹細胞においてキロ塩基のノックイン対立遺伝子を操作するために、ｈＥＳＣにおいてＲＥＤＩＴｖ３を利用した。ＲＥＤＩＴｖ３Ｎ単一二ッキングデザインおよび二重ニッキングデザインの結果、それぞれ、非リコンビネーター対照よりもＨＤＲ効率が５倍および２０倍上昇した（図９Ｆ）。有効性および忠実度は、以前のＲＥＤＩＴバージョンについて記載されたアッセイの組み合わせを介して確認された（図９Ｆ～Ｇ、図１８）。さらに、ＲＥＤＩＴｖ３は、インビボ送達に適したコンパクトなＣＲＩＳＰＲ系であるＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９（ＳａＣａｓ９）と効果的に働く（図１９）。

実施例７

【０３４１】

ＲｅｃＴおよびＲｅｃＥ＿５８７バリアントをさらに調べるために、それぞれ図２０Ａおよび図２１Ａに示されるように、ＲｅｃＴおよびＲｅｃＥ＿５８７の両方を様々な長さで短縮した。得られた効率は、ＤＹＮＬＴ１遺伝子座における単一および二重ニッキングとともに野生型ＳｐＣａｓ９およびＣａｓ９ｎ（Ｄ１０Ａ）の両方を用いて、ｍＫａｔｅノックインアッセイを使用して測定した（それぞれ図２０Ｂ～２０Ｃおよび図２１Ｂ～２１Ｃ）。組換えなし群の効率を対照として示す。

【０３４２】

ＲｅｃＴおよびＲｅｃＥ＿５８７の両方の短縮型は、異なるＣａｓ９とともに使用した場合、有意なリコンビニアリング活性を保持した。特に、完全長ＲｅｃＴ（１～２６９ａａ）と比較して、ＲｅｃＴ（９３～２６４ａａ）などの新しい短縮型は３０％超小さいが、これらは真核細胞における組換えの刺激においてＲｅｃＴの完全な活性を本質的に保存した。同様に、完全長ＲｅｃＥ（１～２８０ａａ）と比較して、ＲｅｃＥ＿５８７（１２０～２２１ａａ）およびＲｅｃＥ＿５８７（１２０～２０９ａａ）などの短縮型は、６０％超小さいが、ヒト細胞において依然として高い組換え活性を保持していた。これらの短縮型は、ＲｅｃＥおよびＲｅｃＴタンパク質バリアントを使用して最小機能性リコンビニアリング酵素をさらに操作する潜在性を実証したが、それらの小さいサイズを考慮すると、インビトロ、エクスビボおよびインビボ送達に理想的であるヒトゲノム編集のための貴重なコンパクトな組換えツールも提供する。

【０３４３】

全体として、ＲＥＤＩＴは、ＲｅｃＥ／ＲｅｃＴリコンビニアリングの効率とともにＣＲＩＳＰＲゲノム標的化の特異性を利用した。開示された高効率で低エラーの系は、既存

のＣＲＩＳＰＲツールキットに強力な追加をなす。ＲＥＤＩＴｖ３Ｎのバランスのとれた効率および精度により、ＲＥＤＩＴｖ３Ｎは、免疫細胞および幹細胞における大きなカセットのノックインにとって魅力的な治療選択肢となる。

実施例８

【０３４４】

酵母およびヒト由来の真核生物組換え酵素による再構築されたＲｅｃＥおよびＲｅｃＴ系統樹（図１Ａおよび１Ｂ）は、配列相同性に基づいてタンパク質の進化的距離を示す。点線のボックスは、全長の大腸菌ＲｅｃＢおよび大腸菌ＲｅｃＥタンパク質を示す。大腸菌ＲｅｃＢおよび大腸菌ＲｅｃＥタンパク質の触媒コアドメイン（実線ボックス）を比較のために使用した。ＭＳ２－ＭＣＰ動員系を使用してこれらの組換えタンパク質ファミリーの遺伝子編集活性を測定した。ここでは、ＭＳ２ステムループを有するｓｇＲＮＡを、ペプチドリンカーを介してＭＣＰタンパク質に融合させたリコンビニアリングタンパク質と共におよび核局在化シグナルと共に使用する。

【０３４５】

３つのエキソヌクレアーゼタンパク質を使用した：ファージラムダ由来のエキソヌクレアーゼ、大腸菌ＲｅｃＥタンパク質のＲｅｃＥ　５８７コアドメイン、およびファージＴ７由来のエキソヌクレアーゼ（遺伝子名ｇｐ６）（図２２Ａ）。ゲノム遺伝子座（ＤＹＮＬＴ１およびＨＳＰ９０ＡＡ１）でのｍＫａｔｅノックインアッセイを使用して、遺伝子編集活性を測定した。

【０３４６】

エキソヌクレアーゼと同じ３種の微生物由来の３つの一本鎖ＤＮＡアニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）、すなわちファージラムダ由来のＢｅｔタンパク質、大腸菌由来のＲｅｃＴタンパク質、およびファージＴ７由来のＳＳＡＰ（遺伝子名ｇｐ２．５）のゲノム編集効率を試験して、同様の測定を行った（図２２Ｂ）。

【０３４７】

これらの結果から、真核細胞において、ファージ／微生物組換え系の３つの主要ファミリー全てのゲノムリコンビニアリング活性を体系的に測定し、検証した（ラムダファージエキソヌクレアーゼおよびベータタンパク質；大腸菌プロファージのＲｅｃＥおよびＲｅｃＴタンパク質、Ｔ７ファージエキソヌクレアーゼｇｐ６および一本鎖結合ｇｐ２．５タンパク質）。３つの系からの６つ全てのタンパク質は、２つのゲノム遺伝子座にわたって哺乳動物ゲノムにキロ塩基長の配列をノックインするための効率的な遺伝子編集を達成した。全体として、エキソヌクレアーゼは、非リコンビネーター対照と比較した場合、約３倍高い組換え効率（最大４％のｍＫａｔｅゲノムノックイン）を示した。一本鎖アニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）は、より高い活性を示し、対照群よりも４倍～８倍高い遺伝子編集活性を示した。これは、エキソヌクレアーゼおよびＳＳＡＰファミリーにおける微生物組換えタンパク質が、哺乳動物細胞において非常に効率的なゲノム組換えを達成するためにＣａｓ９に基づく融合タンパク質系を介して操作され得るという一般的な適用性および妥当性を明らかにした。

実施例９

【０３４８】

ＲＥＤＩＴタンパク質デザインの一般化可能性を実証するために、代替の動員系を開発し、試験した。よりコンパクトなＲＥＤＩＴ系のために、ＲＥＤＩＴリコンビネーターパク質をＮ２２ペプチドに融合させ、同時に、ｓｇＲＮＡは、Ｎ２２ペプチドの短い認識配列であるｂｏｘＢを含み、ｓｇＲＮＡ内のＭＣＰを置き換えた（図２３Ａ）。このｂｏｘＢ－Ｎ２２系は、ＭＳ２－ＭＣＰ動員系を並べて比較して、図２３Ｂ～２３Ｅに示されるように、試験した２つのゲノム部位で同等の編集効率を示した。

【０３４９】

タンパク質に基づく動員系であるＳｕｎＴａｇ動員を使用するＲＥＤＩＴ系が開発された（図２４Ａおよび２７Ａ）。ＳｕｎＴａｇは融合タンパク質デザインに基づくので、ｓｇＲＮＡまたはガイドＲＮＡは野生型ＣＲＩＳＰＲ系と同じである。具体的には、ＲＥＤ

ＩＴリコンビネーター）タンパク質をｓｃＦＶ抗体ペプチドに融合させ（ＭＣＰを置き換える）、ＧＣＮ４ペプチドをタンデムに（リンカーによって分離された１０コピーのＧＣＮ４ペプチド）Ｃａｓ９タンパク質に融合させた。したがって、ｓｃＦＶ－ＲＥＤＩＴは、ｓｃＦＶに対するＧＣＮ４の親和性を介してＣａｓ９複合体に動員され得る。

【０３５０】

ｍＫａｔｅノックイン実験（図２４Ｂおよび２７Ｂ）を使用して、それぞれＤＹＮＬＴ１遺伝子座およびＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座における編集効率を測定した。このＳｕｎＴａｇに基づくＲＥＤＩＴ系は、試験したＤＹＮＬＴ１ゲノム部位において遺伝子編集ノックイン効率の有意な上昇を示した。さらに、ＳｕｎＴａｇデザインは、ＨＲＤ効率をＣａｓ９よりも約２倍良好に有意に上昇させたが、ＭＳ２アプタマーほど高い上昇を達成しなかった。

実施例１０

【０３５１】

ＲＥＤＩＴタンパク質デザインの一般化可能性を実証し、様々なＣＲＩＳＰＲ酵素に適用可能な多目的なＲＥＤＩＴ系を開発するために、ＳｕｎＴａｇ動員デザインを使用するＣｐｆ１／Ｃａｓ１２ａに基づくＲＥＤＩＴ系が開発された（図２５Ａ）。２つの異なるＣｐｆ１／Ｃａｓ１２ａタンパク質を、以前に示されたように、ｍＫａｔｅノックインアッセイを使用して試験した（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ細菌　ＮＤ２００６、ＬｂＣｐｆ１およびＡｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．ＢＶ３Ｌ６）（図２５Ｂ）。

【０３５２】

これらの結果から、真核細胞においてゲノム編集を行うためにＳｕｎＴａｇ動員系などの代替デザインを使用して、組換えタンパク質（エキソヌクレアーゼおよび一本鎖アニーリングタンパク質）が操作され得ることが示された。これらのタンパク質に基づく動員系は、ＲＮＡアプタマーまたはＲＮＡ結合タンパク質の使用を必要とせず、代わりに、それらは、ＲＥＤＩＴタンパク質を動員するためにＣＲＩＳＰＲ酵素に直接接続する融合タンパク質ドメインを利用した。

【０３５３】

動員系デザインにおける柔軟性に加えて、Ｃｐｆ１／Ｃａｓ１２ａ型ＣＲＩＳＰＲ酵素を使用したこれらの結果からまた、ゲノム組換えのための様々なＣＲＩＳＰＲ系に対するＲＥＤＩＴタンパク質の一般的な適合性も実証された。Ｃｐｆ１／Ｃａｓ１２ａ酵素は、Ｃａｓ９酵素とは異なる触媒残基およびＤＮＡ認識機序を有する。それ故に、ＲＥＤＩＴ組換えタンパク質（エキソヌクレアーゼおよび一本鎖アニーリングタンパク質）は、ＣＲＩＳＰＲ酵素構成成分（Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１／Ｃａｓ１２ａなど）の特定の選択とは無関係に機能し得る。これにより、ＲＥＤＩＴ系の一般化可能性が証明され、真核細胞において正確なゲノム編集を達成するためのＲＥＤＩＴ系の構成成分としてさらなるＣＲＩＳＰＲ酵素（既知および未知）を使用する可能性が開かれる。

実施例１１

【０３５４】

微生物界全体にわたる様々なＲｅｃＥおよびＲｅｃＴタンパク質のスクリーニングのために、ＲｅｃＥ／ＲｅｃＴタンパク質を有する１５種類の異なる種の微生物を選択した（表５）。各タンパク質をコドン最適化し、合成した。大腸菌のＲｅｃＥ／ＲｅｃＴに基づくＲＥＤＩＴ系について前述したように、Ｅ－ＸＴＥＮリンカーを介して各タンパク質をさらなる核局在化シグナルと共にＭＣＰタンパク質に融合させた。ｍＫａｔｅノックイン遺伝子編集アッセイを使用して、ＤＹＮＬＴ１遺伝子座（図２６Ａ、表６）およびＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座（図２６Ｂ、表６）における効率を測定した。相同体は、高精度の遺伝子編集を可能にし、促進する能力を明らかにした。

【表５－１】

表 5. RecE および RecT タンパク質相同体		
相同体	起源	タンパク質
T1	Pantoea stewartii	RecT
E1	Pantoea stewartii	RecE
T2	Pantoea brenneri	RecT
E2	Pantoea brenneri	RecE
T3	Pantoea dispersa	RecT
E3	Pantoea dispersa	RecE
T4	Plautia stali のF型共生生物	RecT
E4	Plautia stali のF型共生生物	RecE
T5	Providencia stuartii	RecT
E5	Providencia stuartii	RecE
T6	Providencia sp. MGF014	RecT
E6	Providencia sp. MGF014	RecE
T7	Providencia alcalifaciens DSM 30120	RecT
E7	Providencia alcalifaciens DSM 30120	RecE
T8	Shewanella putrefaciens	RecT
E8	Shewanella putrefaciens	RecE
T9	Bacillus sp. MUM 116	RecT
E9	Bacillus sp. MUM 116	RecE
T10	Shigella sonnei	RecT
E10	Shigella sonnei	RecE
T11	Salmonella enterica	RecT
E11	Salmonella enterica	RecE
T12	Acetobacter	RecT
E12	Acetobacter	RecE
T13	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Javiana str. 10721	RecT

【表５－２】

E13	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Javiana str. 10721	RecE
T14	Pseudobacteriovorax antillogorgiicola	RecT
E14	Pseudobacteriovorax antillogorgiicola	RecE
T15	Photobacterium sp. JCM 19050	RecT
E15	Photobacterium sp. JCM 19050	RecE

【表６－１】

表6. mKate ノックイン遺伝子編集効率				
	DYNLT1		HSP90AA1	
	平均 mKate+ (%)	SEM	平均 mKate+ (%)	SEM
NC	1.2100	0.0802	1.7333	0.1245
NR	2.0500	0.1442	4.0100	0.2166
EcRecE_587	5.1767	0.0897	3.7067	0.1784
EcRecT	9.9467	1.0143	6.5467	0.4646
相同体_T1	11.7333	0.4667	8.0733	0.8752
相同体_E1	5.7333	0.8503	7.6567	0.4556
相同体_T2	12.0000	0.5292	6.9233	0.4594
相同体_E2	7.4533	0.8553	6.4867	0.4359
相同体_T3	11.9000	1.3013	7.1200	0.2730
相同体_E3	2.0533	0.1020	6.7467	0.1565
相同体_T4	10.4433	0.7331	5.7567	0.8704
相同体_E4	5.7200	0.4744	6.2567	0.3339
相同体_T5	10.8267	0.9445	6.4300	0.3262
相同体_E5	4.4667	0.7116	6.0233	0.4366
相同体_T6	9.0533	0.3548	6.2500	0.4100
相同体_E6	5.4100	0.5981	5.9300	0.4708
相同体_T7	5.6467	0.7383	5.3700	0.4795
相同体_E7	4.4733	0.2444	5.7367	0.2105
相同体_T8	5.0400	0.5599	5.7133	0.4886
相同体_E8	4.6567	0.3088	7.0533	0.4388
相同体_T9	8.1300	0.3523	6.2000	0.2511
相同体_E9	5.3233	0.5233	5.6900	0.4903
相同体_T10	8.5333	0.1601	5.5900	0.2237
相同体_E10	4.4000	1.0149	3.5900	0.1442
相同体_T11	9.8467	1.4374	4.9233	0.4074
相同体_E11	7.0567	1.5872	3.1167	0.2010
相同体_T12	8.5900	0.5401	5.2733	0.2935
相同体_E12	5.2633	0.3374	6.0800	0.5164

【表６－２】

相同体_T13	9.9567	0.3324	5.7200	0.4267
相同体_E13	5.6333	0.2360	5.6900	0.3729
相同体_T14	6.7700	0.7022	4.7200	0.3612
相同体_E14	6.0167	0.4890	5.7100	0.1793
相同体_T15	7.8033	0.7075	5.2333	0.2302
相同体_E15	5.0700	0.5543	6.0500	0.5696

実施例１２

【０３５５】

次に、ＲｅｃＴに基づくＲＥＤＩＴデザインを評価するために、それを既存のＨＤＲ増強ツールの３つのカテゴリー（図２８Ａおよび２８Ｂ）：Ｃａｓ９とのＤＮＡ修復酵素Ｃ

ｔＩＰ融合物（Ｃａｓ９－ＨＥ）、ヒトジェミニンタンパク質の機能ドメイン（アミノ酸１から１１０）とＣａｓ９との融合物（Ｃａｓ９－Ｇｅｍ）、および細胞周期制御を介したＨＤＲの小分子エンハンサー、ノコダゾールと比較した。試験した内因性標的にわたって、ＲｅｃＴに基づくＲＥＤＩＴデザインは、３つの代替のストラテジーと比較して良好な性能を有していた（図３Ｃ）。さらに、ＲｅｃＴに基づくＲＥＤＩＴデザインは、他のアプローチとは独立して推定して活性を通じて作用し、既存の方法と相乗作用し得る。この仮説を試験するために、ＲｅｃＴに基づくＲＥＤＩＴデザインを（好都合にＭＳ２－アプタマーを通じて）３つの異なるアプローチと組み合わせた（図２８Ａ、右）。実際に、ＲｅｃＴに基づくＲＥＤＩＴデザインは、試験されたツールのＨＤＲ促進活性をさらに増強し得る（図２８Ｃ）。

実施例１３

【０３５６】

各側で少なくとも１００ｂｐのＨＡを有する基準のＨＤＲドナーを使用した場合の、ＲＥＤＩＴの編集効率に対する鋳型ＨＡの長さの影響を定量した（図２９Ａ、左）。より高いＨＤＲ率が、ＨＡ長の伸長に伴ってＣａｓ９群およびＲｅｃＴ群の両方に対して観察され、ＲＥＤＩＴは、各側約１００ｂｐという短いＨＡ長を使用してＣａｓ９よりもＨＤＲを効果的に刺激した。６００～８００ｂｐの総ＨＡを有するより長い鋳型を供給した場合、ＲｅｃＴは、選択なしのｋｂスケールのノックインに対して１０％を超えるＨＤＲ効率を達成し、Ｃａｓ９のみを使用した場合の２～３％の効率より有意に高かった。最近の報告では、より短いＨＡ（通常１０～５０ｂｐ）を有するドナーＤＮＡを使用すると、マイクロホモロジー媒介末端連結（ＭＭＥＪ）経路からの高い修復活性のおかげで、ノックイン効率を有意に刺激し得ることが同定された。０ｂｐ（ＮＨＥＪに基づく）、１０ｂｐまたは５０ｂｐ（ＭＭＥＪに基づく）のＨＡを有するドナーＤＮＡを使用して、ＲＥＤＩＴに基づく方法のノックイン効率をＣａｓ９と比較した。結果から、ＭＭＥＪ機序を活用する短ＨＡドナーが、ＨＤＲドナーと比較してより高い編集効率をもたらしたことが明らかになった（図２９Ａ、右）。同時に、ＲＥＤＩＴは、ＨＡが存在する限り、ノックイン効率を増強することが可能であった（０ｂｐ　ＮＨＥＪドナーに対する効果なし）。この効果は、有意な効果があった１０ｂｐドナーで特に有意であり、ＨＤＲドナーとのさらなる特性評価および比較のために選択された。

【０３５７】

ノックイン細胞をクローン単離し、コロニーサンガーシーケンシングのためにドナーＤＮＡの完全に外側に結合するプライマーを使用して、標的ゲノム領域を増幅させた（図２９Ｂ。接合部シーケンシング分析（条件ごとに遺伝子あたり約４８個のコロニー）により、単一または両方の接合部を含む５’－および３’－ノックイン接合部で様々な程度のインデルが明らかになった（図２９Ｃ）。全体として、ＨＤＲドナーはＭＭＥＪドナーよりも良好な精度を有し、ＲＥＤＩＴはＣａｓ９と比較してノックイン収量を僅かに改善したが、接合部インデルが依然として観察された。

【０３５８】

さらに、異なる長さの編集を行った場合のＲＥＤＩＴおよびＣａｓ９の効率を比較した。より長い編集のために、２ｋｂノックインカセットを使用し（図２９Ｄ）、より短い編集のために、一本鎖オリゴドナー（ｓｓＯＤＮ）を使用した。二重ｍＫａｔｅ／ＧＦＰ鋳型を使用してノックイン配列長を約２ｋｂに伸長させた場合、ＲＥＤＩＴは、試験した内因性標的にわたってＣａｓ９と比較してそのＨＤＲ促進活性を維持した（図２９Ｄ）。ｓｓＯＤＮ試験のために、２つの十分に確立された遺伝子座ＥＭＸ１およびＶＥＧＦＡにおいて、ＲＥＤＩＴおよびＣａｓ９を使用して、１２～１６ｂｐの外因性配列を導入した。ｓｓＯＤＮ鋳型は短い（各側で＜１００　ｂｐのＨＡ）ので、次世代シーケンシング（ＮＧＳ）を使用して編集事象を定量した。Ｃａｓ９とＲＥＤＩＴとの間で同程度のレベルのインデルが観察され、ＲＥＤＩＴを使用してＨＤＲ効率が改善された。

実施例１４

【０３５９】

ＲＡＤ５１、Ｂ０２およびＲＩ－１の２つの異なる薬理学的阻害剤の存在下または非存在下でＨＤＲを促進するＲＥＤＩＴの能力の感度（図３１Ａ）。予想通り、Ｃａｓ９に基づく編集に対して、ＲＡＤ５１阻害はＨＤＲ効率を有意に低下させた（図３１Ｂ、３１Ｃおよび３２Ａ）。興味深いことに、ＲＥＤＩＴ／ＲＥＤＩＴｄｎ法の両方がＲＡＤ５１阻害下でＣａｓ９／Ｃａｓ９ｄｎと比較して、有意により高いノックイン効率を維持したので、ＲＡＤ５１阻害はＲＥＤＩＴおよびＲＥＤＩＴｄｎ効率を中程度にしか低下させなかった。

【０３６０】

ＭＲＮ複合体形成、ＭＲＮ依存性ＡＴＭ活性化を防止し、Ｍｒｅ１１エキソヌクレアーゼ活性を阻害することも示されている、ＤＳＢ修復の強力な化学的阻害剤であるミリンも使用した。ムリニング（Ｍｒｉｎｉｎｇ）で細胞を処置する場合、Ｃａｓ９参照実験の編集効率のみがミリング（Ｍｉｒｉｎｇ）処置によって影響を受け、一方でＲＥＤＩＴバージョンは、全てのゲノム標的にわたってビヒクル処置群と本質的に同じであった（図３２Ａ）。

【０３６１】

細胞周期阻害が組換えに影響を及ぼすかどうかを試験するために、二重チミジン遮断（ＤＴＢ）を使用して細胞をＧ１／Ｓ境界で化学的に同期させた。ＲＩ－１またはＢ０２をミリングすることをＤＴＢ処置と組み合わせた場合、Ｃａｓ９参照実験と比較して、ＲＥＤＩＴバージョンは、ＤＮＡ修復経路阻害下ではより高い編集効率を維持したが、ＤＴＢ処置下では編集効率が低下した（図３２Ｂ）。

【０３６２】

様々な状況でＲＥＤＩＴを検証するために、ＲＥＤＩＴをヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）に適用して、非形質転換ヒト細胞において長い配列を操作する能力を試験した。ＲＥＤＩＴおよびＲＥＤＩＴｄｎを使用して、３つ全てのゲノム部位（ＨＳＰ９０ＡＡ１、ＡＣＴＢ、ＯＣＴ４／ＰＯＵ５Ｆ１）にわたって、ＨＤＲのロバストな刺激が観察された（図３１Ｄおよび３１Ｅ）。注目すべきことに、ＲＥＤＩＴおよびＲＥＤＩＴｄｎ編集は、各側に２００ｂｐのＨＡを有するドナーＤＮＡを使用し、非ＲＥＤＩＴ法を使用した約１％の効率と比較して、選択なしでｋｂスケールの遺伝子編集に対して最大５％を超える効率を達成した。さらに、ＲＥＤＩＴは、Ａ５４９（肺由来）、ＨｅｐＧ２（肝臓由来）およびＨｅＬａ（子宮頸部由来）細胞におけるノックイン効率を改善し、選択なしで最大約１５％ｋｂスケールのゲノムノックインを実証した。この改善は、Ｃａｓ９群よりも最大４倍高く、異なる細胞型においてＲＥＤＩＴ法を使用する可能性を裏付ける。

実施例１５

【０３６３】

流体力学的尾静脈注射を介して切断フリーｄＣａｓ９編集を使用して、ｄＣａｓ９－ＥｃＲｅｃＴ（ＳＡＦＥ－ｄＣａｓ９）のインビボでの使用を試験した。使用した遺伝子編集ベクターおよび鋳型ＤＮＡを図３３Ａに示す。流体力学的尾静脈注射を介して遺伝子編集ベクター（６０μｇ）および鋳型ＤＮＡ（６０μｇ）を注射して、構成成分をマウスに送達した。アルブミン遺伝子座からの導入遺伝子によりコードされるタンパク質の発現によって、肝臓肝細胞の遺伝子編集の成功を監視した。実験手順の概略を図３３Ｂに示す。

【０３６４】

注射のおよそ７日後、灌流したマウスの肝臓を摘出した。肝葉をホモジナイズし、初代肝細胞から肝臓ゲノムＤＮＡを抽出するために処理した。抽出されたゲノムＤＮＡを３つの異なる下流分析に使用した：１）ノックイン特異的プライマーおよびアガロースゲル電気泳動を使用したＰＣＲ（図３４Ａ）；２）ノックインＰＣＲ産物のサンガーシーケンシング（図３４Ｂ）；３）インビボでＳＡＦＥ－ｄＣａｓ９を使用して遺伝子編集の精度を確認し、定量するためのノックイン接合部のハイスループットディープシーケンシング（図３４Ｃ）。各下流分析により、ノックインの成功が確認された。

【０３６５】

さらに、ＬＴＣマウス肺へのアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）送達を使用して、インビボ

での使用を試験した。ＬＴＣマウスは、３つのゲノム対立遺伝子を含む：１）Ｌｋｂ１（ｆｌｏｘ／ｆｌｏｘ）対立遺伝子は、Ｃｒｅを発現する場合、Ｌｋｂ１－ＫＯを可能にする；２）Ｒ２６（ＬＳＬ－ＴｄＴｏｍ）対立遺伝子は、ＴｄＴｏｍ赤色蛍光タンパク質を介したＡＡＶ形質導入細胞の検出を可能にする；および３）Ｈ１１（ＬＳＬ－Ｃａｓ９）対立遺伝子は、ＡＡＶ形質導入細胞におけるＣａｓ９の発現を可能にする。ＲＥＤＩ遺伝子編集ベクターおよびＣａｓ９対照ベクターの概略図を図３５Ａに示す。図３５Ｂに示されるように、遺伝子編集ベクターを用いた遺伝子編集の成功は、処置を受けたマウスの肺において腫瘍成長を推進するＫｒａｓ対立遺伝子をもたらす。

【０３６６】

ＡＡＶ注射のおよそ１４週間後、灌流したマウス肺を摘出した。固定肺組織をイメージング解析のために使用して、成功した遺伝子編集から腫瘍形成を同定した（図３５Ｃ）。イメージング解析を介した表面腫瘍数の定量から、ＲＥＤＩＴ処置マウスにおける遺伝子編集効率の上昇および腫瘍の総数の増加が示された（図３５Ｃ）。

Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＲｅｃＥアミノ酸配列（配列番号１）：

【化１】

MSTKPLFLLRKAKKSSGEPDVVLWASNDFESTCATLDYLIVKSGKKLSSYFKAVATNFP
VVNDLPAEGEIDFTWSERYQLSKDSMTWELKPGAAPDNAHYQGNTNVNGEDMTEIEEN
MLLPISGQELPIRWLAQHGSEKPVTHVSRDGLQALHIARAEELPAVTALAVSHKTSLLDP
LEIRELHKLVRDTDKVFPNPGNSNLGLITAFFEAYLNADYTDRGLLTKEWMKGNRVSHI
TRTASGANAGGGNLTDRGEGFVHDLTSLARDVATGVLARSMDLDIYNLHPAHAKRIEEI
IAENKPPFSVFRDKFITMPGGLDYSRAIVVASVKEAPIGIEVIPAHVTEYLNKVLTETDHA
NPDPEIVDIACGRSSAPMPQRVTEEGKQDDEEKPQPSGTTAVEQGEAETMEPDATEHHQ
DTQPLDAQSQVNSVDAKYQELRAELHEARKNIPSKNPVDDDKLLAASRGEFVDGISDPN
DPKWVKGIQTRDCVYQNQPETEKTSPDMNQPEPVVQQEPEIACNACGQTGGDNCPDCG
AVMGDATYQETFDEESQVEAKENDPEEMEGAEHPHNENAGSDPHRDCSDETGEVADP
VIVEDIEPGIYYGISNENYHAGPGISKSQLDDIADTPALYLWRKNAPVDTTKTKTLDLGT
AFHCRVLEPEEFSNRFIVAPEFNRRTNAGKEEEKAFLMECASTGKTVITAEEGRKIELMY
QSVMALPLGQWLVESAGHAESSIYWEDPETGILCRCRPDKIIPEFHWIMDVKTTADIQRF
KTAYYDYRYHVQDAFYSDGYEAQFGVQPTFVFLVASTTIECGRYPVEIFMMGEEAKLA
GQQEYHRNLRTLADCLNTDEWPA IKTLSLPRWAKEYAND

Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＲｅｃＥ＿５８７アミノ酸配列（配列番号２）：

【化２】

ADPVIVEDIEPGIYYGISNENYHAGPGVSKSQLDDIADTPALYLWRKNAPVDTTKTKTLD
LGTAFHCRVLEPEEFSNRFIVAPEFNRRTNSGKEEEKAFLRECASTGKTVITAEEGRKIEL
MYQSVMALPLGQWLVESAGHAESSIYWEDPETAILCRCRPDKIIPEFHWIMDVKTTADI
QRFKTAYYDYRYHVQDAFYSDGYEAQFGVQPTFVFLVASTTIECGRYPVEIFMMGEEA
KLAGQLEYHRNLRTLADCLNTDEWPAIKTLSLPRWAKEYAND*

Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＣＴＤ＿ＲｅｃＥアミノ酸配列（配列番号３）：

【化３】

GISNENYHAGPGVSKSQLDDIADTPALYLWRKNAPVDTTKTKTLDLGTAFHCRVLEPEE
FSNRFIVAPEFNRRTNSGKEEEKAFLRECASTGKTVITAEEGRKIELMYQSVMALPLGQW
LVESAGHAESSIYWEDPETAILCRCRPDKIIPEFHWIMDVKTTADIQRFKTAYYDYRYHV
QDAFYSDGYEAQFGVQPTFVFLVASTTIECGRYPVEIFMMGEEAKLAGQLEYHRNLRTL
ADCLNTDEWPAIKTLSLPRWAKEYAND*

Ｐａｎｔｏｅａ　ｂｒｅｎｎｅｒｉ　ＲｅｃＥアミノ酸配列（配列番号４）：

【化４】
MQPGIYYDISNEDYHRGAGISKSQLDDIAISPAIYQWRKHAPVDEEKTAALDLGTALHCL
LLEPDEFSKRFQIGPEVNRRTTAGKEKEKEFIERCEAEGITPITHDDNRKLKLMRDSALAH
PIARWMLEAQGNAEASIYWNDRDAGVLSRCRPDKIITEFNWCVDVKSTADIMKFQKDF
YSYRYHVQDAFYSDGYESHFHETPTFAFLAVSTSIDCGRYPVQVFIMDQQAKDAGRAE
YKRNIHTFAECLSRNEWPGIATLSLPFWAKELRNE

Ｐｌａｕｔｉａ ｓｔａｌｉのＦ型共生体ＲｅｃＥアミノ酸配列（配列番号５）：
【化５】
MQPGIYYDISNEDYHGGPGISKSQLDDIAISPAIYQWRKHAPVDEEKTAALDLGTALHCL
LLEPDEFSKRFEIGPEVNRRTTAGKEKEKEFMERCEAEGVTPITHDDNRKLRLMRDSAM
AIIPIARWMLEAQGNAEASIYWNDRDTGVLSRCRPDKIITDFNWCVDVKSTADIIKFQKD
FYSYRYHVQDAFYSDGYESHFDETPTFAFLAVSTSIDCGRYPVQVFIMDQQAKDAGRAE
YKRNIHTFAECLSRNEWPGIATLSLPYWAKELRNE

Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ｓｐ． ＭＧＦ０１４ ＲｅｃＥアミノ酸配列（配列番号６）：
【化６】
MKEGIYYNISNEDYHNGLGISKSQLDLINEMPAEYIWSKEAPVDEEKIKPLEIGTALHCLL
LEPDEYHKRYKIGPDVNRRTNVGKEKEKEFFDMCEKEGITPITHDDNRKLMIMRDSALA
HPIAKWCLEADGVSESSIYWTDKETDVLCRCRPDRIITAHNYIIDVKSSGDIEKFDYEYYN
YRYHVQDAFYSDGYKEVTGITPTFLFLVVSTKIDCGKYPVRTYVMSEEAKSAGRTAYK
HNLLTYAECLKTDEWAGIRTLSLPRWAKELRNE

Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｏｎｎｅｉ ＲｅｃＥアミノ酸配列（配列番号７）：
【化７】
DRGLLTKEWRKGNRVSRITRTASGANAGGGNLTDRGEGFVHDLTSLARDIATGVLARS
MDVDIYNLHPAHAKRIEEIIAENKPPFSVFRDKFITMPGGLDYSRAIVVASVKEAPIGIEVI
PAHVTAYLNKVLTETDHANPDPEIVDIACGRSSAPMPQRVTEEGKQDDEEKLQPSGTTA
DEQGEAETMEPDATKHHQDTQPLDAQSQVNSVDAKYQELRAELHEARKNIPSKNPVDA
DKLLAASRGEFVDGISDPNDPKWVKGIQTRDSVYQNQPETEKTSPDMKQPEPVVQQEPE
IAFNACGQTGGDNCPDCGAVMGDATYQETFDEENQVEAKENDPEEMEGAEHPHNENA
GSDPHRDCSDETGEVADPVIVEDIEPGIYYGISNENYHAGPGVSKSQLDDIADTPALYLW
RKNAPVDTTKTKTLDLGTAFHCRVLEPEEFSNRFIVAPEFNRRTNAGKEEEKAFLMECA
STGKMVITAEEGRKIELMYQSVMALPLGQWLVESAGHAESSIYWEDPETGILCRCRPDK
IIPEFHWIMDVKTTADIQRFKTAYYDYRYHVQDAFYSDGYEAQFGVQPTFVFLVASTTIE
CGRYPVEIFMMGEEAKLAGQLEYHRNLRTLADCLNTDEWPAIKTLSLPRWAKEYAND

Ｐｓｅｕｄｏｂａｃｔｅｒｉｏｖｏｒａｘ ａｎｔｉｌｌｏｇｏｒｇｉｉｃｏｌａ ＲｅｃＥアミノ酸配列（配列番号８）：
【化８】
MSKLSNLKVSNSDVDTLSRIRMKEGVYRDLPIESYHQSPGYSKTSLCQIDKAPIYLKTKV
PQKSTKSLNIGTAFHEAMEGVFKDKYVVHPDPGVNKTTKSWKDFVKRYPKHMPLKRSE
YDQVLAMYDAARSYRPFQKYHLSRGFYESSFYWHDAVTNSLIKCRPDYITPDGMSVIDF
KTTVDPSPKGFQYQAYKYHYYVSAALTLEGIEAVTGIRPKEYLFLAVSNSAPYLTALYR
ASEKEIALGDHFIRRSLLTLKTCLESGKWPGLQEEILELGLPFSGLKELREEQEVEDEFME
LVG

Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＲｅｃＴアミノ酸配列（配列番号９）：

【化９】
MTKQPPIAKADLQKTQGNRAPAAVKNSDVISFINQPSMKEQLAAALPRHMTAERMIRIA
TTEIRKVPALGNCDTMSFVSAIVQCSQLGLEPGSALGHAYLLPFGNKNEKSGKKNVQLI
GYRGMIDLARRSGQIASLSARVVREGDEFSFEFGLDEKLIHRPGENEDAPVTHVYAVAR
LKDGGTQFEVMTRKQIELVRSLSKAGNNGPWVTHWEEMAKKTAIRRLFKYLPVSIEIQR
AVSMDEKEPLTIDPADSSVLTGEYSVIDNSEE*

Ｐａｎｔｏｅａ　ｂｒｅｎｎｅｒｉ　ＲｅｃＴアミノ酸配列（配列番号１０）：
【化１０】
MSNQPPIASADLQKTQQSKQVANKTPEQTLVGFMNQPAMKSQLAAALPRHMTADRMI
RIVTTEIRKTPQLAQCDQSSFIGAVVQCSQLGLEPGSALGHAYLLPFGNGRSKSGQSNVQ
LIIGYRGMIDLARRSGQIVSLSARVVRADDEFSFEYGLDENLVHRPGENEDAPITHVYAV
ARLKDGGTQFEVMTVKQVEKVKAQSKASSNGPWVTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSI
EMQKAVVLDEKAESDVDQDNASVLSAEYSVLESGDEATN

Ｐｌａｕｔｉａ　ｓｔａｌｉのＦ型共生体ＲｅｃＴアミノ酸配列（配列番号１１）：
【化１１】
MSNQPPIASADLQKTQQSKQVANKTPEQTLVGFMNQPAMKSQLAAALPRHMTADRMI
RIVTTEIRKTPALATCDQSSFIGAVVQCSQLGLEPGSALGHAYLLPFGNGRSKSGQSNVQ
LIIGYRGMIDLARRSGQIVSLSARVVRADDEFSFEYGLDENLIHRPGDNEDAPITHVYAV
ARLKDGGTQFEVMTAKQVEKVKAQSKASSNGPWVTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSI
EMQKAVVLDEKAESDVDQDNASVLSAEYSVLEGDGGE

Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ　ｓｐ．　ＭＧＦ０１４　ＲｅｃＴアミノ酸配列（配列番号１２）：
【化１２】
MSNPPLAQSDLQKTQGTEVKVKTKDQQLIQFINQPSMKAQLAAALPRHMTPDRMIRIVT
TEIRKTPALATCDMQSFVGAVVQCSQLGLEPGNALGHAYLLPFGNGKAKSGQSNVQLII
GYRGMIDLARRSNQIISISARTVRQGDNFHFEYGLNEDLTHTPSENEDSPITHVYAVARL
KDGGVQFEVMTYNQVEKVRASSKAGQNGPWVSHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQ
KAVVLDEKAEANVDQENATIFEGEYEEVGTDGN

Ｓｈｉｇｅｌｌａ　ｓｏｎｎｅｉ　ＲｅｃＴアミノ酸配列（配列番号１３）：
【化１３】
MTKQPPIAKADLQKTQENRAPAAIKNNDVISFINQPSMKEQLAAALPRHMTAERMIRIA
TTEIRKVPALGNCDTMSFVSAIVQCSQLGLEPGSALGHAYLLPFGNKNEKSGKKNVQLI
GYRGMIDLARRSGQIASLSARVVREGDEFNFEFGLDEKLIHRPGENEDAPVTHVYAVAR
LKDGGTQFEVMTRRQIELVRSQSKAGNNGPWVTHWEEMAKKTAIRRLFKYLPVSIEIQR
AVSMDEKEPLTIDPADSSVLTGEYSVIDNSEE

Ｐｓｅｕｄｏｂａｃｔｅｒｉｏｖｏｒａｘ　ａｎｔｉｌｌｏｇｏｒｇｉｉｃｏｌａ　ＲｅｃＴアミノ酸配列（配列番号１４）：
【化１４】
MGHLVSKTEQDYIKQHYAKGATDQEFEHFIGVCRARGLNPAANQIYFVKYRSKDGPAK
PAFILSIDSLRLIAHRTGDYAGCSEPIFTDGGKACTVTVRRNLKSGETGNFSGMAFYDEQ
VQQKNGRPTSFWQSKPRTMLEKCAEAKALRKAFPQDLGQFYIREEMPPQYDEPIQVHK
PKALEEPRFSKSDLSRRKGLNRKLSALGVDPSRFDEVATFLDGTPDRELGQKLKLWLKE
AGYGVNQ

ＳＶ４０　ＮＬＳアミノ酸配列（配列番号１６）：
ＰＫＫＫＲＫＶ

Ｔｙ１　ＮＬＳアミノ酸配列（配列番号１７）：
ＮＳＫＫＲＳＬＥＤＮＥＴＥＩＫＶＳＲＤＴＷＮＴＫＮＭＲＳＬＥＰＰＲＳＫＫＲＩＨ
ｃ－Ｍｙｃ　ＮＬＳアミノ酸配列（配列番号１８）：
ＰＡＡＫＲＶＫＬＤ
ｂｉＳＶ４０　ＮＬＳアミノ酸配列（配列番号１９）：
ＫＲＴＡＤＧＳＥＦＥＳＰＫＫＫＲＫＶ
Ｍｕｔ　ＮＬＳアミノ酸配列（配列番号２０）：
ＰＥＫＫＲＲＲＰＳＧＳＶＰＶＬＡＲＰＳＰＰＫＡＧＫＳＳＣＩ
鋳型ＤＮＡ配列（下線は置換されたまたは挿入編集配列を示す）
ＥＭＸ１　ＨＤＲ鋳型配列（配列番号７９）：
【化１５】
CATTCTGCCTCTCTGTATGGAAAAGAGCATGGGGCTGGCCCGTGGGGTGGTGTCCAC
TTTAGGCCCTGTGGGAGATCATGGGAACCCACGCAGTGGGTcataggctctctcatttactactcacat
ccactctgtgaagaagcgattatgatctctcctctagaaaCTCGTAGAGTCCCATGTCTGCCGGCTTCCAGAG
CCTGCACTCCTCCACCTTGGCTTGGCTTTGCTGGGGCTAGAGGAGCTAGGATGCACA
GCAGCTCTGTGACCCTTTGTTTGAGAGGAACAGGAAAACCACCCTTCTCTCTGGCCC
ACTGTGTCCTCTTCCTGCCCTGCCATCCCCTTCTGTGAATGTTAGACCCATGGGAGCA
GCTGGTCAGAGGGGACCCCGGCCTGGGGCCCCTAACCCTATGTAGCCTCAGTCTTCC
CATCAGGCTCTCAGCTCAGCCTGAGTGTTGAGGCCCCAGTGGCTGCTCTGGGGGCCT
CCTGAGTTTCTCATCTGTGCCCCTCCCTCCCTGGCCCAGGTGAAGGTGTGGTTCCAG
AACCGGAGGACAAAGTACAAACGGCAGAAGCTGGAGGAGGAAGGGCCTGAGTCCG
AGCAGAAGAAGAAGGGCTCCCATCACATCAACCGGTGGCGCATTGCCACGAAGCAG
GCCAATGGGGAGGACATCGATGTCACCTCCAATGACTCGGATGTACACGGTCTGCA
ACCACAAACCCACGAGGGCAGAGTGCTGCTTGCTGCTGGCCAGGCCCCTGCGTGGG
CCCAAGCTGGACTCTGGCCACTCCCTGGCCAGGCTTTGGGGAGGCCTGGAGTCATGG
CCCCACAGGGCTTGAAGCCCGGGGCCGCCATTGACAGAGGGACAAGCAATGGGCTG
GCTGAGGCCTGGGACCACTTGGCCTTCTCCTCGGAGAGCCTGCCTGCCTGGGCGGGC
CCGCCCGCCACCGCAGCCTCCCAGCTGCTCTCCGTGTCTCCAATCTCCCTTTTGTTTT
GATGCATTTCTGTTTTAATTTATTTTCCAGGCACCACTGTAGTTTAGTGATCCCCAGT
GTCCCCCTTCCCTATGGGAATAATAAAAGTCTCTCTCTTAATGACACGGGCATCCAG
CTCCAGCCCCAGAGCCTGGGGTGGTAGATTCCGGCTCTGAGGGCCAGTGGGGGCTG
GTAGAGCAAACGCGTTCAGGGCCTGGGAGCCTGGGGTGGGGTACTGGTGGAGGGGG
TCAAGGGTAATTCATTAACTCCTCTCTTTTGTTGGGGGACCCTGGTCTCTACCTCCAG
CTCCACAGCAGGAGAAACAGGCTAGACATAGGGAAGGGCCATCCTGTATCTTGAGG
GAGGACAGGCCCAGGTCTTTCTTAACGTATTGAGAGGTGGGAATCAGGCCCAGGTA
GTTCAATGGG

ＶＥＧＦＡ　ＨＤＲ鋳型配列（配列番号８０）：

【化１６】

AGGTTTGAATCATCACGCAGGCCCTGGCCTCCACCCGCCCCCACCAGCCCCCTGGCC
TCAGTTCCCTGGCAACATCTGGGGTTGGGGGGGCAGCAGGAACAAGGGCCTCTGTC
TGCCCAGCTGCCTCCCCCTTTGGGTTTTGCCAGACTCCACAGTGCATACGTGGGCTC
CAACAGGTCCTCTTCCCTCCCAGTCACTGACTAACCCCGGAACCACACAGCTTCCCG
TTctcagctccacaaacttggtgccaaattcttctccctgggaagcatccctggacacttcccaaaggaccccagtcactccagcctgttg
gctgccgctcactttgatgtctgcaggccagatgagggctccagatggcacattgtcagagggacacactgtggcccctgtgcccagccct
gggctctctgtacatgaagcaactccagtcccaaatatgtagctgtttgggaggtcagaaatagggggtccaggagcaaactcccccccacc
ccctttccaaagcccattccctctttagccagagccggggtgtgcagacggcagtcactagggggcgctcggccaccacagggaagctg
ggtgaatggagcgagcagcgtcttcgagagtgaggacgtgtgtgtctgtgtgggtgagtgagtgtgCgcACTCTAGAGgtgtCg
Tgttgagggcgttggagcggggagaaggccaggggtcactccaggattccaatagatctgtgtgtccctctccccacccgtccctgtccg
gctctccgccttcccctgccccccttcaatattcctagcaaagagggaacggctctcaggccctgtccgcacgtaacctcactttcctgctccct
cctcgccaatgccccgcgggcgcgtgtctctggacagagtttccgggggcggatgggtaattttcaggctgtgaaccttggtgggggtcga
gcttccccttcattgcggcgggctGCGGGCCAGGCTTCACTGAGCGTCCGCAGAGCCCGGGCCCGA
GCCGCGTGTGGAAGGGCTGAGGCTCGCCTGTccccgccccccgggggcgggccgggggcggggtcccgg
cggggcggAGCCATGCGCCCCCCCCttttttttttAAAAGTCGGCTGGTAGCGGGGAGGATCGC
GGAGGCTTGGGGCAGCCGGGTAGCTCGGAGGTCGTGGCGCTGGGGGCTAGCACCAG
CGCTCTGTCGGGAGGCGCAGCGGTTAGGTGGACCGGTCAGCGGACTCACCGGCCAG
GGCGCTCGGTGCTGGAATTTGATATTCATTGATCCGGGttttatccctcttcttttttcttaaacatttttttttA
AAACTGTATTGTTTCTCGTTTTAATTTATTTTTGCTTGCCATTCCCCACTTGAAT

ＤＹＮＬＴ１　ＨＤＲ鋳型配列（配列番号８１）：

【化１７】

AGTGACCTGTGTAATTATGCAGAAGAATGGAGCTGGATTACACACAGCAAGTTCCT
GCTTCTGGGACAGCTCTACTGACGGTATGATTTTCATTCATGTTTGTGAAGTTTTGTT
GTGTGAAATATATGACTGGAAGTTTCCTATCTTTGAATGCAATGCATGTTTATCACCT
TTTAAAACATTTAATAATAGACTTGCCAAGGTTCTTTGTGTAGCATAGAGATGGGTA
CTTGAATGTTGGCCTTATTGTGAGTAAAACGTCGTCCCCCAGCTTTCCCTGCCGTAAA
TGCTGCTCTCTTCCCTCCCGCAGGGAGCTGCACTGTGCGATGGGAGAATAAGACCAT
GTACTGCATCGTCAGTGCCTTCGGACTGTCTATTGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAG
CCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTgccaccatggtgagcgagct
gattaaggagaacatgcacatgaagctgtacatggagggcaccgtgaacaaccaccacttcaagtgcacatccgagggcgaaggcaagc
cctacgagggcacccagaccatgagaatcaaggcggtcgagggcggccctctccccttcgccttcgacatcctggctaccagcttcatgta
cggcagcaaaaccttcatcaaccacacccagggcatccccgacttctttaagcagtccttccccgagggcttcacatgggagagagtcacc
acatacgaagatgggggcgtgctgaccgctacccaggacaccagcctccaggacggctgcctcatctacaacgtcaagatcagaggggt
gaacttcccatccaacggccctgtgatgcagaagaaaacactcggctgggaggcctccaccgagacactgtaccccgctgacggcggcc
tggaaggcagagccgacatggccctgaagctcgtgggcgggggccacctgatctgcaaccttaagaccacatacagatccaagaaaccc
gctaagaacctcaagatgcccggcgtctactatgtggacaggagactggaaagaatcaaggaggccgacaaagagacatacgtcgagca
gcacgaggtggctgtggccagatactgcgacctccctagcaaactggggcacaaacttaattccTAACCaGCtGTCCtGCCT
ATGGCCTTTCTCCTTTTGTCTCTAGTTCATCCTCTAACCACCAGCCATGAATTCAGTG
AACTCTTTTCTCATTCTCTTTGTTTTGTGGCACTTTCACAATGTAGAGGAAAAAACCA
AATGACCGCACTGTGATGTGAATGGCACCGAAGTCAGATGAGTATCCCTGTAGGTC
ACCTGCAGCCTGCGTTGCCACTTGTCTTAACTCTGAATATTTCATTTCAAAGGTGCTA
AAATCTGAAATCTGCTAGTGTGAAACTTGCTCTACTCTCTGAAATGATTCAAATACA
CTAATTTTCCATACTTTATACTTTTGTTAGAATAAATTATTCAAATCTAAAGTCTGTT
GTGTTCTTCATAGTCTGCATAGTATCATAAACG

ＨＳＰ９０ＡＡ１　ＨＤＲ鋳型配列（配列番号８２）：

【化１８】

GCAGCAAAGAAACACCTGGAGATAAACCCTGACCATTCCATTATTGAGACCTTAAG
GCAAAAGGCAGAGGCTGATAAGAACGACAAGTCTGTGAAGGATCTGGTCATCTTGC
TTTATGAAACTGCGCTCCTGTCTTCTGGCTTCAGTCTGGAAGATCCCCAGACACATG
CTAACAGGATCTACAGGATGATCAAACTTGGTCTGGGTAAGCCTTATACTATGTAAT
GTTAAAAAGAAAATAAACACACGTGACATTGAAGAAAATGGTGAACTTTCAGTTAT
CCAAACTTGGAGCACCTTGTCCTGCTTGCTGCTTGGAGGTATTAAAGTATGttttttttAGG
GATAAGTAAGGTCTTACAAGAGCAAAGAAATGAAATTGAGACTCATATGTCCTGTA
ATACTGTCTTGAAAGCAGATAGAAACCAAGAGTATTACCCTAATAGCTGGCTTTAAG
AAATCTTTGTAATATGAGGATTTTATTTTGGAAACAGGTATTGATGAAGATGACCCT
ACTGCTGATGATACCAGTGCTGCTGTAACTGAAGAAATGCCACCCCTTGAAGGAGAT
GACGACACATCACGCATGGAAGAAGTAGACGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCT
GCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTgtgagcgagctgattaaggagaaca
tgcacatgaagctgtacatggagggcaccgtgaacaaccaccacttcaagtgcacatccgagggcgaaggcaagccctacgagggcac
ccagaccatgagaatcaaggcggtcgagggcggccctctccccttcgccttcgacatcctggctaccagcttcatgtacggcagcaaaacc
ttcatcaaccacacccagggcatccccgacttctttaagcagtccttccccgagggcttcacatgggagagagtcaccacatacgaagatgg
gggcgtgctgaccgctacccaggacaccagcctccaggacggctgcctcatctacaacgtcaagatcagaggggtgaacttcccatccaa
cggccctgtgatgcagaagaaaacactcggctgggaggcctccaccgagacactgtaccccgctgacggcggcctggaaggcagagc
cgacatggccctgaagctcgtgggcgggggccacctgatctgcaaccttaagaccacatacagatccaagaaacccgctaagaacctcaa
gatgcccggcgtctactatgtggacaggagactggaaagaatcaaggaggccgacaaagagacatacgtcgagcagcacgaggtggct
gtggccagatactgcgacctccctagcaaactggggcacaaacttaattccTAaATCTgTGGCTGAGGGATGACTTA
CCTGTTCAGTACTCTACAATTCCTCTGATAATATATTTTCAAGGATGTTTTTCTTTATT
TTTGTTAATATTAAAAAGTCTGTATGGCATGACAACTACTTTAAGGGGAAGATAAGA
TTTCTGTCTACTAAGTGATGCTGTGATACCTTAGGCACTAAAGCAGAGCTAGTAATG
CTTTTTGAGTTTCATGTTGGTTTATTTTCACAGATTGGGGTAACGTGCACTGTAAGAC
GTATGTAACATGATGTTAACTTTGTGGTCTAAAGTGTTTAGCTGTCAAGCCGGATGC
CTAAGTAGACCAAATCTTGTTATTGAAGTGTTCTGAGCTGTATCTTGATGTTTAGAA
AAGTATTCGTTACATCTTGTAGGATCTACTTTTTGAACTTTTCATTCCCTGTAGTTGA
CAATTCTGCATGTACTAGTCCTCTAGAAATAGGTTAAACTGAAGCAACTTGATGGAA
GGATCTCTCCACAGGGCTTGTTTTCCAAAGAAAAGTATTGTTTGGAGGAGCAAAGTT
AAAAGCCTACCTAAGCATATCGTAAAGCTGTTCAAAAATAACTCAGACCCAGTCTTG
TGGA

ＡＡＶＳ１　ＨＤＲ鋳型配列（配列番号８３）：

【化１９】

gatgctctttccggagcacttccttctcggcgctgcaccacgtgatgtcctctgagcggatcctccccgtgtctgggtcctctccgggcatctc
tcctccctcacccaaccccatgccgtcttcactcgctgggttccctttccttctccttctggggcctgtgccatctctcgtttcttaggatggcctt
ctccgacggatgtctcccttgcgtcccgcctccccttcttgtaggcctgcatcatcaccgtttttctggacaaccccaaagtaccccgtctccct
ggctttagccacctctccatcctcttgctttctttgcctggacaccccgttctcctgtggattcgggtcacctctcactcctttcatttgggcagctc
ccctacccccccttacctctctagtctgtgctagctcttccagcccccctgtcatggcatcttccaggggtccgagagctcagctagtcttcttcctc
caacccgggcccctatgtccacttcaggacagcatgtttgctgcctccagggatcctgtgtccccgagctgggaccaccttatattcccagg
gccggttaatgtggctctggttctgggtacttttatctgtcccctccaccccacagtggggcaagcttctgacctcttctcttcctcccacaggg
cctcgagagatctggcagcggaGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGA
GACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTgtgagcgagctgattaaggagaacatgcacatgaagctgtacatggagggc
accgtgaacaaccaccacttcaagtgcacatccgagggcgaaggcaagccctacgagggcacccagaccatgagaatcaaggcggtcg
agggcggccctctccccttcgccttcgacatcctggctaccagcttcatgtacggcagcaaaaccttcatcaaccacacccagggcatcccc
gacttctttaagcagtccttccccgagggcttcacatgggagagagtcaccacatacgaagatgggggcgtgctgaccgctacccaggac
accagcctccaggacggctgcctcatctacaacgtcaagatcagaggggtgaacttcccatccaacggccctgtgatgcagaagaaaaca
ctcggctgggaggcctccaccgagacactgtaccccgctgacggcggcctggaaggcagagccgacatggccctgaagctcgtgggc
gggggccacctgatctgcaaccttaagaccacatacagatccaagaaacccgctaagaacctcaagatgcccggcgtctactatgtggac
aggagactggaaagaatcaaggaggccgacaaagagacatacgtcgagcagcacgaggtggctgtggccagatactgcgacctcccta
gcaaactggggcacaaacttaattccTAaactagggacaggattggtgacagaaaagccccatccttaggcctcctccttcctagtctcct
gatattgggtctaacccccacctcctgttaggcagattccttatctggtgacacaccccatttcctggagccatctctctccttgccagaacct
ctaaggtttgcttacgatggagccagagaggatcctgggagggagagcttggcaggggggtgggagggaaggggggggatgcgtgacctg
cccggttctcagtggccaccctgcgctaccctctcccagaacctgagctgctctgacgcggctgtctggtgcgtttcactgatcctggtgctg
cagcttccttacacttcccaagaggagaagcagtttggaaaaacaaaatcagaataagttggtcctgagttctaactttggctcttcacctttcta
gtccccaatttatattgttcctccgtgcgtcagttttacctgtgagataaggccagtagccagccccgtcctggcagggctgtggtgaggagg
ggggtgtccgtgtggaaaactccctttgtgagaatggtgcgtcctaggtgttcaccaggtcgtggccgcctctactccctttctctttctccatc
cttctttccttaaagagtccccagtgctatctgggacatattcctccgcccagagcagggtcccgcttccctaaggccctgctctgggcttctg
ggtttgagtccttggc

ＯＣＴ４　ＨＤＲ鋳型配列（配列番号８４）：

【化２０】

GCGACTATGCACAACGAGAGGATTTTGAGGCTGCTGGGTCTCCTTTCTCAGGGGGAC
CAGTGTCCTTTCCTCTGGCCCCAGGGCCCCATTTTGGTACCCCAGGCTATGGGAGCC
CTCACTTCACTGCACTGTACTCCTCGGTCCCTTTCCCTGAGGGGGAAGCCTTTCCCCC
TGTCTCCGTCACCACTCTGGGCTCTCCCATGCATTCAAAtGGAAGCGGAGCTACTAAC
TTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTgccaccatggtga
gcgagctgattaaggagaacatgcacatgaagctgtacatggagggcaccgtgaacaaccaccacttcaagtgcacatccgagggcgaa
ggcaagccctacgagggcacccagaccatgagaatcaaggcggtcgagggcggccctctcccccttcgccttcgacatcctggctaccag
cttcatgtacggcagcaaaaccttcatcaaccacacccagggcatccccgacttctttaagcagtccttccccgagggcttcacatgggaga
gagtcaccacatacgaagatgggggcgtgctgaccgctacccaggacaccagcctccaggacggctgcctcatctacaacgtcaagatc
agaggggtgaacttcccatccaacggccctgtgatgcagaagaaaacactcggctgggaggcctccaccgagacactgtaccccgctga
cggcggcctggaaggcagagccgacatggccctgaagctcgtgggcgggggccacctgatctgcaaccttaagaccacatacagatcc
aagaaacccgctaagaacctcaagatgcccggcgtctactatgtggacaggagactggaaagaatcaaggaggccgacaaagagacat
acgtcgagcagcacgaggtggctgtggccagatactgcgacctccctagcaaactggggcacaaacttaattccTAaTGACTAG
GAATGGGGGACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGGGAAAGAAAACCTGGAGTTTGTGC
CAGGGTTTTTGGGATTAAGTTCTTCATTCACTAAGGAAGGAATTGGGAACACAAAGG
GTGGGGGCAGGGGAGTTTGGGGCAACTGGTTGGAGGGAAGGTGAAGTTCAATGATG
CTCTTGATTTTAATCCCACATCATGTATCACTTTTTTCTTAAATAAAGAAGCCTGGGA
CACAGTAGATAGACACACTT

Ｐａｎｔｏｅａ　ｓｔｅｗａｒｔｉｉ　ＲｅｃＴ　ＤＮＡ（配列番号８５）：

【化２１】

AGCAACCAGCCCCCTATCGCCTCCGCCGATCTGCAGAAGGCCAACACCGGCAAGCA
GGTGGCCAATAAGACCCCTGAGCAGACACTGGTGGGCTTCATGAATCAGCCAGCAA
TGAAGAGCCAGCTGGCCGCCGCCCTGCCAAGGCACATGACAGCCGATCGGATGATC
AGAATCGTGACCACAGAGATCCGCAAGACCCCCGCCCTGGCCACATGCGACCAGAG
CTCCTTCATCGGCGCCGTGGTGCAGTGTTCTCAGCTGGGCCTGGAGCCTGGCAGCGC
CCTGGGCCACGCCTACCTGCTGCCATTTGGCAACGGCCGGAGCAAGTCCGGACAGT
CCAATGTGCAGCTGATCATCGGCTATAGAGGCATGATCGATCTGGCCCGGAGATCTG
GCCAGATCGTGTCTCTGAGCGCCAGGGTGGTGCGCGCAGACGATGAGTTCTCCTTTG
AGTACGGCCTGGATGAGAACCTGATCCACCGGCCAGGCGAGAATGAGGACGCACCC
ATCACCCACGTGTATGCAGTGGCAAGACTGAAGGACGGAGGCACCCAGTTCGAAGT
GATGACAGTGAAGCAGATCGAGAAGGTGAAGGCCCAGTCCAAGGCCTCTAGCAACG
GACCCTGGGTGACCCACTGGGAGGAGATGGCCAAGAAAACCGTGATCAGGCGCCTG
TTTAAGTACCTGCCCGTGAGCATCGAGATGCAGAAGGCCGTGATCCTGGATGAGAA
GGCCGAGTCTGACGTGGATCAGGACAATGCCTCCGTGCTGTCTGCCGAGTATAGCGT
GCTGGACGGCTCCTCTGAGGAG

Ｐａｎｔｏｅａ　ｓｔｅｗａｒｔｉｉ　ＲｅｃＥ　ＤＮＡ（配列番号８６）：

【化２２】

CAGCCCGGCGTGTACTATGACATCTCCAACGAGGAGTATCACGCCGGCCCTGGCATC
AGCAAGTCCCAGCTGGACGACATCGCCGTGTCCCCAGCCATCTTCCAGTGGAGAAA
GTCTGCCCCCGTGGACGATGAGAAAACCGCCGCCCTGGACCTGGGCACAGCCCTGC
ACTGCCTGCTGCTGGAGCCTGATGAGTTCTCCAAGAGGTTTATGATCGGCCCAGAGG
TGAACCGGAGAACCAATGCCGGCAAGCAGAAGGAGCAGGACTTCCTGGATATGTGC
GAGCAGCAGGGCATCACCCCTATCACACACGACGATAACCGGAAGCTGAGACTGAT
GAGGGACTCTGCCTTTGCCCACCCAGTGGCCAGATGGATGCTGGAGACAGAGGGCA
AGGCCGAGGCCTCTATCTACTGGAATGACAGGGATACACAGATCCTGAGCAGGTGC
CGCCCCGACAAGCTGATCACCGAGTTCTCTTGGTGCGTGGACGTGAAGAGCACAGC
CGACATCGGCAAGTTCCAGAAGGACTTCTACAGCTATCGCTACCACGTGCAGGACG
CCTTCTATTCCGATGGCTACGAGGCCCAGTTTTGCGAGGTGCCAACCTTCGCCTTTCT
GGTGGTGAGCTCCTCTATCGATTGTGGCCGGTATCCCGTGCAGGTGTTTATCATGGA
CCAGCAGGCAAAGGATGCAGGAAGGGCCGAGTATAAGCGGAACCTGACCACATAC
GCCGAGTGCCAGGCAAGGAATGAGTGGCCTGGCATCGCCACACTGAGCCTGCCTTA
CTGGGCCAAGGAGATCCGGAATGTG

Ｐａｎｔｏｅａ　ｂｒｅｎｎｅｒｉ　ＲｅｃＴ　ＤＮＡ（配列番号８７）：

【化２３】

AGCAACCAGCCCCCTATCGCCTCCGCCGATCTGCAGAAAACCCAGCAGTCCAAGCA
GGTGGCCAACAAGACCCCTGAGCAGACACTGGTGGGCTTCATGAATCAGCCAGCAA
TGAAGAGCCAGCTGGCCGCCGCCCTGCCAAGGCACATGACCGCCGATCGGATGATC
AGAATCGTGACCACAGAGATCCGCAAGACACCACAGCTGGCCCAGTGCGACCAGAG
CTCCTTCATCGGCGCCGTGGTGCAGTGTTCTCAGCTGGGCCTGGAGCCTGGCAGCGC
CCTGGGCCACGCCTACCTGCTGCCATTTGGCAACGGCCGGTCCAAGTCTGGCCAGAG
CAATGTGCAGCTGATCATCGGCTATAGAGGCATGATCGATCTGGCCCGGAGATCCG
GACAGATCGTGAGCCTGTCCGCCAGGGTGGTGCGCGCAGACGATGAGTTCTCTTTTG
AGTACGGCCTGGATGAGAACCTGGTGCACCGGCCAGGCGAGAATGAGGACGCACCC
ATCACCCACGTGTATGCAGTGGCAAGACTGAAGGACGGAGGCACCCAGTTCGAAGT
GATGACAGTGAAGCAGGTGGAGAAGGTGAAGGCCCAGTCCAAGGCCTCTAGCAATG
GCCCCTGGGTGACCCACTGGGAGGAGATGGCCAAGAAAACCGTGATCAGGCGCCTG
TTTAAGTACCTGCCCGTGAGCATCGAGATGCAGAAGGCCGTGGTGCTGGATGAGAA
GGCCGAGTCTGACGTGGATCAGGACAACGCCTCTGTGCTGAGCGCCGAGTATTCCGT
GCTGGAGTCTGGCGACGAGGCCACAAAT

Ｐａｎｔｏｅａ　ｂｒｅｎｎｅｒｉ　ＲｅｃＥ　ＤＮＡ（配列番号８８）：
【化２４】
CAGCCTGGCATCTACTATGACATCAGCAACGAGGATTATCACAGGGGAGCAGGCAT
CAGCAAGTCCCAGCTGGACGACATCGCCATCTCCCCAGCCATCTACCAGTGGAGAA
AGCACGCCCCCGTGGACGAGGAGAAAACCGCCGCCCTGGATCTGGGCACAGCCCTG
CACTGCCTGCTGCTGGAGCCTGACGAGTTCTCTAAGAGGTTTCAGATCGGCCCAGAG
GTGAACCGGAGAACCACAGCCGGCAAGGAGAAGGAGAAGGAGTTCATCGAGCGGT
GCGAGGCAGAGGGAATCACCCCAATCACACACGACGATAATAGGAAGCTGAAGCT
GATGAGGGATTCCGCCCTGGCCCACCCAATCGCAAGGTGGATGCTGGAGGCACAGG
GAAACGCAGAGGCCTCTATCTATTGGAATGACAGAGATGCCGGCGTGCTGAGCAGG
TGCCGCCCCGACAAGATCATCACCGAGTTCAACTGGTGCGTGGACGTGAAGTCCAC
AGCCGACATCATGAAGTTCCAGAAGGACTTCTACTCTTACAGATACCACGTGCAGGA
CGCCTTCTATTCCGATGGCTACGAGTCTCACTTTCACGAGACACCCACATTCGCCTTT
CTGGCCGTGTCTACCAGCATCGACTGCGGCAGGTATCCTGTGCAGGTGTTTATCATG
GACCAGCAGGCAAAGGATGCAGGAAGGGCCGAGTACAAGAGAAACATCCACACCT
TCGCCGAGTGTCTGAGCAGGAATGAGTGGCCTGGCATCGCCACACTGTCCCTGCCTT
TTTGGGCCAAGGAGCTGCGCAATGAG

Ｐａｎｔｏｅａ　ｄｉｓｐｅｒｓａ　ＲｅｃＴ　ＤＮＡ（配列番号８９）：
【化２５】
TCCAACCAGCCACCTCTGGCCACCGCAGATCTGCAGAAAACCCAGCAGTCTAACCA
GGTGGCCAAGACCCCTGAGCAGACACTGGTGGGCTTCATGAATCAGCCAGCAATGA
AGAGCCAGCTGGCCGCCGCCCTGCCAAGGCACATGACCGCCGATCGGATGATCAGA
ATCGTGACCACAGAGATCCGCAAGACACCCGCCCTGGCCCAGTGCGACCAGAGCTC
CTTCATCGGAGCAGTGGTGCAGTGTAGCCAGCTGGGCCTGGAGCCTGGCTCCGCCCT
GGGCCACGCCTACCTGCTGCCATTTGGCAACGGCCGGTCCAAGTCTGGCCAGAGCA
ATGTGCAGCTGATCATCGGCTATAGAGGCATGATCGATCTGGCCCGGAGATCCGGA
CAGATCGTGAGCCTGTCCGCCAGGGTGGTGCGCGCAGACGATGAGTTCTCTTTTGAG
TACGGCCTGGATGAGAACCTGATCCACCGGCCAGGCGACAATGAGTCCGCCCCCAT
CACCCACGTGTATGCAGTGGCAAGACTGAAGGACGGAGGCACCCAGTTCGAAGTGA
TGACAGCCAAGCAGGTGGAGAAGGTGAAGGCCCAGTCCAAGGCCTCTAGCAACGG
ACCCTGGGTGACCCACTGGGAGGAGATGGCCAAGAAAACCGTGATCAGGCGCCTGT
TTAAGTACCTGCCCGTGAGCATCGAGATGCAGAAGGCCGTGGTGCTGGACGAGAAG
GCCGAGAGCGACGTGGATCAGGACAATGCCTCTGTGCTGAGCGCCGAGTATTCCGT
GCTGGAGTCTGGCACAGGCGAG

Ｐａｎｔｏｅａ　ｄｉｓｐｅｒｓａ　ＲｅｃＥ　ＤＮＡ（配列番号９０）：
【化２６】
GAGCCAGGCATCTACTATGACATCAGCAACGAGGCCTACCACTCCGGCCCCGGCAT
CAGCAAGTCCCAGCTGGACGACATCGCCAGGAGCCCTGCCATCTTCCAGTGGCGCA
AGGACGCCCCAGTGGATACCGAGAAAACCAAGGCCCTGGACCTGGGCACCGATTTC
CACTGCGCCGTGCTGGAGCCAGAGAGGTTTGCAGACATGTATCGCGTGGGCCCTGA
AGTGAATCGGAGAACCACAGCCGGCAAGGCCGAGGAGAAGGAGTTCTTTGAGAAGT
GTGAGAAGGATGGAGCCGTGCCCATCACCCACGACGATGCACGGAAGGTGGAGCTG
ATGAGAGGCTCCGTGATGGCCCACCCTATCGCCAAGCAGATGATCGCAGCACAGGG
ACACGCAGAGGCCTCTATCTACTGGCACGACGAGAGCACAGGCAACCTGTGCCGGT
GTAGACCCGACAAGTTTATCCCTGATTGGAATTGGATCGTGGACGTGAAAACCACA
GCCGATATGAAGAAGTTCAGGCGCGAGTTTTACGATCTGCGGTATCACGTGCAGGA
CGCCTTCTACACCGATGGCTATGCCGCCCAGTTTGGCGAGCGGCCTACCTTCGTGTT
TGTGGTGACATCCACCACAATCGACTGCGGCAGATACCCCACCGAGGTGTTCTTTCT
GGATGAGGAGACAAAGGCCGCCGGCAGGTCTGAGTACCAGAGCAACCTGGTGACCT
ATTCCGAGTGTCTGTCTCGCAATGAGTGGCCAGGCATCGCCACACTGTCTCTGCCCC
ACTGGGCCAAGGAGCTGAGGAACGTG

Ｐｌａｕｔｉａ　ｓｔａｌｉのＦ型共生体ＲｅｃＴ　ＤＮＡ（配列番号９１）：

【化２７】
TCCAACCAGCCCCCTATCGCCTCTGCCGATCTGCAGAAAACCCAGCAGTCTAAGCAG
GTGGCCAACAAGACCCCTGAGCAGACACTGGTGGGCTTCATGAATCAGCCAGCAAT
GAAGTCCCAGCTGGCCGCCGCCCTGCCAAGGCACATGACAGCCGATCGGATGATCA
GAATCGTGACCACAGAGATCCGCAAGACCCCCGCCCTGGCCACATGCGACCAGAGC
TCCTTCATCGGAGCAGTGGTGCAGTGTAGCCAGCTGGGCCTGGAGCCTGGCTCCGCC
CTGGGCCACGCCTACCTGCTGCCATTTGGCAACGGCCGGTCCAAGTCTGGCCAGTCT
AATGTGCAGCTGATCATCGGCTATAGAGGCATGATCGACCTGGCCCGGAGAAGCGG
ACAGATCGTGAGCCTGTCCGCCAGGGTGGTGCGCGCAGACGATGAGTTCTCCTTTGA
GTACGGCCTGGATGAGAACCTGATCCACCGGCCAGGCGATAATGAGGACGCCCCCA
TCACCCACGTGTATGCAGTGGCAAGACTGAAGGACGGAGGCACCCAGTTCGAAGTG
ATGACAGCCAAGCAGGTGGAGAAGGTGAAGGCCCAGAGCAAGGCCTCTAGCAACG
GACCCTGGGTGACCCACTGGGAGGAGATGGCCAAGAAAACCGTGATCAGGCGCCTG
TTTAAGTACCTGCCCGTGAGCATCGAGATGCAGAAGGCCGTGGTGCTGGATGAGAA
GGCCGAGAGCGACGTGGATCAGGACAATGCCTCTGTGCTGAGCGCCGAGTATTCCG
TGCTGGAGGGCGACGGCGGCGAG

Ｐｌａｕｔｉａ　ｓｔａｌｉのＦ型共生体ＲｅｃＥ　ＤＮＡ（配列番号９２）：
【化２８】
CAGCCTGGCATCTACTATGACATCAGCAACGAGGATTATCACGGCGGCCCTGGCATC
AGCAAGTCCCAGCTGGACGACATCGCCATCTCCCCAGCCATCTACCAGTGGAGGAA
GCACGCCCCCGTGGACGAGGAGAAAACCGCCGCCCTGGATCTGGGCACAGCCCTGC
ACTGCCTGCTGCTGGAGCCTGACGAGTTCTCTAAGAGATTTGAGATCGGCCCAGAGG
TGAACCGGAGAACCACAGCCGGCAAGGAGAAGGAGAAGGAGTTCATGGAGAGGTG
TGAGGCAGAGGGAGTGACCCCTATCACACACGACGATAATCGGAAGCTGAGACTGA
TGAGGGATAGCGCAATGGCCCACCCAATCGCCAGATGGATGCTGGAGGCACAGGGA
AACGCAGAGGCCTCTATCTATTGGAATGACAGGGATACCGGCGTGCTGAGCAGGTG
CCGCCCCGACAAGATCATCACCGACTTCAACTGGTGCGTGGACGTGAAGTCCACAG
CCGACATCATCAAGTTCCAGAAGGACTTTTACTCTTATCGCTACCACGTGCAGGACG
CCTTCTATTCCGATGGCTACGAGTCTCACTTTGACGAGACACCAACATCGCCTTTCT
GGCCGTGTCTACAAGCATCGATTGCGGCCGGTATCCCGTGCAGGTGTTCATCATGGA
CCAGCAGGCAAAGGATGCACGGAAGGGCCGAGTACAAGCGGAACATCCACACCTTTG
CCGAGTGTCTGAGCCGCAATGAGTGGCCTGGCATCGCCACACTGTCCCTGCCTTACT
GGGCCAAGGAGCTGCGGAATGAG

Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ　ｓｔｕａｒｔｉｉ　ＲｅｃＴ　ＤＮＡ（配列番号９３）：
【化２９】
AGCAACCCACCTCTGGCCCAGGCAGACCTGCAGAAAACCCAGGGCACAGAGGTGAA
GGAGAAAACCAAGGATCAGATGCTGGTGGAGCTGATCAATAAGCCTTCCATGAAGG
CACAGCTGGCCGCCGCCCTGCCAAGGCACATGACACCCGACCGGATGATCAGAATC
GTGACCACAGAGATCAGAAAGACCCCCGCCCTGGCCACATGCGATATGCAGAGCTT
CGTGGGAGCAGTGGTGCAGTGTTCCCAGCTGGGCCTGGAGCCTGGCAACGCCCTGG
GACACGCCTACCTGCTGCCTTTTGGCAACGGCAAGTCTAAGAGCGGCCAGTCTAATG
TGCAGCTGATCATCGGCTATCGGGGCATGATCGACCTGGCCCGGAGAAGCGGCCAG
ATCGTGTCCATCTCTGCCAGGACCGTGCGCCAGGGCGATAACTTCCACTTTGAGTAC
GGCCTGAACGAGAATCTGACCCACGTGCCTGGCGAGAATGAGGACTCTCCAATCAC
ACACGTGTACGCAGTGGCAAGGCTGAAGGATGGAGGCGTGCAGTTCGAAGTGATGA
CCTATAACCAGATCGAGAAGGTGCGCGCCAGCTCCAAGGCAGGACAGAATGGACCC
TGGGTGAGCCACTGGGAGGAGATGGCCAAGAAAACCGTGATCAGGCGCCTGTTCAA
GTACCTGCCCGTGTCTATCGAGATGCAGAAGGCCGTGATCCTGGACGAGAAGGCCG
AGGCCAACATCGATCAGGAGAATGCCACCATCTTTGAGGGCGAGTATGAGGAAGTG
GGCACAGACGGCAAG

Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ　ｓｔｕａｒｔｉｉ　ＲｅｃＥ　ＤＮＡ（配列番号９４）：

【化３０】

GAGGGCATCTACTATAACATCAGCAATGAGGACTACCACAACGGCCTGGGCATCTC
CAAGTCTCAGCTGGATCTGATCAATGAGATGCCTGCCGAGTATATCTGGTCCAAGGA
GGCCCCCGTGGACGAGGAGAAGATCAAGCCTCTGGAGATCGGCACCGCCCTGCACT
GCCTGCTGCTGGAGCCAGACGAGTACCACAAGAGATATAAGATCGGCCCCGATGTG
AACCGGAGAACAAATGCCGGCAAGGAGAAGGAGAAGGAGTTCTTTGATATGTGCGA
GAAGGAGGGCATCACCCCCATCACACACGACGATAACCGGAAGCTGATGATCATGA
GAGACTCTGCCCTGGCCCACCCTATCGCCAAGTGGTGTCTGGAGGCCGATGGCGTGA
GCGAGAGCTCCATCTACTGGACCGACAAGGAGACAGATGTGCTGTGCAGGTGTCGC
CCAGACCGCATCATCACCGCCCACAACTACATCGTGGATGTGAAGTCTAGCGGCGA
CATCGAGAAGTTCGATTACGAGTACTACAACTACAGATACCACGTGCAGGACGCCTT
TTACTCCGATGGCTATAAGGAGGTGACCGGCATCACCCCTACATTCCTGTTTCTGGT
GGTGTCTACCAAGATCGACTGCGGCAAGTACCCCGTGCGGACCTACGTGATGAGCG
AGGAGGCAAAGTCCGCCGGAAGGACCGCCTACAAGCACAACCTGCTGACCTATGCC
GAGTGTCTGAAAACCGATGAGTGGGCCGGCATCAGGACACTGTCTCTGCCCAGATG
GGCAAAGGAGCTGCGGAATGAG

Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ｓｐ． ＭＧＦ０１４ ＲｅｃＴ ＤＮＡ（配列番号９５）：

【化３１】

TCTAACCCCCCTCTGGCCCAGAGCGACCTGCAGAAAACCCAGGGCACAGAGGTGAA
GGTGAAAACCAAGGATCAGCAGCTGATCCAGTTCATCAATCAGCCTTCTATGAAGG
CACAGCTGGCCGCCGCCCTGCCAAGGCACATGACACCCGACCGGATGATCAGAATC
GTGACCACAGAGATCAGAAAGACCCCCGCCCTGGCCACATGCGATATGCAGTCCTT
CGTGGGCGCCGTGGTGCAGTGTTCTCAGCTGGGCCTGGAGCCTGGCAACGCCCTGG
GACACGCCTACCTGCTGCCTTTTGGCAACGGCAAGGCCAAGTCCGGCCAGTCTAATG
TGCAGCTGATCATCGGCTATCGGGGCATGATCGACCTGGCCCGGAGATCCAACCAG
ATCATCTCTATCAGCGCCAGGACCGTGCGCCAGGGCGATAACTTCCACTTTGAGTAC
GGCCTGAATGAGGACCTGACCCACACACCTAGCGAGAATGAGGATTCCCCAATCAC
CCACGTGTACGCAGTGGCAAGGCTGAAGGACGGAGGCGTGCAGTTTGAAGTGATGA
CATATAACCAGGTGGAGAAGGTGCGCGCCAGCTCCAAGGCAGGACAGAATGGACCC
TGGGTGAGCCACTGGGAGGAGATGGCCAAGAAAACCGTGATCAGGCGCCTGTTCAA
GTACCTGCCCCGTGTCCATCGAGATGCAGAAGGCAGTGGTGCTGGACGAGAAGGCAG
AGGCCAACGTGGATCAGGAGAATGCCACCATCTTTGAGGGCGAGTATGAGGAAGTG
GGCACAGATGGCAAT

Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ｓｐ． ＭＧＦ０１４ ＲｅｃＥ ＤＮＡ（配列番号９６）：

【化３２】

AAGGAGGGCATCTACTATAACATCAGCAATGAGGACTACCACAACGGCCTGGGCAT
CTCCAAGTCTCAGCTGGATCTGATCAATGAGATGCCTGCCGAGTATATCTGGTCCAA
GGAGGCCCCCGTGGACGAGGAGAAGATCAAGCCTCTGGAGATCGGCACCGCCCTGC
ACTGCCTGCTGCTGGAGCCAGACGAGTACCACAAGAGATATAAGATCGGCCCCGAT
GTGAACCGGAGAACAAATGTGGGCAAGGAGAAGGAGAAGGAGTTCTTTGATATGTG
CGAGAAGGAGGGCATCACCCCCATCACACACGACGATAACCGGAAGCTGATGATCA
TGAGAGACTCTGCCCTGGCCCACCCTATCGCCAAGTGGTGTCTGGAGGCCGATGGCG
TGAGCGAGAGCTCCATCTACTGGACCGACAAGGAGACAGATGTGCTGTGCAGGTGT
CGCCCAGACCGCATCATCACCGCCCACAACTACATCATCGATGTGAAGTCTAGCGGC
GACATCGAGAAGTTCGATTACGAGTACTACAACTACAGATACCACGTGCAGGACGC
CTTTTACTCCGATGGCTATAAGGAGGTGACCGGCATCACCCCTACATTCCTGTTTCTG
GTGGTGTCTACCAAGATCGACTGCGGCAAGTACCCCGTGCGGACCTACGTGATGAG
CGAGGAGGCAAAGTCCGCCGGAAGGACCGCCTACAAGCACAACCTGCTGACCTATG
CCGAGTGTCTGAAAACCGATGAGTGGGCCGGCATCAGGACACTGTCTCTGCCCAGA
TGGGCAAAGGAGCTGCGGAATGAG

Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ ｐｕｔｒｅｆａｃｉｅｎｓ ＲｅｃＴ ＤＮＡ（配列番号９７）：

【化３３】

CAGACCGCACAGGTGAAGCTGAGCGTGCCCCACCAGCAGGTGTACCAGGACAACTT
CAATTATCTGAGCTCCCAGGTGGTGGGCCACCTGGTGGATCTGAACGAGGAGATCG
GCTACCTGAACCAGATCGTGTTTAATTCTCTGAGCACCGCCTCTCCCCTGGACGTGG
CAGCACCTTGGAGCGTGTACGGCCTGCTGCTGAACGTGTGCCGGCTGGGCCTGTCCC
TGAATCCAGAGAAGAAGCTGGCCTATGTGATGCCCTCCTGGTCTGAGACAGGCGAG
ATCATCATGAAGCTGTACCCCGGCTATAGGGGCGAGATCGCCATCGCCTCTAACTTC
AATGTGATCAAGAACGCCAATGCCGTGCTGGTGTATGAGAACGATCACTTCCGCATC
CAGGCAGCAACCGGCGAGATCGAGCACTTTGTGACAAGCCTGTCCATCGACCCTAG
GGTGCGCGGAGCATGCAGCGGAGGCTACTGTCGGTCCGTGCTGATGGATAATACAA
TCCAGATCTCTTATCTGAGCATCGAGGAGATGAACGCCATCGCCCAGAATCAGATCG
AGGCCAACATGGGCAATACCCCTTGGAACTCCATCTGGCGGACAGAGATGAATAGA
GTGGCCCTGTACCGGAGAGCAGCAAAGGACTGGAGGCAGCTGATCAAGGCCACCCC
AGAGATCCAGTCCGCCCTGTCTGATACAGAGTAT

Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ　ｐｕｔｒｅｆａｃｉｅｎｓ　ＲｅｃＥ　ＤＮＡ（配列番号９８）：

【化３４】

GGCACCGCCCTGGCCCAGACAATCAGCCTGGACTGGCAGGATACCATCCAGCCAGC
ATACACAGCCTCCGGCAAGCCTAACTTCCTGAATGCCCAGGGCGAGATCGTGGAGG
GCATCTACACCGATCTGCCTAATTCCGTGTATCACGCCCTGGACGCACACAGCTCCA
CCGGCATCAAGACATTCGCCAAGGGCCGCCACCACTACTTTCGGCAGTATCTGTCTG
ACGTGTGCCGGCAGAGAACAAAGCAGCAGGAGTACACCTTCGACGCCGGCACCTAC
GGCCACATGCTGGTGCTGGAGCCAGAGAACTTCCACGGCAACTTCATGAGGAACCC
CGTGCCTGACGATTTTCCAGACATCGAGCTGATCGAGAGCATCCCACAGCTGAAGG
CCGCCCTGGCCAAGAGCAACCTGCCCGTGTCCGGAGCAAAGGCCGCCCTGATCGAG
AGACTGTACGCCTTCGACCCATCCCTGCCCCTGTTTGAGAAGATGAGGGAGAAGGC
CATCACCGACTATCTGGATCTGCGCTACGCCAAGTATCTGCGGACCGACGTGGAGCT
GGATGAGATGGCCACATTCTACGGCATCGATACCTCTCAGACACGGGAGAAGAAGA
TCGAGGAGATCCTGGCCATCTCTCCTAGCCAGCCAATCTGGGAGAAGCTGATCAGCC
AGCACGTGATCGACCACATCGTGTGGGACGATGCCATGAGGGTGGAGAGATCCACC
AGGGCCCACCCTAAGGCAGACTGGCTGATCTCTGATGGCTATGCCGAGCTGACAAT
CATCGCAAGGTGCCCAACCACCGGCCTGCTGCTGAAGGTGCGGTTTGACTGGCTGA
GGAATGATGCCATCGGCGTGGACTTCAAGACCACACTGTCTACCAACCCCACAAAG
TTTGGCTACCAGATCAAGGACCTGCGGTATGATCTGCAGCAGGTGTTCTACTGTTAT
GTGGCCAATCTGGCCGGCATCCCTGTGAAGCACTTCTGCTTTGTGGCCACCGAGTAC
AAGGACGCCGATAACTGTGAGACATTTGAGCTGTCTCACAAGAAAGTGATCGAGAG
CACCGAGGAGATGTTCGACCTGCTGGATGAGTTTAAGGAGGCCCTGACCTCCGGCA
ATTGGTATGGCCACGACAGGTCCCGCTCTACATGGGTCATCGAGGTG

Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ．　ＭＵＭ　１１６　ＲｅｃＴ　ＤＮＡ（配列番号９９）：

【化３５】

AGCAAGCAGCTGACCACAGTGAATACCCAGGCCGTGGTGGGCACATTCTCCCAGGC
CGAGCTGGATACCCTGAAGCAGACAATCGCCAAGGGCACCACAAACGAGCAGTTCG
CCCTGTTTGTGCAGACCTGCGCCAACTCTAGGCTGAATCCATTTCTGAACCACATCC
ACTGTATCGTGTATAACGGCAAGGAGGGCGCCACCATGAGCCTGCAGATCGCAGTG
GAGGGCATCCTGTACCTGGCACGCAAGACAGACGGCTATAAGGGCATCGAGTGCCA
GCTGATCCACGAGAATGACGAGTTCAAGTTTGATGCCAAGTCCAAGGAGGTGGATC
ACCAGATCGGATTCCCCAGGGGCAACGTGATCGGAGGATATGCAATCGCAAAGAGG
GAGGGCTTTGACGATGTGGTGGTGCTGATGGAGTCTAACGAGGTGGACCACATGCT
GAAGGGCCGGAATGGCCACATGTGGAGAGACTGGTTCAACGATATGTTTAAGAAGC
ACATCATGAAGCGGGCCGCCAAGCTGCAGTACGGCATCGAGATCGCAGAGGACGAG
ACAGTGAGCAGCGGACCTAGCGTGGATAATATCCCAGAGTATAAGCCACAGCCCCG
GAAGGACATCACACCCAACCAGGACGTGATCGATGCCCCCCCTCAGCAGCCTAAGC
AGGACGATGAGGCCGCCAAGCTGAAGGCCGCCAGATCTGAGGTGAGCAAGAAGTTC
AAGAAGCTGGGCATCGTGAAGGAGGATCAGACCGAGTACGTGGAGAAGCACGTGC
CTGGCTTCAAGGGCACACTGTCCGACTTTATCGGCCTGTCTCAGCTGCTGGATCTGA
ATATCGAGGCCCAGGAGGCCCAGTCCGCCGACGGCGATCTGCTGGAC

Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｐ． ＭＵＭ １１６ ＲｅｃＥ ＤＮＡ（配列番号１００）：

【化３６】

ACCTACGCCGCCGACGAGACACTGGTGCAGCTGCTGCTGTCCGTGGATGGCAAGCA
GCTGCTGCTGGGAAGGGGCCTGAAGAAGGGCAAGGCCCAGTACTATATCAATGAGG
TGCCATCTAAGGCCAAGGAGTTCGAGGAGATCCGGGACCAGCTGTTTGACAAGGAT
CTGTTCATGTCCCTGTTTAACCCCTCTTACTTCTTTACCCTGCACTGGGAGAAGCAGA
GGGCCATGATGCTGAAGTATGTGACAGCCCCCGTGTCTAAGGAGGTGCTGAAGAAT
CTGCCTGAGGCCCAGTCCGAGGTGCTGGAGAGATACCTGAAGAAGCACTCTCTGGT
GGATCTGGAGAAGATCCACAAGGACAACAAGAATAAGCAGGATAAGGCCTATATCT
CTGCCCAGAGCAGGACCAACACACTGAAGGAGCAGCTGATGCAGCTGACCGAGGA
GAAGCTGGACATCGATTCCATCAAGGCCGAGCTGGCCCACATCGACATGCAGGTCA
TCGAGCTGGAGAAGCAGATGGATACAGCCTTCGAGAAGAACCAGGCCTTTAATCTG
CAGGCCCAGATCAGGAATCTGCAGGACAAGATCGAGATGAGCAAGGAGCGGTGGC
CCTCCCTGAAGAACGAAGTGATCGAGGATACCTGCCGGACATGCAAGCGGCCCCTG
GACGAGGATAGCGTGGAGGCCGTGAAGGCCGACAAGGATAATCGGATCGCCGAGT
ACAAGGCCAAGCACAACTCCCTGGTGTCTCAGAGAAATGAGCTGAAGGAGCAGCTG
AACACCATCGAGTATATCGACGTGACAGAGCTGAGAGAGCAGATCAAGGAGCTGGA
TGAGTCCGGACAGCCTCTGAGGGAGCAGGTGCGCATCTACAGCCAGTATCAGAATC
TGGACACCCAGGTGAAGTCCGCCGAGGCAGACGAGAACGGCATCCTGCAGGATCTG
AAGGCCTCTATCTTCATCCTGGATAGCATCAAGGCCTTTAGGGGCAAGGAGGCCGA
GATGCAGGCCGAGAAGGTGCAGGCCCTGTTCACCACACTGAGCGTGCGCCTGTTTA
AGCAGAATAAGGGCGACGGCGAGATCAAGCCAGATTTCGAGATCGAGATGAACGA
CAAGCCCTATCGGACCCTGAGCCTGTCCGAGGGCATCCGGGCAGGCCTGGAGCTGC
GGGACGTGCTGAGCCAGCAGTCCGAGCTGGTGACCCCTACATTCGTGGATAATGCC
GAGTCTATCACCAGCTTCAAGCAGCCAAACGGCCAGCTGATCATCAGCCGGGTGGT
GGCAGGACAGGAGCTGAAGATCGAGGCCGTGAGCGAG

Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｏｎｎｅｉ ＲｅｃＴ ＤＮＡ（配列番号１０１）：

【化３７】

ACCAAGCAGCCCCCTATCGCCAAGGCCGACCTGCAGAAAACCCAGGAGAACAGGG
CACCAGCAGCCATCAAGAACAATGATGTGATCTCCTTTATCAATCAGCCCTCTATGA
AGGAGCAGCTGGCCGCCGCCCTGCCTAGGCACATGACCGCCGAGAGGATGATCCGC
ATCGCCACCACAGAGATCCGCAAGGTGCCTGCCCTGGGCAACTGCGACACAATGAG
CTTCGTGAGCGCCATCGTGCAGTGTAGCCAGCTGGGCCTGGAGCCAGGCTCCGCCCT
GGGCCACGCCTACCTGCTGCCCTTCGGCAACAAGAATGAGAAGTCCGGCAAGAAGA
ATGTGCAGCTGATCATCGGCTATAGGGGCATGATCGATCTGGCCCGGAGATCTGGC
CAGATCGCCTCTCTGAGCGCCAGAGTGGTGCGGGAGGGCGACGAGTTCAACTTTGA
GTTCGGCCTGGATGAGAAGCTGATCCACCGGCCTGGCGAGAATGAGGACGCCCCAG
TGACCCACGTGTACGCAGTGGCCAGACTGAAGGATGGCGGCACCCAGTTTGAAGTG
ATGACAAGGCGCCAGATCGAGCTGGTGAGGTCCCAGTCTAAGGCCGGCAACAATGG
CCCTTGGGTGACCCACTGGGAGGAGATGGCCAAGAAAACCGCCATCCGGAGACTGT
TCAAGTACCTGCCAGTGTCTATCGAGATCCAGCGCGCCGTGAGCATGGACGAGAAG
GAGCCACTGACCATCGACCCCGCCGATAGCTCCGTGCTGACAGGCGAGTATTCTGT
GATCGATAACAGCGAGGAG

Ｓｈｉｇｅｌｌａ　ｓｏｎｎｅｉ　ＲｅｃＥ　ＤＮＡ（配列番号１０２）：

【化３８】

GATCGCGGCCTGCTGACAAAGGAGTGGAGGAAGGGAAACCGGGTGAGCCGGATCA
CCAGGACAGCCAGCGGAGCAAACGCAGGAGGAGGAAATCTGACCGACAGAGGCGA
GGGCTTCGTGCACGATCTGACAAGCCTGGCCCGCGACATCGCAACCGGCGTGCTGG
CCCGGAGCATGGACGTGGACATCTACAACCTGCACCCTGCCCACGCCAAGAGGATC
GAGGAGATCATCGCCGAGAATAAGCCCCCTTTCAGCGTGTTTAGAGACAAGTTTATC
ACAATGCCAGGCGGCCTGGACTACTCCAGGGCCATCGTGGTGGCCTCTGTGAAGGA
GGCCCCAATCGGCATCGAAGTGATCCCCGCCCACGTGACCGCCTATCTGAACAAGG
TGCTGACCGAGACAGACCACGCCAATCCAGATCCCGAGATCGTGGACATCGCATGC
GGCAGAAGCTCCGCCCCTATGCCACAGAGGGTGACCGAGGAGGGCAAGCAGGACG
ATGAGGAGAAGCTGCAGCCTTCTGGCACCACAGCAGATGAGCAGGGAGAGGCAGA
GACAATGGAGCCAGACGCCACAAAGCACCACCAGGATACCCAGCCTCTGGACGCCC
AGAGCCAGGTGAACAGCGTGGATGCCAAGTATCAGGAGCTGAGAGCCGAGCTGCAC
GAGGCCAGGAAGAACATCCCTTCCAAGAATCCAGTGGACGCAGATAAGCTGCTGGC
CGCCTCTCGCGGCGAGTTCGTGGACGGCATCAGCGACCCAAACGATCCCAAGTGGG
TGAAGGGCATCCAGACACGGGATTCCGTGTACCAGAATCAGCCTGAGACAGAGAAA
ACCAGCCCCGACATGAAGCAGCCAGAGCCTGTGGTGCAGCAGGAGCCTGAGATCGC
CTTCAACGCCTGCGGACAGACCGGCGGCGACAATTGCCCAGATTGTGGCGCCGTGA
TGGGCGATGCCACCTATCAGGAGACATTTGACGAGGAGAACCAGGTGGAGGCCAAG
GAGAATGATCCTGAGGAGATGGAGGGCGCCGAGCACCCACACAACGAGAATGCCG
GCAGCGACCCCCACAGAGACTGTTCCGATGAGACAGGCGAGGTGGCCGATCCCGTG
ATCGTGGAGGACATCGAGCCTGGCATCTACTATGGCATCAGCAACGAGAATTACCA
CGCAGGCCCCGGCGTGTCCAAGTCTCAGCTGGACGACATCGCCGACACACCTGCCCT
GTATCTGTGGAGGAAGAACGCCCCAGTGGATACCACAAAGACCAAGACACTGGACC
TGGGCACCGCATTCCACTGCCGCGTGCTGGAGCCAGAGGAGTTCAGCAATCGGTTTA
TCGTGGCCCCCGAGTTCAACCGGAGAACAAATGCCGGCAAGGAGGAGGAGAAGGC
CTTTCTGATGGAGTGTGCCTCCACAGGCAAGATGGTCATCACCGCCGAGGAGGGCA
GAAAGATCGAGCTGATGTACCAGTCTGTGATGGCACTGCCACTGGGACAGTGGCTG
GTGGAGAGCGCCGGACACGCAGAGTCTAGCATCTATTGGGAGGACCCCGAGACAGG
CATCCTGTGCAGGTGTCGCCCCGACAAGATCATCCCTGAGTTCCACTGGATCATGGA
CGTGAAAACCACAGCCGACATCCAGCGGTTCAAGACAGCCTACTATGATTACAGGT
ATCACGTGCAGGATGCCTTCTACTCCGACGGCTATGAGGCCCAGTTTGGCGTGCAGC
CCACCTTCGTGTTTCTGGTGGCCTCTACCACAATCGAGTGCGGCAGATACCCCGTGG
AGATCTTTATGATGGGAGAGGAGGCAAAGCTGGCCGGACAGCTGGAGTATCACCGC
AACCTGCGGACACTGGCCGATTGTCTGAATACCGACGAGTGGCCAGCCATCAAGAC
CCTGTCCCTGCCCAGATGGGCAAAGGAGTACGCCAACGAC

Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｅｎｔｅｒｉｃａ　ＲｅｃＴ　ＤＮＡ（配列番号１０３）：

【化３９】

ACCAAGCAGCCCCCTATCGCCAAGGCCGACCTGCAGAAAACCCAGGGAAACAGGGC
ACCTGCAGCAGTGAATGACAAGGATGTGCTGTGCGTGATCAACAGCCCTGCCATGA
AGGCACAGCTGGCCGCCGCCCTGCCAAGGCACATGACCGCCGAGAGGATGATCCGC
ATCGCCACCACAGAGATCAGGAAGGTGCCAGAGCTGCGCAACTGCGACAGCACCAG
CTTCATCGGCGCCATCGTGCAGTGTTCTCAGCTGGGCCTGGAGCCCGGCAGCGCCCT
GGGCCACGCCTACCTGCTGCCTTTTGGCAATGGCAAGGCCAAGAACGGCAAGAAGA
ATGTGCAGCTGATCATCGGCTATCGGGGCATGATCGATCTGGCCCGGAGATCTGGCC
AGATCATCTCCCTGAGCGCCAGAGTGGTGCGGGAGTGTGACGAGTTCTCCTACGAGC
TGGGCCTGGATGAGAAGCTGGTGCACCGGCCAGGCGAGAACGAGGACGCACCCATC
ACCCACGTGTATGCCGTGGCCAAGCTGAAGGATGGCGGCGTGCAGTTTGAAGTGAT
GACCAAGAAGCAGGTGGAGAAGGTGAGAGATACACACTCCAAGGCCGCCAAGAAT
GCCGCCTCTAAGGGCGCCAGCTCCATCTGGGACGAGCACTTCGAGGATATGGCCAA
GAAAACCGTGATCCGGAAGCTGTTTAAGTACCTGCCCGTGAGCATCGAGATCCAGA
GAGCCGTGAGCATGGACGGCAAGGAGGTGGAGACAATCAACCCAGACGACATCAG
CGTGATCGCCGGCGAGTATTCCGTGATCGATAATCCCGAGGAG

Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｅｎｔｅｒｉｃａ　ＲｅｃＥ　ＤＮＡ（配列番号１０４）：

【化４０】

GATCGCGGCCTGCTGACAAAGGAGTGGAGGAAGGGAAACCGGGTGAGCCGGATCA
CCAGGACAGCCAGCGGAGCAAACGCAGGAGGAGGAAATCTGACCGACAGAGGCGA
GGGCTTCGTGCACGATCTGACAAGCCTGGCCCGCGACGTGGCAACCGGCGTGCTGG
CCCGGAGCATGGACGTGGACATCTACAACCTGCACCCTGCCCACGCCAAGAGGGTG
GAGGAGATCATCGCCGAGAATAAGCCCCCTTTCAGCGTGTTTAGAGACAAGTTTATC
ACAATGCCTGGCGGCCTGGACTACTCCAGGGCCATCGTGGTGGCCTCTGTGAAGGA
GGCCCCTATCGGCATCGAAGTGATCCCAGCCCACGTGACCGAGTATCTGAACAAGG
TGCTGACCGAGACAGACCACGCCAATCCAGATCCCGAGATCGTGGACATCGCATGC
GGCAGAAGCTCCGCCCCTATGCCACAGAGGGTGACCGAGGAGGGCAAGCAGGACG
ATGAGGAGAAGCCCCAGCCTTCTGGAGCTATGGCCGACGAGCAGGCAACCGCAGAG
ACAGTGGAGCCAAACGCCACAGAGCACCACCAGAATACCCAGCCCCTGGATGCCCA
GAGCCAGGTGAACTCCGTGGACGCCAAGTATCAGGAGCTGAGAGCCGAGCTGCAGG
AGGCCAGGAAGAACATCCCCTCCAAGAATCCTGTGGACGCAGATAAGCTGCTGGCC
GCCTCTCGCGGCGAGTTCGTGGATGGCATCAGCGACCCTAACGATCCAAAGTGGGT
GAAGGGCATCCAGACACGGGATTCCGTGTACCAGAATCAGCCCGAGACAGAGAAG
ATCTCTCCTGACGCCAAGCAGCCAGAGCCCGTGGTGCAGCAGGAGCCCGAGACAGT
GTGCAACGCCTGTGGACAGACCGGCGGCGACAATTGCCCTGATTGTGGCGCCGTGA
TGGGCGACGCCACATATCAGGAGACATTCGGCGAGGAGAATCAGGTGGAGGCCAAG
GAGAAGGACCCCGAGGAGATGGAGGGAGCAGAGCACCCTCACAACGAGAATGCCG
GCAGCGACCCACACAGAGACTGTTCCGATGAGACAGGCGAGGTGGCCGATCCAGTG
ATCGTGGAGGACATCGAGCCTGGCATCTACTATGGCATCAGCAACGAGAATTACCA
CGCAGGCCCCGGCGTGTCCAAGTCTCAGCTGGACGACATCGCCGACACACCCGCCC
TGTATCTGTGGAGGAAGAACGCCCCTGTGGATACCACAAAGACCAAGACACTGGAC
CTGGGCACCGCATTCCACTGCCGCGTGCTGGAGCCTGAGGAGTTCAGCAATCGGTTT
ATCGTGGCCCCAGAGTTCAACCGGAGAACAAATGCCGGCAAGGAGGAGGAGAAGG
CCTTTCTGATGGAGTGTGCCTCCACCGGCAAGACAGTGATCACCGCCGAGGAGGGC
AGAAAGATCGAGCTGATGTACCAGTCTGTGATGGCACTGCCTCTGGGACAGTGGCT
GGTGGAGAGCGCCGGACACGCAGAGTCTAGCATCTATTGGGAGGACCCCGAGACAG
GCATCCTGTGCAGGTGTCGCCCAGACAAGATCATCCCCGAGTTCCACTGGATCATGG
ACGTGAAAACCACAGCCGACATCCAGCGGTTCAAGACAGCCTACTATGATTACAGG
TATCACGTGCAGGATGCCTTCTACTCCGACGGCTATGAGGCCCAGTTTGGCGTGCAG
CCAACCTTCGTGTTTCTGGTGGCCTCTACCACAGTGGAGTGCGGCAGATACCCCGTG
GAGATCTTTATGATGGGAGAGGAGGCAAAGCTGGCCGGACAGCAGGAGTATCACCG
CAACCTGCGGACACTGGCCGATTGTCTGAATACCGACGAGTGGCCTGCCATCAAGA
CCCTGTCCCTGCCACGGTGGGCCAAGGAGTACGCCAACGAC

Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ　ＲｅｃＴ　ＤＮＡ（配列番号１０５）：

【化４１】

AACGCCCCCCAGAAGCAGAATACCAGAGCCGCCGTGAAGAAGATCAGCCCTCAGGA
GTTCGCCGAGCAGTTTGCCGCCATCATCCCACAGGTGAAGTCCGTGCTGCCCGCCCA
CGTGACCTTCGAGAAGTTTGAGCGGGTGGTGAGACTGGCCGTGCGGAAGAACCCTG
ACCTGCTGACATGCTCCCCAGCCTCTCTGTTCATGGCATGTATCCAGGCAGCCTCCG
ACGGCCTGCTGCCTGATGGAAGGGAGGGAGCAATCGTGAGCCGGTGGAGCTCCAAG
AAGAGCTGCAACGAGGCCTCCTGGATGCCAATGGTGGCCGGCCTGATGAAGCTGGC
CCGGAACAGCGGCGACATCGCCAGCATCTCTAGCCAGGTGGTGTTCGAGGGCGAGC
ACTTTAGAGTGGTGCTGGGCGACGAGGAGAGGATCGAGCACGAGCGCGATCTGGGC
AAGACCGGCGGCAAGATCGTGGCAGCCTACGCCGTGGCAAGGCTGAAGGACGGCA
GCGATCCAATCCGCGAGATCATGTCCTGGGGCCAGATCGAGAAGATCAGAAACACA
AATAAGAAGTGGGAGTGGGGACCCTGGAAGGCCTGGGAGGACGAGATGGCCAGAA
AGACCGTGATCCGGAGACTGGCCAAGAGACTGCCCATGTCTACAGATAAGGAGGGA
GAGAGGCTGCGCAGCGCCATCGAGAGGATCGACTCCCTGGTGGACATCTCTGCCAA
CGTGGACGCACCTCAGATCGCAGCAGACGATGAGTTTGCCGCCGCCGCCCACGGCG
TGGAGCCACAGCAGATCGCAGCACCTGACCTGATCGGCCGCCTGGCCCAGATGCAG
TCCCTGGAGCAGGTGCAGGACATCGAGCCCCAGGTGTCTCACGCCATCCAGGAGGC
CGACAAGAGGGGCGACAGCGATACAGCCAATGCCCTGGATGCCGCCCTGCAGAGCG
CCCTGTCCCGCACCTCTACAGCCAAGGAGGAGGTGCCTGCC

Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ　ＲｅｃＥ　ＤＮＡ（配列番号１０６）：

【化４２】

GTGATCTCTAAGAGCGGCATCTACGACCTGACCAACGAGCAGTATCACGCCGATCCT
TGCCCAGAGATGTCCCTGAGCTCCTCTGGAGCCAGGGACCTGCTGAGCTCCTGTCCT
GCCAAGTTCATCGCCGCCAAGCAGCTGCCACAGCAGAATAAGAGGTGCTTTGACAT
CGGCTCTGCCGGACACCTGATGGTGCTGGAGCCACACCTGTTCGACCAGAAGGTGT
GCGAGATCAAGCACCCTGATTGGCGCACAAAGGCAGCAAAGGAGGAGCGGGACGC
CGCCTACGCCGAGGGAAGAATCCCCCTGCTGAGCCGCGAGGTGGAGGACATCAGGG
CAATGCACTCCGTGGTGTGGAGAGATTCTCTGGGAGCCAGGGCCTTCAGCGGAGGC
AAGGCAGAGCAGTCCCTGGTGTGGCGCGACGAGGAGTTTGGCATCTGGTGCCGGCT
GCGGCCCGATTACGTGCCTAACAATGCCGTGCGGATCTTCGACTATAAGACCGCCAC
AAACGGCTCCCCCGATGCCTTTATGAAGGAGATCTACAATCGGGGCTATCACCAGC
AGGCCGCCTGGTATCTGGACGGATATGAGGCAGTGACCGGCCACAGGCCACGCGAG
TTCTGGTTTGTGGTGCAGGAGAAAACCGCCCCCTTCCTGCTGTCTTTCTTTCAGATGG
ATGAGATGAGCCTGGAGATCGGCCGGACCCTGAACAGACAGGCCAAGGGCATCTTT
GCCTGGTGCCTGCGCAACAATTGTTGGCCAGGCTATCAGCCCGAGGTGGATGGCAA
GGTGAGATTCTTTACCACATCTCCCCCTGCCTGGCTGGTGAGGGAGTACGAGTTTAA
GAATGAGCACGGCGCCTATGAGCCACCCGAGATCAAGCGGAAGGAGGTGGCC

Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｅｎｔｅｒｉｃａ　ｓｕｂｓｐ．　ｅｎｔｅｒｉｃａ　ｓｅｒｏ　ｖａｒ　Ｊａｖｉａｎａ　ｓｔｒ．　１０７２１　ＲｅｃＴ　ＤＮＡ（配列番号１０７）：

【化４３】

CCAAAGCAGCCCCCTATCGCCAAGGCAGACCTGCAGAAAACCCAGGGAGCACGGAC
CCCAACAGCAGTGAAGAACAATAACGATGTGATCTCCTTTATCAATCAGCCTTCTAT
GAAGGAGCAGCTGGCCGCCGCCCTGCCAAGGCACATGACCGCCGAGCGGATGATCA
GAATCGCCACCACAGAGATCAGGAAGGTGCCCGCCCTGGGCGACTGCGATACAATG
TCTTTTGTGAGCGCCATCGTGCAGTGTAGCCAGCTGGGCCTGGAGCCTGGCGGCGCC
CTGGGCCACGCCTACCTGCTGCCTTTCGGCAATCGGAACGAGAAGTCCGGCAAGAA
GAATGTGCAGCTGATCATCGGCTATAGAGGCATGATCGACCTGGCCCGGAGATCCG
GACAGATCGCCAGCCTGTCCGCCAGGGTGGTGCGCGAGGGCGACGATTTCTCTTTTG
AGTTCGGCCTGGAGGAGAAGCTGGTGCACAGGCCAGGCGAGAACGAGGACGCCCC
CGTGACCCACGTGTACGCAGTGGCACGCCTGAAGGATGGAGGCACCCAGTTTGAAG
TGATGACACGGAAGCAGATCGAGCTGGTGAGAGCCCAGTCTAAGGCCGGCAATAAC
GGCCCTTGGGTGACCCACTGGGAGGAGATGGCCAAGAAAACCGCCATCAGGCGCCT
GTTCAAGTACCTGCCCGTGAGCATCGAGATCCAGAGGGCCGTGAGCATGGATGAGA
AGGAGACACTGACAATCGACCCAGCCGATGCCAGCGTGATCACCGGCGAGTATTCC
GTGGTGGAGAATGCCGGCGTGGAGGAGAACGTGACAGCC

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Javiana str. 10721 RecE DNA（配列番号１０８）：

【化４４】

TACTATGACATCCCAAACGAGGCCTACCACGCAGGCCCCGGCGTGTCTAAGAGCCA
GCTGGACGACATCGCCGATACCCCCGCCATCTATCTGTGGCGGAAGAATGCCCCTGT
GGACACCGAGAAAACCAAGTCCCTGGATACCGGCACAGCCTTCCACTGCAGGGTGC
TGGAGCCAGAGGAGTTCAGCAAGCGGTTCATCATCGCCCCCGAGTTCAACCGGAGA
ACCTCCGCCGGCAAGGAGGAGGAGAAAACCTTCCTGGAGGAGTGTACCCGGACAG
GCAGAACCGTGCTGACAGCCGAGGAGGGCAGGAAGATCGAGCTGATGTACCAGTC
CGTGATGGCACTGCCACTGGGACAGTGGCTGGTGGAGTCTGCCGGCTACGCCGAGA
GCTCCGTGTATTGGGAGGACCCTGAGACAGGCATCCTGTGCCGGTGTAGACCCGAT
AAGATCATCCCTGAGTTCCACTGGATCATGGACGTGAAAACCACAGCCGACATCCA
GAGGTTTCGCACCGCCTACTATGACTACAGATACCACGTGCAGGACGCCTTCTACTC
TGATGGCTATAGAGCCCAGTTTGGCGAGATCCCTACATTCGTGTTTCTGGTGGCCAG
CACCACAGCAGAGTGCGGCAGATACCCCGTGGAGATCTTTATGATGGGAGAGGACG
CAAAGCTGGCCGGACAGCGCGAGTATAGGCGCAATCTGCAGACCCTGGCCGAGTGT
CTGAACAATGATGAGTGGCCTGCCATCAAGACACTGTCTCTGCCACGGTGGGCCAA
GGAGAACGCCAATGCC

Pseudobacteriovorax antillogorgiicola RecT DNA（配列番号１０９）：

【化４５】

GGCCACCTGGTGAGCAAGACCGAGCAGGATTACATCAAGCAGCACTATGCCAAGGG
CGCCACAGACCAGGAGTTCGAGCACTTTATCGGCGTGTGCAGGGCCAGAGGCCTGA
ACCCAGCCGCCAATCAGATCTACTTCGTGAAGTATCGGTCCAAGGATGGACCAGCA
AAGCCAGCCTTTATCCTGTCTATCGACAGCCTGAGGCTGATCGCACACCGCACCGGC
GATTACGCAGGATGCTCTGAGCCCATCTTCACAGACGGCGGCAAGGCCTGTACCGT
GACAGTGCGGAGAAACCTGAAGAGCGGCGAGACAGGCAATTTCTCCGGCATGGCCT
TTTATGACGAGCAGGTGCAGCAGAAGAACGGCCGGCCTACCTCCTTTTGGCAGTCTA
AGCCAAGAACAATGCTGGAGAAGTGTGCAGAGGCAAAGGCCCTGAGGAAGGCCTTC
CCTCAGGATCTGGGCCAGTTTTACATCAGAGAGGAGATGCCCCCTCAGTATGACGAG
CCTATCCAGGTGCACAAGCCAAAGGCCCTGGAGGAGCCCAGGTTCAGCAAGTCCGA
TCTGTCCAGGCGCAAGGGCCTGAACAGGAAGCTGTCTGCCCTGGGAGTGGACCCCA
GCCGCTTCGATGAGGTGGCCACCTTTCTGGACGGCACACCTGATCGCGAGCTGGGCC
AGAAGCTGAAGCTGTGGCTGAAGGAGGCCGGCTACGGCGTGAATCAG

cE DNA（配列番号１１０）：

【化４６】

AGCAAGCTGTCCAACCTGAAGGTGTCTAATAGCGACGTGGATACACTGAGCCGGAT
CAGAATGAAGGAGGGCGTGTATCGGGACCTGCCAATCGAGAGCTACCACCAGTCCC
CCGGCTATTCTAAGACCAGCCTGTGCCAGATCGATAAGGCCCCTATCTACCTGAAAA
CCAAGGTGCCACAGAAGTCCACAAAGTCTCTGAACATCGGCACCGCCTTCCACGAG
GCTATGGAGGGCGTGTTTAAGGACAAGTATGTGGTGCACCCCGATCCTGGCGTGAAT
AAGACCACAAAGTCTTGGAAGGACTTCGTGAAGAGGTATCCTAAGCACATGCCACT
GAAGCGCAGCGAGTACGACCAGGTGCTGGCCATGTACGATGCCGCCCGGTCTTATA
GACCTTTTCAGAAGTACCACCTGAGCCGGGGCTTCTACGAGAGCTCCTTTTATTGGC
ACGATGCCGTGACAAACAGCCTGATCAAGTGCAGACCCGACTATATCACCCCTGAT
GGCATGAGCGTGATCGACTTCAAGACCACAGTGGACCCCAGCCCCAAGGGCTTTCA
GTACCAGGCCTACAAGTATCACTACTACGTGAGCGCCGCCCTGACCCTGGAGGGAA
TCGAGGCAGTGACCGGCATCAGGCCAAAGGAGTACCTGTTCCTGGCCGTGTCCAATT
CTGCCCCATACCTGACCGCCCTGTATCGCGCCTCTGAGAAGGAGATCGCCCTGGGCG
ACCACTTTATCCGGCGGAGCCTGCTGACCCTGAAAACCTGTCTGGAGTCTGGCAAGT
GGCCCGGCCTGCAGGAGGAGATCCTGGAGCTGGGCCTGCCTTTCTCCGGCCTGAAG
GAGCTGAGAGAGGAGCAGGAGGTGGAGGATGAGTTTATGGAGCTGGTGGGC

Photobacterium sp. JCM 19050 RecT DNA（配列番号１１１）：

【化４７】

AACACCGACATGATCGCCATGCCCCCTTCTCCAGCCATCAGCATGCTGGACACAAGC
AAGCTGGATGTGATGGTGCGGGCAGCAGAGCTGATGTCCCAGGCCGTGGTCATGGT
GCCCGACCACTTCAAGGGCAAGCCAGCCGATTGCCTGGCAGTGGTCATGCAGGCAG
ACCAGTGGGGCATGAACCCCTTTACCGTGGCCCAGAAAACCCACCTGGTGAGCGGC
ACCCTGGGATACGAGTCCCAGCTGGTGAATGCCGTGATCAGCTCCTCTAAGGCCATC
AAGGGCCGGTTCCACTATGAGTGGTCTGATGGCTGGGAGAGACTGGCCGGCAAGGT
GCAGTACGTGAAGGAGTCTCGGCAGAGAAAGGGCCAGCAGGGCAGCTATCAGGTG
ACCGTGGCCAAGCCAACATGGAAGCCAGAGGACGAGCAGGGCCTGTGGGTGCGGT
GTGGAGCCGTGCTGGCCGGAGAGAAGGACATCACATGGGGCCCTAAGCTGTACCTG
GCCAGCGTGCTGGTGCGGAACAGCGAGCTGTGGACCACAAAGCCCTACCAGCAGGC
CGCCTATACCGCCCTGAAGGATTGGTCCCGCCTGTATACACCTGCCGTGATGCAGGG
CTCTATGACCGGCAAGAGCTGGTCCCTGACAGGCAGGCTGATCAGCCCCCGC

Photobacterium sp. JCM 19050 RecE DNA（配列番号１１２）：

【化４８】

GCCGAGCGGGTGAGAACCTATCAGCGGGACGCCGTGTTCGCACACGAGCTGAAGGC
CGAGTTTGATGAGGCCGTGGAGAACGGCAAGACCGGCGTGACACTGGAGGACCAGG
CCAGGGCCAAGAGGATGGTGCACGAGGCCACCACAAACCCCGCCTCTCGGAATTGG
TTCAGATACGACGGAGAGCTGGCCGCATGCGAGAGGAGCTATTTTTGGCGCGATGA
GGAGGCAGGCCTGGTGCTGAAGGCCAGGCCTGACAAGGAGATCGGCAACAATCTGA
TCGATGTGAAGTCCATCGAGGTGCCAACCGACGTGTGCGCCTGTGATCTGAACGCCT
ATATCAATCGGCAGATCGAGAAGAGAGGCTACCACATCTCCGCCGCCCACTATCTGT
CTGGCACAGGCAAGGACCGCTTCTTTTGGATCTTCATCAATAAGGTGAAGGGCTACG
AGTGGGTGGCAATCGTGGAGGCCTCTCCCCTGCACATCGAGCTGGGCACCTATGAG
GTGCTGGAGGGCCTGCGGAGCATCGCCAGCTCCACAAAGGAGGCAGATTACCCAGC
ACCTCTGTCCCACCCTGTGAACGAGAGAGGCATCCCACAGCCCCTGATGTCTAATCT
GAGCACATACGCCATGAAGAGGCTGGAGCAGTTTCGCGAGCTG

Providencia alcalifaciens DSM 30120 RecT DNA（配列番号１１３）：

【化４９】

AAGGCACAGCTGGCCGCCGCCCTGCCTAAGCACATCACCAGCGACCGGATGATCAG
AATCGTGTCCACCGAGATCAGAAAGACCCCATCTCTGGCCAACTGCGACATCCAGA
GCTTCATCGGCGCCGTGGTGCAGTGTTCTCAGCTGGGCCTGGAGCCAGGCAACGCCC
TGGGACACGCCTACCTGCTGCCCTTTGGCAATGGCAAGTCCGACAACGGCAAGTCTA
ATGTGCAGCTGATCATCGGCTATCGGGGCATGATCGATCTGGCCCGGAGAAGCGGC
CAGATCATCTCTATCAGCGCCAGGACCGTGCGCCAGGGCGACAACTTCCACTTTGAG
TACGGCCTGAACGAGAATCTGACCCACATCCCCGAGGGCAATGAGGACTCCCCTAT
CACACACGTGTACGCAGTGGCACGGCTGAAGGATGAGGGCGTGCAGTTCGAAGTGA
TGACATATAACCAGATCGAGAAGGTGAGAGATAGCTCCAAGGCCGGCAAGAATGGC
CCCTGGGTGACCCACTGGGAGGAGATGGCCAAGAAAACCGTGATCAGGCGCCTGTT
TAAGTACCTGCCCGTGAGCATCGAGATGCAGAAGGCCGTGATCCTGGACGAGAAGG
CCGAGGCCAATATCGAGCAGGATCACTCCGCCATCTTCGAGGCCGAGTTTGAGGAG
GTGGACTCTAACGGCAAT

Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ａｌｃａｌｉｆａｃｉｅｎｓ ＤＳＭ ３０１２０ ＲｅｃＥ ＤＮＡ（配列番号１１４）：

【化５０】

AACGAGGGCATCTACTATGACATCTCTAATGAGGACTATCACCACGGCCTGGGCATC
TCTAAGAGCCAGCTGGATCTGATCGACGAGAGCCCCGCCGATTTCATCTGGCACCGG
GATGCCCCCTGTGGACAACGAGAAAACCAAGGCCCTGGATTTTGGCACAGCCCTGCA
CTGCCTGCTGCTGGAGCCAGACGAGTTCCAGAAGAGGTTTCGCATCGCCCCCGAGGT
GAACCGGAGAACAAATGCCGGCAAGGAGCAGGAGAAGGAGTTCCTGGAGATGTGC
GAGAAGGAGAATATCACCCCCATCACAAACGAGGATAATAGGAAGCTGTCTCTGAT
GAAGGACAGCGCAATGGCCCACCCTATCGCCCGCTGGTGTCTGGAGGCCAAGGGCA
TCGCCGAGAGCTCCATCTATTGGAAGGACAAGGATACAGACATCCTGTGCCGGTGT
AGACCAGACAAGCTGATCGAGGAGCACCACTGGCTGGTGGATGTGAAGTCCACCGC
CGACATCCAGAAGTTCGAGCGGTCTATGTACGAGTATAGATACCACGTGCAGGATTC
CTTTTATTCTGACGGCTACAAGAGCCTGACAGGCGAGATGCCCGTGTTCGTGTTCCT
GGCCGTGTCCACCGTGATCAACTGCGGCAGATACCCCGTGCGGGTGTTCGTGCTGGA
CGAGCAGGCAAAGTCCGTGGGACGGATCACCTATAAGCAGAATCTGTTTACATACG
CCGAGTGTCTGAAAACCGACGAGTGGGCCGGCATCAGAACCCTGAGCCTGCCCTCC
TGGGCAAAGGAGCTGAAGCACGAGCACACCACAGCCTCT

Ｐａｎｔｏｅａ ｓｔｅｗａｒｔｉｉ ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１１５）：

【化５１】

MSNQPPIASADLQKANTGKQVANKTPEQTLVGFMNQPAMKSQLAAALPRHMTADRMI
RIVTTEIRKTPALATCDQSSFIGAVVQCSQLGLEPGSALGHAYLLPFGNGRSKSGQSNVQ
LIIGYRGMIDLARRSGQIVSLSARVVRADDEFSFEYGLDENLIHRPGENEDAPITHVYAV
ARLKDGGTQFEVMTVKQIEKVKAQSKASSNGPWVTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIE
MQKAVILDEKAESDVDQDNASVLSAEYSVLDGSSEE

Ｐａｎｔｏｅａ ｓｔｅｗａｒｔｉｉ ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１１６）：

【化５２】

MQPGVYYDISNEEYHAGPGISKSQLDDIAVSPAIFQWRKSAPVDDEKTAALDLGTALHC
LLLEPDEFSKRFMIGPEVNRRTNAGKQKEQDFLDMCEQQGITPITHDDNRKLRLMRDSA
FAHPVARWMLETEGKAEASIYWNDRDTQILSRCRPDKLITEFSWCVDVKSTADIGKFQK
DFYSYRYHVQDAFYSDGYEAQFCEVPTFAFLVVSSSIDCGRYPVQVFIMDQQAKDAGR
AEYKRNLTTYAECQARNEWPGIATLSLPYWAKEIRNV

Ｐａｎｔｏｅａ ｂｒｅｎｎｅｒｉ ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１１７）：

【化５３】

MSNQPPIASADLQKTQQSKQVANKTPEQTLVGFMNQPAMKSQLAAALPRHMTADRMI
RIVTTEIRKTPQLAQCDQSSFIGAVVQCSQLGLEPGSALGHAYLLPFGNGRSKSGQSNVQ
LIIGYRGMIDLARRSGQIVSLSARVVRADDEFSFEYGLDENLVHRPGENEDAPITHVYAV
ARLKDGGTQFEVMTVKQVEKVKAQSKASSNGPWVTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSI
EMQKAVVLDEKAESDVDQDNASVLSAEYSVLESGDEATN

Ｐａｎｔｏｅａ　ｂｒｅｎｎｅｒｉ　ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１１８）：

【化５４】

MQPGIYYDISNEDYHRGAGISKSQLDDIAISPAIYQWRKHAPVDEEKTAALDLGTALHCL
LLEPDEFSKRFQIGPEVNRRTTAGKEKEKEFIERCEAEGITPITHDDNRKLKLMRDSALAH
PIARWMLEAQGNAEASIYWNDRDAGVLSRCRPDKIITEFNWCVDVKSTADIMKFQKDF
YSYRYHVQDAFYSDGYESHFHETPTFAFLAVSTSIDCGRYPVQVFIMDQQAKDAGRAE
YKRNIHTFAECLSRNEWPGIATLSLPFWAKELRNE

Ｐａｎｔｏｅａ　ｄｉｓｐｅｒｓａ　ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１１９）：

【化５５】

MSNQPPLATADLQKTQQSNQVAKTPEQTLVGFMNQPAMKSQLAAALPRHMTADRMIR
IVTTEIRKTPALAQCDQSSFIGAVVQCSQLGLEPGSALGHAYLLPFGNGRSKSGQSNVQLI
IGYRGMIDLARRSGQIVSLSARVVRADDEFSFEYGLDENLIHRPGDNESAPITHVYAVAR
LKDGGTQFEVMTAKQVEKVKAQSKASSNGPWVTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEM
QKAVVLDEKAESDVDQDNASVLSAEYSVLESGTGE

Ｐａｎｔｏｅａ　ｄｉｓｐｅｒｓａ　ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１２０）：

【化５６】

MEPGIYYDISNEAYHSGPGISKSQLDDIARSPAIFQWRKDAPVDTEKTKALDLGTDFHCA
VLEPERFADMYRVGPEVNRRTTAGKAEEKEFFEKCEKDGAVPITHDDARKVELMRGSV
MAHPIAKQMIAAQGHAEASIYWHDESTGNLCRCRPDKFIPDWNWIVDVKTTADMKKFR
REFYDLRYHVQDAFYTDGYAAQFGERPTFVFVVTSTTIDCGRYPTEVFFLDEETKAAGR
SEYQSNLVTYSECLSRNEWPGIATLSLPHWAKELRNV

Ｐｌａｕｔｉａ　ｓｔａｌｉのＦ型共生体ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１２１）：

【化５７】

MSNQPPIASADLQKTQQSKQVANKTPEQTLVGFMNQPAMKSQLAAALPRHMTADRMI
RIVTTEIRKTPALATCDQSSFIGAVVQCSQLGLEPGSALGHAYLLPFGNGRSKSGQSNVQ
LIIGYRGMIDLARRSGQIVSLSARVVRADDEFSFEYGLDENLIHRPGDNEDAPITHVYAV
ARLKDGGTQFEVMTAKQVEKVKAQSKASSNGPWVTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSI
EMQKAVVLDEKAESDVDQDNASVLSAEYSVLEGDGGE

Ｐｌａｕｔｉａ　ｓｔａｌｉのＦ型共生体ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１２２）：

【化５８】

MQPGIYYDISNEDYHGGPGISKSQLDDIAISPAIYQWRKHAPVDEEKTAALDLGTALHCL
LLEPDEFSKRFEIGPEVNRRTTAGKEKEKEFMERCEAEGVTPITHDDNRKLRLMRDSAM
AHPIARWMLEAQGNAEASIYWNDRDTGVLSRCRPDKIITDFNWCVDVKSTADIIKFQKD
FYSYRYHVQDAFYSDGYESHFDETPTFAFLAVSTSIDCGRYPVQVFIMDQQAKDAGRAE
YKRNIHTFAECLSRNEWPGIATLSLPYWAKELRNE

Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ　ｓｔｕａｒｔｉｉ　ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１２３）：

【化５９】
MSNPPLAQADLQKTQGTEVKEKTKDQMLVELINKPSMKAQLAAALPRHMTPDRMIRIV
TTEIRKTPALATCDMQSFVGAVVQCSQLGLEPGNALGHAYLLPFGNGKSKSGQSNVQLI
IGYRGMIDLARRSGQIVSISARTVRQGDNFHFEYGLNENLTHVPGENEDSPITHVYAVAR
LKDGGVQFEVMTYNQIEKVRASSKAGQNGPWVSHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEM
QKAVILDEKAEANIDQENATIFEGEYEEVGTDGK

Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ｓｔｕａｒｔｉｉ ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１２４）：
【化６０】
EGIYYNISNEDYHNGLGISKSQLDLINEMPAEYIWSKEAPVDEEKIKPLEIGTALHCLLLE
PDEYHKRYKIGPDVNRRTNAGKEKEKEFFDMCEKEGITPITHDDNRKLMIMRDSALAHP
IAKWCLEADGVSESSIYWTDKETDVLCRCRPDRIITAHNYIVDVKSSGDIEKFDYEYYNY
RYHVQDAFYSDGYKEVTGITPTFLFLVVSTKIDCGKYPVRTYVMSEEAKSAGRTAYKH
NLLTYAECLKTDEWAGIRTLSLPRWAKELRNE

Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ｓｐ． ＭＧＦ０１４ ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１２５）：
【化６１】
MSNPPLAQSDLQKTQGTEVKVKTKDQQLIQFINQPSMKAQLAAALPRHMTPDRMIRIVT
TEIRKTPALATCDMQSFVGAVVQCSQLGLEPGNALGHAYLLPFGNGKAKSGQSNVQLI
GYRGMIDLARRSNQIISISARTVRQGDNFHFEYGLNEDLTHTPSENEDSPITHVYAVARL
KDGGVQFEVMTYNQVEKVRASSKAGQNGPWVSHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQ
KAVVLDEKAEANVDQENATIFEGEYEEVGTDGN

Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ｓｐ． ＭＧＦ０１４ ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１２６）：
【化６２】
MKEGIYYNISNEDYHNGLGISKSQLDLINEMPAEYIWSKEAPVDEEKIKPLEIGTALHCLL
LEPDEYHKRYKIGPDVNRRTNVGKEKEKEFFDMCEKEGITPITHDDNRKLMIMRDSALA
IIPIAKWCLEADGVSESSIYWTDKETDVLCRCRPDRIITAHNYIIDVKSSGDIEKFDYEYYN
YRYHVQDAFYSDGYKEVTGITPTFLFLVVSTKIDCGKYPVRTYVMSEEAKSAGRTAYK
HNLLTYAECLKTDEWAGIRTLSLPRWAKELRNE

Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ ｐｕｔｒｅｆａｃｉｅｎｓ ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１２７）：
【化６３】
MQTAQVKLSVPHQQVYQDNFNYLSSQVVGHLVDLNEEIGYLNQIVFNSLSTASPLDVA
APWSVYGLLLNVCRLGLSLNPEKKLAYVMPSWSETGEIIMKLYPGYRGEIAIASNFNVIK
NANAVLVYENDHFRIQAATGEIEHFVTSLSIDPRVRGACSGGYCRSVLMDNTIQISYLSIE
EMNAIAQNQIEANMGNTPWNSIWRTEMNRVALYRRAAKDWRQLIKATPEIQSALSDTE
Y

Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ ｐｕｔｒｅｆａｃｉｅｎｓ ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１２８）：
【化６４】
MGTALAQTISLDWQDTIQPAYTASGKPNFLNAQGEIVEGIYTDLPNSVYHALDAHSSTGI
KTFAKGRHIHYFRQYLSDVCRQRTKQQEYTFDAGTYGHMLVLEPENFHGNFMRNPVPD
DFPDIELIESIPQLKAALAKSNLPVSGAKAALIERLYAFDPSLPLFEKMREKAITDYLDLR
YAKYLRTDVELDEMATFYGIDTSQTREKKIEEILAISPSQPIWEKLISQHVIDHIVWDDAM
RVERSTRAHPKADWLISDGYAELTHARCPTTGLLLKVRFDWLRNDAIGVDFKTTLSTNP
TKFGYQIKDLRYDLQQVFYCYVANLAGIPVKHFCFVATEYKDADNCETFELSHKKVIES
TEEMFDLLDEFKEALTSGNWYGHDRSRSTWVIEV

Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｐ． ＭＵＭ １１６ ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１２９）：

【化６５】

MSKQLTTVNTQAVVGTFSQAELDTLKQTIAKGTTNEQFALFVQTCANSRLNPFLNHIHCI
VYNGKEGATMSLQIAVEGILYLARKTDGYKGIECQLIHENDEFKFDAKSKEVDHQIGFP
RGNVIGGYAIAKREGFDDVVVLMESNEVDHMLKGRNGHMWRDWFNDMFKKHIMKR
AAKLQYGIEIAEDETVSSGPSVDNIPEYKPQPRKDITPNQDVIDAPPQQPKQDDEAAKLK
AARSEVSKKFKKLGIVKEDQTEYVEKHVPGFKGTLSDFIGLSQLLDLNIEAQEAQSADG
DLLD

Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｐ． ＭＵＭ １１６ ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１３０）：

【化６６】

MTYAADETLVQLLLSVDGKQLLLGRGLKKGKAQYYYINEVPSKAKEFEEIRDQLFDKDLF
MSLFNPSYFFTLHWEKQRAMMLKYVTAPVSKEVLKNLPEAQSEVLERYLKKHSLVDLE
KIHKDNKNKQDKAYISAQSRTNTLKEQLMQLTEEKLDIDSIKAELAHIDMQVIELEKQM
DTAFEKNQAFNLQAQIRNLQDKIEMSKERWPSLKNEVIEDTCRTCKRPLDEDSVEAVKA
DKDNRIAEYKAKHNSLVSQRNELKEQLNTIEYIDVTELREQIKELDESGQPLREQVRIYS
QYQNLDTQVKSAEADENGILQDLKASIFILDSIKAFRGKEAEMQAEKVQALFTTLSVRLF
KQNKGDGEIKPDFEIEMNDKPYRTLSLSEGIRAGLELRDVLSQQSELVTPTFVDNAESITS
FKQPNGQLIISRVVAGQELKIEAVSE

Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｏｎｎｅｉ ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１３１）：

【化６７】

MTKQPPIAKADLQKTQENRAPAAIKNNDVISFINQPSMKEQLAAALPRHMTAERMIRIA
TTEIRKVPALGNCDTMSFVSAIVQCSQLGLEPGSALGHAYLLPFGNKNEKSGKKNVQLII
GYRGMIDLARRSGQIASLSARVVREGDEFNFEFGLDEKLIHRPGENEDAPVTHVYAVAR
LKDGGTQFEVMTRRQIELVRSQSKAGNNGPWVTHWEEMAKKTAIRRLFKYLPVSIEIQR
AVSMDEKEPLTIDPADSSVLTGEYSVIDNSEE

Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｏｎｎｅｉ ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１３２）：

【化６８】

DRGLLTKEWRKGNRVSRITRTASGANAGGGNLTDRGEGFVHDLTSLARDIATGVLARS
MDVDIYNLHPAHAKRIEEIIAENKPPFSVFRDKFITMPGGLDYSRAIVVASVKEAPIGIEVI
PAHVTAYLNKVLTETDHANPDPFIVDIACGRSSAPMPQRVTEEGKQDDEEKLQPSGTTA
DEQGEAETMEPDATKHHQDTQPLDAQSQVNSVDAKYQELRAELHEARKNIPSKNPVDA
DKLLAASRGEFVDGISDPNDPKWVKGIQTRDSVYQNQPETEKTSPDMKQPEPVVQQEPE
IAFNACGQTGGDNCPDCGAVMGDATYQETFDEENQVEAKENDPEEMEGAEHPHNENA
GSDPHRDCSDETGEVADPVIVEDIEPGIYYGISNENYHAGPGVSKSQLDDIADTPALYLW
RKNAPVDTTKTKTLDLGTAFHCRVLEPEEFSNRFIVAPEFNRRTNAGKEEEKAFLMECA
STGKMVITAEEGRKIELMYQSVMALPLGQWLVESAGHAESSIYWEDPETGILCRCRPDK
IIPEFHWIMDVKTTADIQRFKTAYYDYRYHVQDAFYSDGYEAQFGVQPTFVFLVASTTIE
CGRYPVEIFMMGEEAKLAGQLEYHRNLRTLADCLNTDEWPAIKTLSLPRWAKEYAND

Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｃａ ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１３３）：

【化６９】

MTKQPPIAKADLQKTQGNRAPAAVNDKDVLCVINSPAMKAQLAAALPRHMTAERMIRI
ATTEIRKVPELRNCDSTSFIGAIVQCSQLGLEPGSALGHAYLLPFGNGKAKNGKKNVQLII
GYRGMIDLARRSGQIISLSARVVRECDEFSYELGLDEKLVHRPGENEDAPITHVYAVAKL
KDGGVQFEVMTKKQVEKVRDTHSKAAKNAASKGASSIWDEHFEDMAKKTVIRKLFKY
LPVSIEIQRAVSMDGKEVETINPDDISVIAGEYSVIDNPEE

Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｃａ ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１３４）：

【化７０】
DRGLLTKEWRKGNRVSRITRTASGANAGGGNLTDRGEGFVHDLTSLARDVATGVLAR
SMDVDIYNLHPAHAKRVEEHAENKPPFSVFRDKFITMPGGLDYSRAIVVASVKEAPIGIE
VIPAHVTEYLNKVLTETDHANPDPEIVDIACGRSSAPMPQRVTEEGKQDDEEKPQPSGA
MADEQATAETVEPNATEHHQNTQPLDAQSQVNSVDAKYQELRAELQEARKNIPSKNPV
DADKLLAASRGEFVDGISDPNDPKWVKGIQTRDSVYQNQPETEKISPDAKQPEPVVQQE
PETVCNACGQTGGDNCPDCGAVMGDATYQETFGEENQVEAKEKDPEEMEGAEHPHNE
NAGSDPHRDCSDETGEVADPVIVEDIEPGIYYGISNENYHAGPGVSKSQLDDIADTPALY
LWRKNAPVDTTKTKTLDLGTAFHCRVLEPEEFSNRFIVAPEFNRRTNAGKEEEKAFLME
CASTGKTVITAEEGRKIELMYQSVMALPLGQWLVESAGHAESSIYWEDPETGILCRCRP
DKIIPEFHWIMDVKTTADIQRFKTAYYDYRYHVQDAFYSDGYEAQFGVQPTFVFLVAST
TVECGRYPVEIFMMGEEAKLAGQQEYHRNLRTLADCLNTDEWPAIKTLSLPRWAKEYA
ND

Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ　ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１３５）：
【化７１】
MNAPQKQNTRAAVKKISPQEFAEQFAAIIPQVKSVLPAHVTFEKFERVVRLAVRKNPDL
LTCSPASLFMACIQAASDGLLPDGREGAIVSRWSSKKSCNEASWMPMVAGLMKLARNS
GDIASISSQVVFEGEHFRVVLGDEERIEHERDLGKTGGKIVAAYAVARLKDGSDPIREIM
SWGQIEKIRNTNKKWEWGPWKAWEDEMARKTVIRRLAKRLPMSTDKEGERLRSAIERI
DSLVDISANVDAPQIAADDEFAAAAHGVEPQQIAAPDLIGRLAQMQSLEQVQDIEPQVS
HAIQEADKRGDSDTANALDAALQSALSRTSTAKEEVPA

Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒ　ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１３６）：
【化７２】
MVISKSGIYDLTNEQYHADPCPEMSLSSSGARDLLSSCPAKFIAAKQLPQQNKRCFDIGS
AGHLMVLEPHLFDQKVCEIKHPDWRTKAAKEERDAAYAEGRIPLLSREVEDIRAMHSV
VWRDSLGARAFSGGKAEQSLVWRDEEFGIWCRLRPDYVPNNAVRIFDYKTATNGSPDA
FMKEIYNRGYHQQAAWYLDGYEAVTGHRPREFWFVVQEKTAPFLLSFFQMDEMSLEIG
RTLNRQAKGIFAWCLRNNCWPGYQPEVDGKVREFTTSPPAWLVREYEFKNEHGAYEPP
EIKRKEVA

Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｅｎｔｅｒｉｃａ　ｓｕｂｓｐ．　ｅｎｔｅｒｉｃａ　ｓｅｒｏｖａｒ　Ｊａｖｉａｎａ　ｓｔｒ．　１０７２１　ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１３７）：
【化７３】
MPKQPPIAKADLQKTQGARTPTAVKNNNDVISFINQPSMKEQLAAALPRHMTAERMIRI
ATTEIRKVPALGDCDIMSFVSAIVQCSQLGLEPGGALGHAYLLPFGNRNEKSGKKNVQL
IIGYRGMIDLARRSGQIASLSARVVREGDDFSFEFGLEEKLVHRPGENEDAPVTHVYAVA
RLKDGGTQFEVMTRKQIELVRAQSKAGNNGPWVTHWEEMAKKTAIRRLFKYLPVSIEI
QRAVSMDEKETLTIDPADASVITGEYSVVENAGVEENVTA

Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｅｎｔｅｒｉｃａ　ｓｕｂｓｐ．　ｅｎｔｅｒｉｃａ　ｓｅｒｏｖａｒ　Ｊａｖｉａｎａ　ｓｔｒ．　１０７２１　ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１３８）：
【化７４】
MYYDIPNEAYHAGPGVSKSQLDDIADTPAIYLWRKNAPVDTEKTKSLDTGTAFHCRVLE
PEEFSKRFIIAPEFNRRTSAGKEEEKTFLEECTRTGRTVLTAEEGRKIELMYQSVMALPLG
QWLVESAGYAESSVYWEDPETGILCRCRPDKIIPEFHWIMDVKTTADIQRFRTAYYDYR
YHVQDAFYSDGYRAQFGEIPTFVFLVASTTAECGRYPVEIFMMGEDAKLAGQREYRRN
LQTLAECLNNDEWPAIKTLSLPRWAKENANA

Ｐｓｅｕｄｏｂａｃｔｅｒｉｏｖｏｒａｘ　ａｎｔｉｌｌｏｇｏｒｇｉｉｃｏｌａ　ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１３９）：

【化７５】
MGHLVSKTEQDYIKQHYAKGATDQEFEHFIGVCRARGLNPAANQIYFVKYRSKDGPAK
PAFILSIDSLRLIAHRTGDYAGCSEPIFTDGGKACTVTVRRNLKSGETGNFSGMAFYDEQ
VQQKNGRPTSFWQSKPRTMLEKCAEAKALRKAFPQDLGQFYIREEMPPQYDEPIQVHK
PKALEEPRFSKSDLSRRKGLNRKLSALGVDPSRFDEVATFLDGTPDRELGQKLKLWLKE
AGYGVNQ

Ｐｓｅｕｄｏｂａｃｔｅｒｉｏｖｏｒａｘ ａｎｔｉｌｌｏｇｏｒｇｉｉｃｏｌａ ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１４０）：

【化７６】
MSKLSNLKVSNSDVDTLSRIRMKEGVYRDLPIESYHQSPGYSKTSLCQIDKAPIYLKTKV
PQKSTKSLNIGTAFHEAMEGVFKDKYVVHPDPGVNKTTKSWKDFVKRYPKHMPLKRSE
YDQVLAMYDAARSYRPFQKYHLSRGFYESSFYWHDAVTNSLIKCRPDYITPDGMSVIDF
KTTVDPSPKGFQYQAYKYHYYVSAALTLEGIEAVTGIRPKEYLFLAVSNSAPYLTALYR
ASEKEIALGDHFIRRSLLTLKTCLESGKWPGLQEEILELGLPFSGLKELREEQEVEDEFME
LVG

Ｐｈｏｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｐ． ＪＣＭ １９０５０ ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１４１）：

【化７７】
MNTDMIAMPPSPAISMLDTSKLDVMVRAAELMSQAVVMVPDHFKGKPADCLAVVMQ
ADQWGMNPFTVAQKTHLVSGTLGYESQLVNAVISSSKAIKGRFHYEWSDGWERLAGK
VQYVKESRQRKGQQGSYQVTVAKPTWKPEDEQGLWVRCGAVLAGEKDITWGPKLYL
ASVLVRNSELWTTKPYQQAAYTALKDWSRLYTPAVMQGSMTGKSWSLTGRLISPR

Ｐｈｏｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｐ． ＪＣＭ １９０５０ ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１４２）：

【化７８】
MAERVRTYQRDAVFAHELKAEFDEAVENGKTGVTLEDQARAKRMVHEATTNPASRN
WFRYDGELAACERSYFWRDEEAGLVLKARPDKEIGNNLIDVKSIEVPTDVCACDLNAYI
NRQIEKRGYHISAAHYLSGTGKDRFFWIFINKVKGYEWVAIVEASPLHIELGTYEVLEGL
RSIASSTKEADYPAPLSHPVNERGIPQPLMSNLSTYAMKRLEQFREL

Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ａｌｃａｌｉｆａｃｉｅｎｓ ＤＳＭ ３０１２０ ＲｅｃＴタンパク質（配列番号１４３）：

【化７９】
MKAQLAAALPKHITSDRMIRIVSTEIRKTPSLANCDIQSFIGAVVQCSQLGLEPGNALGH
AYLLPFGNGKSDNGKSNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIISISARTVRQGDNFHFEYGLNEN
LTHIPEGNEDSPITHVYAVARLKDEGVQFEVMTYNQIEKVRDSSKAGKNGPWVTHWEE
MAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQKAVILDEKAEANIEQDHSAIFEAEFEEVDSNGN

Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ ａｌｃａｌｉｆａｃｉｅｎｓ ＤＳＭ ３０１２０ ＲｅｃＥタンパク質（配列番号１４４）：

【化８０】
MNEGIYYDISNEDYHHGLGISKSQLDLIDESPADFIWHRDAPVDNEKTKALDFGTALHCL
LLEPDEFQKRFRIAPEVNRRTNAGKEQEKEFLEMCEKENITPITNEDNRKLSLMKDSAM
AHPIARWCLEAKGIAESSIYWKDKDTDILCRCRPDKLIEEHHWLVDVKSTADIQKFERS
MYEYRYHVQDSFYSDGYKSLTGEMPVFVFLAVSTVINCGRYPVRVFVLDEQAKSVGRI
TYKQNLFTYAECLKTDEWAGIRTLSLPSWAKELKHEHTTAS

マウスアルブミンノックインセンス鋳型（配列番号１６０）

【化８１】

CACCTTCAGATTTTCCTGTAACGATCGGGAACTGGCATCTTCAGGGAGTAGctgacctcttc
tcttcctcccacaggATCCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAGCTCAGTGAAGAGAAGAACA
AAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAATATGTTGTGTGGTTT
TTCTCTCCCTGTTTCCAC

マウスアルブミンノックインアンチセンス鋳型（配列番号１６１）

【化８２】

GTGGAAACAGGGAGAGAAAAACCACACAACATATTTAAAGATTGATGAAGACAACT
AACTGTAATATGCTGCTTTTTGTTCTTCTCTTCACTGAGCTTTTCGAACTGCGGGTGG
CTCCAGGATcctgtgggaggaagagaagaggtcagCTACTCCCTGAAGATGCCAGTTCCCGATCGT
TACAGGAAAATCTGAAGGTG

（配列番号１６２）

【化８３】

ACTTTGAGTGTAGCAGAGAGGAACCATTGCCACCTTCAGATTTTCCTGTAACGATCG
GGAACTGGCATCTTCAGGGAGTAGCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGATCCTGG
AGCCACC

実施例１６

【０３６７】

大腸菌ＲｅｃＴ（ＥｃＲｅｃＴ）単独（図３６Ａ）および一本鎖ＤＮＡが結合したもの（図３６Ｂおよび図３６Ｃ）の構造を予測した。接触界面は短縮データと一致する（実施例７、図２０Ａ）。ＥｃＲｅｃＴ　ＳＳＡＰアミノ酸とＤＮＡとの予測される相互作用を図３７Ａおよび図３７Ｂに示す。

実施例１７

【０３６８】

配列データから３２２個のＳＳＡＰタンパク質を同定し、合成し、Ｃａｓ９およびｄＣａｓ９による活性についてスクリーニングした。遺伝子編集活性を以下の表７に示し、続いてタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【表７－１】

表7. SSAPによるCas9活性

SEQ ID NO	SSAPタンパク質ID (Uniprot)	全実験にわたる活性	Cas9とともにSSAP活性	Cas9とともにSSAP活性（正規化）	dCas9とともにSSAP活性	dCas9とともにSSAP活性（正規化）
411	WP_130123223.1	2.999	2.358	1.579	3.640	2.062
408	SEI77195.1	1.811	1.340	0.516	2.282	1.278
442	WP_038246219.1	0.121	-1.654	-0.724	1.896	2.101
290	WP_149216302.1	0.692	-0.279	-0.275	1.664	1.531
253	UPI000B4BEFE6	-0.284	-1.881	-0.590	1.313	1.563
167	UPI0000030D3A	0.058	-0.942	-0.788	1.058	0.695

【表７－２】

441	WP_074846740.1	0.558	0.254	0.626	0.863	0.407
241	UPI0008EA8633	0.551	0.397	0.895	0.705	1.131
243	UPI000958E115	0.781	0.893	0.751	0.668	0.984
416	CDA71469.1	-1.027	-2.602	-3.388	0.549	0.332
229	UPI000795D815	0.534	0.757	0.560	0.311	0.109
258	WP_069728515.1	0.393	0.562	0.533	0.225	0.240
221	UPI00064B44C1	-0.190	-0.544	-0.573	0.163	0.148
222	UPI00064D5E13	-0.778	-1.644	-1.327	0.088	0.036
491	RTL04618.1	0.184	0.287	0.247	0.082	0.048
330	WP_037404193.1	-0.857	-1.623	-0.850	-0.092	-0.051
312	OIO76374.1	-0.501	-0.905	-0.436	-0.097	-0.073
346	GAK01483.1	-0.236	-0.293	-0.508	-0.179	-0.069
235	UPI0007F13B78	0.082	0.370	0.407	-0.205	-0.040
402	WP_106316803.1	-1.424	-2.628	-0.424	-0.220	-0.063
260	WP_102086779.1	0.114	0.635	0.826	-0.407	-0.170
356	WP_114599505.1	-0.120	0.257	0.239	-0.498	-0.164
180	UPI000034E66D	-1.223	-1.791	-0.870	-0.655	-0.866
240	UPI0008E12231	-1.249	-1.797	-2.283	-0.701	-0.555
184	UPI00015968D7	-1.288	-1.876	-0.850	-0.701	-2.250
238	UPI0008D18539	-3.014	-5.286	-0.810	-0.742	-0.240
383	WP_125711747.1	-0.150	0.465	0.410	-0.764	-0.279
271	WP_129141488.1	-0.451	-0.118	-0.065	-0.784	-0.325
191	UPI0001E0C499	0.498	1.789	4.337	-0.792	-0.867
347	WP_135329961.1	-0.932	-1.057	-0.929	-0.807	-0.626
174	UPI000009AF52	-0.440	-0.026	-0.032	-0.854	-0.392
421	GAE17732.1	-0.575	-0.275	-0.560	-0.876	-0.635
439	WP_061413958.1	-0.371	0.154	0.174	-0.896	-0.293
218	UPI0005E4CB74	-0.751	-0.515	-0.176	-0.987	-0.289
307	WP_118016648.1	-1.214	-1.429	-0.887	-1.000	-0.320
303	WP_071062796.1	-1.168	-1.284	-1.104	-1.053	-0.424
186	UPI00015C02E0	-0.687	-0.287	-0.195	-1.088	-0.491
383	WP_017415747.1	-0.758	-0.428	-0.545	-1.088	-1.120
476	WP_084505057.1	-1.095	-1.090	-2.185	-1.100	-0.907
447	WP_079708113.1	-0.030	1.070	2.231	-1.129	-1.000
291	WP_125141636.1	0.144	1.429	0.558	-1.142	-0.148
437	WP_069686512.1	-0.656	-0.160	-0.383	-1.151	-0.400
328	CCZ61365.1	0.233	1.622	2.756	-1.156	-0.358
310	WP_117624242.1	-1.613	-2.047	-0.694	-1.179	-0.244
288	WP_130067396.1	-1.050	-0.911	-3.635	-1.189	-0.361

【表７－３】

228	UPI00078ED021	-0.491	0.218	0.538	-1.201	-0.336
320	WP_016998679.1	-2.985	-4.713	-0.683	-1.257	-0.422
286	WP_002566991.1	-2.868	-4.474	-1.192	-1.263	-0.179
304	AGF93134.1	-0.985	-0.693	-1.286	-1.277	-1.011
188	UPI0001BEF484	-0.847	-0.298	-0.329	-1.396	-0.389
280	WP_018705791.1	-0.622	0.173	0.129	-1.417	-0.419
261	WP_109615067.1	0.412	2.341	2.795	-1.516	-0.177
322	WP_019168122.1	-1.867	-2.201	-0.296	-1.534	-0.179
244	UPI0009805C1D	-0.687	0.284	0.225	-1.658	-0.897
465	WP_082209600.1	-0.753	0.244	0.617	-1.749	-0.598
385	WP_052399147.1	-1.321	-0.840	-0.758	-1.801	-0.508
304	SFO83314.1	-1.554	-1.283	-0.722	-1.826	-2.544
309	WP_107378794.1	-1.198	-0.553	-1.314	-1.842	-1.900
392	WP_141925904.1	-0.846	0.236	0.173	-1.928	-0.948
471	WP_077867213.1	-1.394	-0.842	-0.289	-1.946	-0.772
262	WP_124537594.1	-0.650	0.714	1.299	-2.015	-0.557
464	WP_138600901.1	-2.188	-2.337	-0.343	-2.038	-0.267
456	AAT90028.1	-0.980	0.085	0.091	-2.044	-1.493
445	WP_068672306.1	-2.301	-2.551	-0.452	-2.052	-0.337
432	WP_051267408.1	-1.635	-1.201	-0.666	-2.069	-0.685
331	WP_027347470.1	-0.900	0.273	0.278	-2.073	-1.380
324	WP_096823857.1	-2.122	-2.139	-0.908	-2.105	-0.826
393	WP_136710836.1	0.449	3.010	2.232	-2.113	-0.351
372	SYW13692.1	-2.400	-2.670	-0.476	-2.129	-0.311
260	WP_118771779.1	-0.974	0.197	0.073	-2.145	-1.216
334	WP_027295741.1	-1.538	-0.918	-0.925	-2.157	-0.568
201	UPI0002B78771	-1.308	-0.435	-1.203	-2.180	-0.281
237	UPI000865FB15	-0.560	1.110	4.696	-2.230	-0.296
270	WP_106478153.1	-2.036	-1.798	-0.307	-2.273	-0.413
250	UPI000B36BD3F	-2.308	-2.257	-0.341	-2.360	-0.367
443	WP_106064284.1	-1.072	0.280	0.259	-2.423	-0.328
298	WP_024292388.1	-1.200	0.031	0.019	-2.431	-0.313
314	CDF42377.1	-1.325	-0.211	-0.214	-2.440	-0.309
368	BAQ93806.1	-4.877	-7.274	-1.400	-2.480	-0.364
488	WP_081955873.1	-0.883	0.742	1.773	-2.508	-0.276
223	UPI00065C2D47	-1.264	-0.011	-0.061	-2.517	-0.565
367	WP_147981944.1	-3.320	-4.061	-0.571	-2.578	-0.849
483	WP_028113352.1	-1.240	0.114	0.106	-2.593	-0.657
426	WP_045553720.1	-1.217	0.216	0.821	-2.649	-1.189

【表７－４】

199	UPI00025CF49A	-0.927	0.813	0.564	-2.667	-0.795
273	WP_020007369.1	-3.455	-4.226	-0.744	-2.685	-0.421
267	WP_016979878.1	-0.971	0.754	0.207	-2.696	-0.444
323	WP_148820236.1	-1.758	-0.806	-0.733	-2.710	-0.380
166	LambdaBet	-3.613	-4.490	-0.856	-2.737	-0.416
233	UPI0007B64693	-0.583	1.588	1.090	-2.755	-1.023
387	WP_143887802.1	-4.836	-6.903	-1.680	-2.770	-0.443
192	UPI0001E2AFC1	-0.998	0.839	0.359	-2.835	-0.450
332	WP_072526012.1	-0.742	1.362	1.914	-2.847	-0.374
220	UPI00062002D2	-1.512	-0.124	-0.406	-2.900	-0.907
353	WP_060905391.1	-1.873	-0.836	-0.308	-2.910	-0.482
403	WP_013655830.1	-1.177	0.596	1.140	-2.950	-0.446
274	WP_131521405.1	-1.882	-0.802	-0.382	-2.961	-0.450
484	WP_100916003.1	-2.321	-1.578	-0.629	-3.063	-2.608
282	RDC50983.1	-3.431	-3.728	-3.241	-3.134	-3.818
434	WP_063601171.1	-2.057	-0.932	-0.510	-3.182	-0.478
418	AFH22576.1	-3.156	-3.033	-0.543	-3.279	-0.575
489	WP_064664300.1	-2.305	-1.322	-0.932	-3.288	-0.449
301	WP_002595146.1	-5.320	-7.323	-1.345	-3.318	-0.536
264	WP_109401438.1	-1.672	-0.020	-0.011	-3.325	-0.539
195	UPI000212F382	-1.354	0.692	1.723	-3.399	-0.852
226	UPI00078E90BE	-3.391	-3.376	-0.549	-3.405	-0.557
265	WP_115149784.1	-1.869	-0.322	-1.581	-3.416	-1.995
338	KKZ74881.1	-2.669	-1.842	-1.968	-3.497	-0.528
459	WP_089281299.1	-2.336	-1.166	-0.249	-3.506	-0.681
406	GAC42786.1	-5.493	-7.473		-3.513	-0.512
436	WP_099840029.1	-1.897	-0.224	-0.145	-3.571	-0.553
394	WP_132110073.1	-2.204	-0.830	-0.252	-3.577	-0.602
302	WP_100306418.1	-4.276	-4.946	-1.095	-3.605	-0.658
190	UPI0001D2DF22	-2.192	-0.774	-0.320	-3.610	-0.537
172	UPI0000010203	-4.270	-4.919	-0.814	-3.622	-0.496
277	WP_066790810.1	-1.807	0.069	0.068	-3.682	-0.539
329	WP_068720576.1	-0.901	1.888	0.942	-3.690	-0.763
454	WP_123849158.1	-2.441	-1.178	-0.366	-3.704	-0.608
487	WP_115407185.1	-1.849	0.045	0.060	-3.743	-0.597
295	WP_083048409.1	-3.591	-3.406	-0.596	-3.777	-0.714
467	WP_109523733.1	-1.640	0.510	0.610	-3.790	-0.578
462	WP_106833617.1	-4.559	-5.271	-0.961	-3.846	-0.563
415	WP_019417330.1	-1.537	0.824	0.919	-3.897	-0.611

【表７－５】

414	OAB27843.1	-1.809	0.282	0.572	-3.899	-0.575
259	WP_045958294.1	-2.219	-0.504	-0.093	-3.935	-0.892
440	WP_147129628.1	-1.788	0.372	0.623	-3.947	-0.622
255	UPI000B94B1D1	-1.700	0.575	0.280	-3.974	-0.714
375	WP_092601202.1	-0.786	2.444	1.806	-4.016	-0.671
316	WP_115856892.1	-1.672	0.679	1.062	-4.023	-0.498
239	UPI0008D990CB	-2.666	-1.263	-0.349	-4.070	-0.652
200	UPI0002AD92E7	-4.468	-4.826	-0.842	-4.110	-0.643
194	UPI00020BA2E0	-1.758	0.597	0.880	-4.113	-0.660
340	SDL28883.1	-2.528	-0.924	-0.410	-4.132	-0.827
352	CDE68291.1	-2.313	-0.476	-0.351	-4.151	-0.615
276	WP_120191052.1	-1.782	0.596	1.792	-4.159	-0.615
388	WP_073793143.1	-1.792	0.580	0.924	-4.163	-0.726
278	WP_098408280.1	-2.932	-1.697	-0.475	-4.168	-0.640
423	WP_099299656.1	-2.669	-1.160	-0.694	-4.178	-0.675
189	UPI0001CE597A	-2.181	-0.183	-0.399	-4.179	-0.615
395	WP_125769509.1	-3.017	-1.843	-1.377	-4.191	-0.610
468	GAE09585.1	-4.441	-4.631	-0.809	-4.250	-0.686
245	UPI0009805F63	-2.282	-0.308	-0.267	-4.256	-0.591
482	WP_131535536.1	-2.345	-0.432	-0.643	-4.259	-1.301
183	UPI0001594E53	-2.297	-0.331	-0.351	-4.263	-0.702
419	WP_138067957.1	-4.402	-4.531	-1.341	-4.273	-1.117
219	UPI0005FEB4B0	-1.644	0.998	0.451	-4.286	-0.712
333	WP_092453396.1	-3.266	-2.221	-0.998	-4.310	-0.557
227	UPI00078EBE91	-3.018	-1.710	-0.437	-4.326	-0.647
242	UPI00091F1EB0	-2.055	0.274	0.640	-4.383	-0.616
446	WP_067592792.1	-2.958	-1.480	-0.437	-4.435	-0.734
401	PCR98661.1	-2.757	-1.056	-0.259	-4.457	-0.721
460	RDI65706.1	-4.494	-4.531	-1.341	-4.458	-1.272
251	UPI000B38B374	-4.391	-4.284	-0.776	-4.498	-0.873
272	WP_084261900.1	-2.611	-0.682	-0.190	-4.540	-0.705
234	UPI0007BCAEAB	-2.185	0.198	0.190	-4.569	-0.746
275	WP_132769795.1	-5.073	-5.574	-1.211	-4.572	-0.829
444	WP_028562280.1	-2.900	-1.206	-0.494	-4.593	-0.870
266	WP_034910107.1	-5.290	-5.948	-1.267	-4.633	-0.842
299	WP_009524931.1	-2.714	-0.778	-0.800	-4.650	-0.774
168	**T7gp2.5**	-2.001	0.660	1.440	-4.662	-0.557
435	WP_118206945.1	-5.345	-6.013	-1.700	-4.677	-0.799
196	UPI00022F8B4D	-3.661	-2.642	-0.956	-4.680	-0.675

【表７－６】

339	WP_055284109.1	-1.184	2.314	1.852	-4.682	-0.968
345	WP_128520904.1	-1.789	1.105	2.418	-4.682	-0.680
427	WP_106024518.1	-4.014	-3.280	-0.553	-4.748	-0.956
396	WP_004234437.1	-2.575	-0.330	-0.310	-4.819	-0.774
428	WP_073010654.1	-3.807	-2.773	-0.529	-4.841	-1.414
231	UPI0007B45EC7	-3.538	-2.135	-1.289	-4.940	-0.604
197	UPI0002314B74	-2.227	0.503	0.506	-4.957	-0.886
413	TCP18101.1	-6.718	-8.469		-4.966	-0.819
309	WP_107514794.1	-3.187	-1.374	-0.848	-5.000	-0.780
420	WP_072904346.1	-3.012	-0.983	-1.345	-5.041	-0.760
254	UPI000B5661AA	-2.702	-0.312	-0.125	-5.091	-1.071
279	WP_047150996.1	-3.889	-2.674	-0.477	-5.104	-1.491
337	WP_092724975.1	-2.237	0.735	1.158	-5.210	-0.836
230	UPI00079B135B	-3.303	-1.348	-0.539	-5.258	-0.804
417	WP_019108121.1	-3.063	-0.854	-1.210	-5.272	-0.814
341	WP_145458209.1	-3.822	-2.356	-0.702	-5.287	-0.724
297	WP_076065282.1	-2.230	0.839	0.272	-5.299	-0.965
193	UPI0001E35ACE	-4.480	-3.642	-0.681	-5.319	-0.711
268	WP_080977968.1	-4.570	-3.807	-0.873	-5.333	-0.891
380	WP_093587584.1	-1.297	2.771	4.679	-5.365	-0.904
325	WP_098170605.1	-2.272	0.844	2.230	-5.389	-0.877
404	WP_148001988.1	-5.237	-5.016	-0.970	-5.457	-1.152
182	UPI000150D6AC	-3.004	-0.463	-0.403	-5.545	-0.758
343	WP_073112630.1	-4.727	-3.891	-0.617	-5.563	-1.144
386	WP_067349107.1	-3.758	-1.938	-1.023	-5.577	-0.839
358	WP_127100780.1	-3.046	-0.440	-2.025	-5.652	-0.952
351	SUY49750.1	-3.606	-1.549	-1.689	-5.663	-0.742
185	UPI00015C01AE	-3.262	-0.858	-0.452	-5.666	-1.047
175	UPI000009B019	-6.879	-8.056		-5.703	-1.399
284	WP_097006457.1	-4.992	-4.259	-0.733	-5.725	-1.307
326	WP_087290962.1	-4.633	-3.533	-1.181	-5.734	-0.898
178	UPI00000B3F97	-3.138	-0.503	-1.380	-5.773	-1.126
433	WP_112330076.1	-2.625	0.565	0.375	-5.815	-0.919
473	RPI78794.1	-4.262	-2.690	-0.447	-5.835	-0.886
335	WP_117768035.1	-3.593	-1.338	-0.432	-5.849	-0.934
475	WP_081735325.1	-4.408	-2.932	-2.350	-5.884	-0.905
469	RRG08833.1	-5.191	-4.466	-0.701	-5.916	-1.175
463	RDE19343.1	-6.515	-7.102	-2.102	-5.929	-1.096
362	WP_110990907.1	-3.196	-0.442	-0.140	-5.951	-1.083

【表７－７】

357	SCQ72869.1	-6.118	-6.279	-0.994	-5.957	-0.867
397	WP_006845711.1	-5.195	-4.425	-0.688	-5.964	-1.008
412	WP_147265819.1	-3.650	-1.310	-0.511	-5.989	-1.036
281	WP_035430909.1	-3.533	-1.038	-0.628	-6.027	-0.986
474	WP_051624047.1	-2.644	0.745	0.408	-6.032	-1.721
378	AKT73182.1	-2.584	0.868	0.712	-6.036	-0.929
336	SCJ42694.1	-3.703	-1.337	-0.698	-6.070	-0.834
294	WP_025114396.1	-4.043	-1.981	-0.329	-6.106	-1.313
173	UPI00000105D3	-6.946	-7.779	-1.250	-6.114	-1.204
450	RZT66774.1	-3.655	-1.121	-0.672	-6.188	-0.973
305	WP_110092637.1	-3.495	-0.594	-0.262	-6.395	-0.952
364	WP_068202759.1	-4.084	-1.761	-1.896	-6.406	-0.956
285	WP_087225255.1	-3.394	-0.307	-0.056	-6.481	
308	WP_051200279.1	-6.481	-6.481		-6.481	
369	WP_061405262.1	-4.491	-2.468	-0.973	-6.514	-1.107
296	WP_099424140.1	-3.048	0.427	0.447	-6.524	-1.210
381	WP_030975214.1	-3.064	0.448	0.210	-6.577	-1.182
431	ERL63827.1	-4.769	-2.947	-0.511	-6.590	-1.417
366	PAV10712.1	-4.703	-2.785	-1.134	-6.622	-1.370
317	WP_108404827.1	-5.193	-3.731	-0.574	-6.656	-1.610
348	WP_079588582.1	-5.563	-4.285	-0.748	-6.840	-1.230
327	WP_051264703.1	-4.070	-1.229	-0.520	-6.910	-1.386
257	WP_032686941.1	-4.539	-2.144	-1.524	-6.933	-1.193
166	UPI0000030D3E	-4.940	-2.882	-0.474	-6.997	-1.447
318	WP_021747387.1	-4.416	-1.833	-2.092	-6.999	-1.192
263	WP_006657622.1	-3.670	-0.340	-0.087	-7.000	-1.112
300	WP_015358111.1	-4.137	-1.273	-0.894	-7.001	-0.946
466	WP_026627303.1	-6.274	-5.364	-1.014	-7.184	-1.057
249	UPI000A08A794	-5.479	-3.757	-0.629	-7.200	-1.353
313	WP_094369469.1	-4.771	-2.249	-0.663	-7.293	-1.765
248	UPI0009F8F604	-4.489	-1.629	-2.086	-7.349	-2.203
480	WP_025706233.1	-6.749	-6.123	-0.874	-7.375	-1.526
232	UPI0007B642FE	-3.427	0.570	2.381	-7.424	-1.335
176	UPI000009B628	-7.537	-7.628	-1.701	-7.447	-1.443
424	WP_118227047.1	-3.873	-0.273	-0.044	-7.473	
181	UPI00005F0A78	-7.690	-7.814	-1.324	-7.567	-1.196
429	WP_111921306.1	-5.739	-3.745	-0.581	-7.734	-1.301
430	WP_019125538.1	-4.137	-0.535	-0.174	-7.740	-1.199
247	UPI0009F5E532	-4.307	-0.849	-0.295	-7.766	-2.216

【表７－８】

461	WP_076170610.1	-6.169	-4.432	-0.752	-7.905	-1.546
399	WP_142511229.1	-3.700	0.548	0.321	-7.949	-1.164
370	WP_114014965.1	-4.249	-0.461	-0.195	-8.036	-1.510
376	WP_067024969.1	-6.496	-4.938	-0.798	-8.053	-1.345
390	WP_020135111.1	-6.275	-4.494	-0.728	-8.056	
453	WP_116232802.1	-4.873	-1.673	-1.388	-8.073	-1.172
354	WP_146678271.1	-5.013	-1.825	-0.708	-8.201	-2.012
202	UPI0002B78B34	-3.528	1.307	0.578	-8.362	-1.043
363	WP_109196224.1	-3.031	2.727	3.516	-8.790	
293	WP_118246619.1	-7.244	-5.698	-1.064	-8.790	
205	UPI0002E4C0BF	-6.514	-4.118	-0.619	-8.909	-1.787
472	WP_132305216.1	-3.683	1.686	2.052	-9.053	
398	WP_073846185.1	-6.122	-2.969	-0.509	-9.275	
478	WP_076079849.1	-6.697	-3.975	-1.807	-9.420	-2.412
315	WP_123609006.1	-5.040	-0.626	-2.428	-9.454	-1.210
252	UPI000B49B5D9	-5.182	-0.905	-1.189	-9.459	-1.391
287	WP_132412730.1	-9.467	-9.467		-9.467	
410	WP_125777163.1	-5.085	-0.640	-3.561	-9.530	-2.720
438	RMD50745.1	-8.768	-7.746	-2.190	-9.789	
246	UPI0009880690	-10.167	-10.167		-10.167	
448	OLA20462.1	-6.593	-2.825	-3.398	-10.362	-2.349
283	WP_150051132.1	-9.340	-7.755	-1.412	-10.925	

ＵＰＩ０００００１０２０３（配列番号１７２）

【化８４】

ATNESLKNQLSTKKETGLGSAGNTIKGLMNSPAIKKRFEEVLKQRAPQYMSSIVNLVNS
DINLKKCDQMSVVASCMVAATLDLPVDKNLGYAWVVPYGNKAQFQLGYKGYVQLAL
RTGQYKSINVIEIHEGELIDWNPLTEELKIDFSKKESDAVIGYAGYFELLNGFKKSTYWTK
EQITKHKNKFSKSDFGWKKDFDAMARKTVLRNMLSKWGILSIEMQNAYTADQGIIKNEI
IETGEVKENIEYIEADFESYEDNSIEEGGANE

ＵＰＩ０００００１０５Ｄ３（配列番号１７３）

【化８５】

ATNESLKNQLTTKKETGLGSAGNTIKGLMNSPAIKKRFEEVLKQRAPQYMSSIVNLVNS
DINLKKCDQMSVVASCMVAATLDLPVDKNLGYAWVVPYGNKAQFQLGYKGYVQLAL
RTGQYKSINVIEIHEGELIDWNPLTEELKIDFSKKESDAVIGYAGYFELLNGFKKSTYWTK
EQITKHKNKFSKSDFGWKKDFDAMARKTVLRNMLSKWGILSIEMQNAYTADQGIIKNEI
METGEVKENIEYIEADFESYEDNSIEEGGANE

ＵＰＩ０００００３０Ｄ３Ａ／ＨＡＷ２６８２７０５．１　ＲｅｃＴ　［Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ］（配列番号１６７）

【化８６】

TKQPPIAKADLQKTQGNRAPAAVKNSDVISFINQPSMKEQLAAALPRHMTAERMIRIAT
TEIRKVPALGNCDTMSFVSAIVQCSQLGLEPGSALGHAYLLPFGNKNEKSGKKNVQLIIG
YRGMIDLARRSGQIASLSARVVREGDEFSFEFGLDEKLIHRPGENEDAPVTHVYAVARL
KDGGTQFEVMTRKQIELVRSLSKAGNNGPWVTHWEEMAKKTAIRRLFKYLPVSIEIQRA
VSMDEKEPLTIDPADSSVLTGEYSVIDNSEE

ＵＰＩ０００００３０Ｄ３Ｅ（配列番号１６６）

【化８７】

STALATLAGKLAERVGMDSVDPQELITTLRQTAFKGDASDAQFIALLIVANQYGLNPWT
KEIYAFPDKQNGIVPVVGVDGWSRIINENQQFDGMDFEQDNESCTCRIYRKDRNHPICV
TEWMDECRREPFKTREGREITGPWQSHPKRMLRHKAMIQCARLAFGFAGIYDKDEAERI
VENTAYTAERQPERDITPVNDETMQEINTLLIALDKTWDDDLLPLCSQIFRRDIRASSELT
QAEAVKALGFLKQKAAEQKVAA

ＵＰＩ０００００９ＡＦ５２（配列番号１７４）

【化８８】
ANELGIFSVDNLNMTTIKQYLDGGGKASDAELVLLINLCKQNNMNPFMKEVYFIKYGN
QPAQIVVSRDFYRKRAFQNPNFVGIEVGVIVLNKDGVLEHNEGTFKTHEQELVGAWAR
VHLKNTEIPVYVAVSYDEYVQMKDGHPNKMWTNKPCTMLGKVAESQALRMAFPAEFS
GTYGEEEYPEPEKEPREVNGVKEPDRAQIESFDKEDYAAKKIEELKEKAQPQKEVVEET
GEVIDEEPLEGF

ＵＰＩ０００００９Ｂ０１９（配列番号１７５）
【化８９】
STALATLAGKLAERVGMDSVDPQELITTLRQTAFKGDASDAQFIALLIVANQYGLNPWT
KEIYAFPDKQNGIVPVVGVDGWSRIINENQQFDGMDFEQDNESCTCRIYRKDRNHPICV
TEWMDECRREPFKTREGREITGPWQSHPKRMLRHKAMIQCARLAFGFAGIYDKDEAERI
VENTAYTAERQPERDITPVNDETMQEINTLLIALDKTWDDDLLPLCSQIFRRDIRASSELT
QAEAVKALGFLKQKATEQKVAA

ＵＰＩ０００００９Ｂ６２８（配列番号１７６）
【化９０】
STNDELKNKLANKQNGGQVASAQSLGLKGLLEAPTMRKKFESVLDKKAPQFLTSLLNL
YNGDDYLQKTDPMTVVTSAMVAATLDLPIDKNLGYAWIVPYKGRAQFQLGYKGYIQL
ALRTGQYKSINVIEVRDGELLKWNRLTEEIELDLDNNTSEKVIGYCGYFQLINGFEKTVY
WTRKEIEAHKKKFSKSDFGWKKDYDAMAKKTVLRNMLSKWGILSIDMQTAVTEDEAE
PRERKDVTEDESIPDIIDAPITPSDTLEAGSEVQGSMI

ＵＰＩ０００００９ＢＣ１５（配列番号１７７）
【化９１】
STALATLAGKLAERVGMDSVDPQELITTLRQTAFKGDASDAQFIALLIVANQYGLNPWT
KEIYAFPDKQNGIVPVVGVDGWSRIINENQQFDGMDFEQDNESCTCRIYRKDRNHPICV
TEWMDECRREPFKTREGREITGPWQSHPKRMLRHKAMIQCARLAFGFAGIYDKDEAERI
VENTAYTAERQPERDITPVNDETMQEINTLLIALDKTWDDDLLPLCSQIFRRDIRASSELT
QAEAVKVLGFLKQKASEQKVAA

ＵＰＩ００００００Ｂ３Ｆ９７　Ｂｅｔ　［Ｇａｍｍａｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉａ］（配列番号１７８）
【化９２】
EKPKLIQRFAERFSVDPNKLFDTLKATAFKQRDGSAPTNEQMMALLVVADQYGLNPFT
KEIFAFPDKQAGIIPVVGVDGWSRIINQHDQFDGMEFKTSENKVSLDGAKECPEWMECII
YRRDRSHPVKITEYLDEVYRPPFEGNGKNGPYRVDGPWQTHTKRMLRHKSMIQCSRIAF
GFVGIFDQDEAERIIEGQATHVVEPSVIPPEQVDDRTRGLVYKLIERAEASNAWNSALEY
ANEHFQGVELTFAKQEIFNAQQQAAKALTQPLAS

ＵＰＩ０００００１９ＡＢ４９　Ｂｅｔ　［Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ］（配列番号１７９）
【化９３】
STALATLAGKLAERVGMDSVDPQELITTLRQTAFKGDASDAQFIALLIVANQYGLNPWT
KEIYAFPDKQNGIVPVVGVDGWSRIINENQQFDGMDFEQDNESCTCRIYRKDRNHPICV
TEWMDECRREPFKTREGREITGPWQSHPKRMLRHKAMIQCARLAFGFAGIYDKDEAERI
VENTAYTAERQPERDITPVNNETMQEINTLLIALDKTWDDDLLPLCSQIFRRDIRASSELT
QAEAVKALGFLKQKATEQKVAA

ＵＰＩ０００００３４Ｅ６６Ｄ　Ｂｅｔ　［Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｈａｇｅ　ｐｈｉ　ＬＣ３］（配列番号１８０）

【化９４】

ANEIDIYDAKNLNTATVKKFLKGGGQASDEELAMLLAISRNQNMNPFMKEVYFIKYGS
AAAQIVVSRDFYRKRAFQNPNFAGIEVGVIVLNKDGVLEHNEGTFKTKDQELVGAWAR
VHLKNTEIPVYYVAVSYDEYVQMKNGQPNSMWTNKPCTMLGKVAESQALRMAFPAEFS
GTYGEEEYPEPEKEPREVNGVKEPDRAQIESFDKENYAARKIEELKEKAQPQKEFVEEIG
EAIDEITAEDF

ＵＰＩ０００１５Ｆ０Ａ７８（配列番号１８１）

【化９５】

STALATLAGKLAERVGMDSVDPQELITTLRQTAFKGDASDAQFIALLIVANQYGLNPWT
KEIYAFPDKQNGIVPVVGVDGWSRIINENQQFDGMDFEQDNESCTCRIYRKDRNHPICV
TEWMDECRREPFKTREGREITGPWQSHPKRMLRHKAMIQCARLAFGFAGIYDKDEAERI
VENTAYTAERQPERDITPVNDETMQEINTLLIALDKTWDDDLLPLCSQIFRRDIRASSELT
QAEAVKALGFLKQKASEQKVAA

ＵＰＩ０００１５０Ｄ６ＡＣ（配列番号１８２）

【化９６】

ANELGIFSVDNLNMTTIKQYLDGGGKASDAELVLLINLCKQNNMNPFMKEVYFIKYGN
QPAQIVVSRDFYRKRAFQNPNFVGIEVGVIVLNKDGVLEHNEGTFKTHEQELVGAWAR
VHLKNTEIPVYVAVSYDEYVQMKDGHPNKMWTNKPCTMLGKVAESQALRMAFPAEFS
GTYGEEEFPEPEKEPREVNGVKEPDRAQIESFDKEDYAAKKIEELKEKAQPQKEVVEETG
EVIDEEPLEGF

ＵＰＩ０００１５９４Ｅ５３（配列番号１８３）

【化９７】

TTALQTLTNKLAERFEMGDGSGLVETLKSSAFAGATVSDAQMIALLVIANQYQLNPWT
KEIYAFPGGNGGLTPIVGVDGWVRIINREPQYDGMEFHFTDDYSACTCTIYRKDRSKPIV
VTEFMGECKKSSPAWNSHPKRMLRHKAMIQCARLAFGFTGIYDQDEAERIAENEKPPK
NITPQNNVVETTAVELISEEQLSQIRQLMQVTGTEEAKILAYIGVQALNQIPKSQAEAVIK
KLNLTLDKQNAEKADNGESVGEEIPL

ＵＰＩ０００１５９６８Ｄ７（配列番号１８４）

【化９８】

AKNELAKGSYLTDLQKLDGNTLRDFVDPKHQASPQELQALLAIVKGRNLNPFTKEVYFI
KYGSAPAQIVVSKEAIMKRAEENPDFDGFEAGIVVETKDGAIERLTGTIVPKSATLRGGW
CKVYRKDRSHAIEADADFAYYTTSKNLWQKMPALMIRKVAIVSAFREAFSESVGGLYT
ADEMQRETQAEVRARKMKEAYEEKLYLLTQMEAKSYKKTKSKNENEAKKTKEAEAIE
TVEEPTQDGNLEW

ＵＰＩ０００１５Ｃ０１ＡＥ（配列番号１８５）

【化９９】

MAKENYSDPNGKLLNSITTFEVNGEEVKLSGNIIRDYLVSGNAEVTDQEIIMFLQLCKYQ
KLNPFLNEAYLVKFKNTKGPDKPAQIIVSKEAFMKRAETHEQYDGFEAGVIVERGGEIIE
LEGAVSLASDKLLGGWAKVFRKDRNRPVSVRISEKEFNKRQSTWNTMPLTMMRKTAV
VNAMREAFPDNLGAMYTEEEQGSLQNTETSVQQEIKQNANAEVLDIPSQQNEVPDFKE
VREPEHVEMPPIYGEQQSTPPARPY

ＵＰＩ０００１５Ｃ０２Ｅ０（配列番号１８６）

【化１００】

ATNDELKNQLANKQNGGQVASAQSLDLKGLLEAPTMRKKFEKVLDKKAPQFLTSLLNL
YNGDDYLQKTDPMTVVTSAMVAATLDLPIDKNLGYAWIVPYKGRAQFQLGYKGYIQL
ALRTGQYKSINVIEVRDGELLKWNRLTEEIELDLDNNTSEKVIGYCGYFQLINGFEKTVY
WTRKEIEAHKKKFSKSDFGWKKDYDAMAKKTVLRNMLSKWGILSIDMQTAVTEDEAE
PRERKDVTEDESIPDIIDAPITPSDTLEAGSEVQGSMI

50

ＵＰＩ０００１９Ｅ１Ｆ９Ａ（配列番号１８７）

【化１０１】

PQEIAKVEYTAADGQEVRLTPGVIAKYIVSGNGLASEKDIYSFMARCQARGLNPLAGDA
YMTVYQGKDGNTSSSVIVSKDYFVRTATAQDSFDGMEAGVTVLNGQGQIQKREGCEFF
PSLGEKLLGGWAKVHIVKDREHPSKAAVTMDEYDQHRSLWKSKPATMIRKVAIVQALR
EAYPGQFGGVYDRDEMPPSQEPQQVPVEVYEAPEAYETPDNQNRATEEF

ＵＰＩ０００１ＢＥＦ４８４（配列番号１８８）

【化１０２】

NTPTMKRKFEEVLHENANAFMSNVMTLVSNDSYLAESEPMSILSGALTAATLNLGLDK
NLGYAYLVPFNTKNKQTGKWERKAQFILGYKGYIQLAQRSGKYKALNVIEVYEGELLS
WNRLTEEFEFDPNGRQSDDVIGYVGYFELLNGFKKTVYWTKQEIEAHRIANSKDKEKTK
LSGVWATDYNAMARKTVLRNMLSKWGILSIEMQEATTSDEKVQQMQEDGNIISETEVE
ENTTMKTAEVINEADSDSLNQTDLFDTKNPPLE

ＵＰＩ０００１ＣＥ５９７Ａ　ＣＫ３＿２６３８０　［酪酸生産細菌ＳＳ３／４］（配列番号１８９）

【化１０３】

ENATAVQQAESQGTQDFSAPVKHNTDFSLGIFGSSDNFLMATQMAKAFASSTIVPKEYQ
GNFANGLVAMDIANRLKTSPFMVMQNLDVIQGRPAWRATFLIAMINRSKKYDIELQFEE
KRDKNGKPYSCTCWTTKDGRKVTGIEVTMDMAEAEGWTKKNGSKWITMPQVMLRYR
AASFFSRMNCPELSNGLYTTDEVYEMADSEYKVYNLEDEVKRDLAQNANKEEFVAPPN
ETAPESESKGSEPLDPAVENQKSGDTPDWMKPETM

ＵＰＩ０００１Ｄ２ＤＦ２２　ＲｅｃＴ　［Ｃｅｌｌｕｌｏｓｉｌｙｔｉｃｕｍ　ｌｅｎｔｏｃｅｌｌｕｍ］（配列番号１９０）

【化１０４】

SDKKELVLKETHSRLNQLLATKMEAMPKDFNQTRFLQNCMTVLQDTKGIENCHPVSIA
RTLLKGAFLGLDFFQRECYAIPYGGELQFQTDYKGETKMAKKYSIRDIKDIYAKVVRKG
DEFKEEIVAGQQVVDFKPLPFNDAEIIGAFAVVLYQDGGMEYETMSTKQIEGIRDNFSK
MKNGLMWTKTPEEAYKKTVLRRLTKKIEKDFASIDQAKAYEESSDMQFKQDEQKQDA
KDPFADAVDVEFTEETEGQVRLDGEADGAK

ＵＰＩ０００１Ｅ０Ｃ４９９（配列番号１９１）

【化１０５】

SNELMTKAVTYEVNNEEVKLSGQIVKQYLTSGQAVTDQEVTMFIQLCRYQHLNPFLNE
AYLVKFNGKPAQIITSKEAFMKRAESNPNYAGLKAGCIVERNGELIYTEGAFTLKTDNIL
GAWADVIRKDRREPITIVEISMDEFSKSQATWKSMPATMIRKTAIVNALREAFPQDLGA
LYTEDDKNPNEATQTTYKQEPEVNTTKTADVLAKKFSGAPQIKSVENVQESEEESNNAS
NHGEATEPVNNVEEPTATAEVEQGQLL

ＵＰＩ０００１Ｅ２ＡＦＣ１（配列番号１９２）

【化１０６】

TNNQLATQIKRDITTDPSLLTGADIKKYFDPQNLLTEKQVGQALALCKGRNLNPFANEV
YIVAYQNNSGTEFSLIVSKEAFMKRAERCEGYDGFEAGITVMRNGEMIEIEGSLKLPEDIL
IGGWAVVYRKDRSIIRYKVTVDFNEYVKTDRNGNPRSTWKSMPATMIRKTALVQTLRE
AFPDELGNMYTDIDGGDTFDAIKDVTPQESREDVVARKMAQIDQFNKEQEANHADPEP
TQNEDPIQGELLDGELEY

ＵＰＩ０００１Ｅ３５ＡＣＥ（配列番号１９３）

【化１０７】

TNNQIVEAKGDFLTNPQLLNSGIIRKYLDPQGKASDEELAYFIAQAKAQNLNPFTKEIYFI
KYGTQPAQIVTAKSAFEKKADSHPQFDGKEAGVIYLMDGEIKYSKGAFIPKGAEILGGW
AKVYRKDRTYPTETEVSFEEYDNSKIRARVKELTQQGKDVTYPVMNSYGKPIGENNWD
TMPCVMIRKVALVSAYREAFPAELGASYEADEIQLDNTPKDVTPQESREDVVARKMAEI
EQFNKEQEANHADPEPTQNEDPIQGELLDGELEY

ＵＰＩ０００２０ＢＡ２Ｅ０（配列番号１９４）

【化１０８】

NNEVMEKSVEYEVNGNSVKLTPNMIKQFITKGNADVTDQEAIMFMKLAEQQQLNPFLN
EVYLIKFKGKPAQNIVAKEAFMKRAEKHSEYDGLEAGIIVQRGEEIKELPGAVCLPTDNL
LGGWARVYRKDRKNPFYVQLDFKEFSKGQATWNQMPKNMIRKTAIVNALREAFPEAL
GAMYTEDDARLEEVKTAEPIKEKAETTQILENKFKELSENGQTEVGDEQTNESTEPEPTA
KQEQLL

ＵＰＩ０００２１２Ｆ３８２（配列番号１９５）

【化１０９】

TVQLVQPRNSDEYDFDQTKLDLIKRTICKGATNDELQLFIHACKRTGLDPFMRQIFAVKR
WDSSTKKEIMTIQTGIDGYRLIADRTGKYAPGKDTEFGYDNKGNIRWAKAYIKKMTPD
GQWHEISAIAFWEEYVQTTREGKSTLFWLKKSHIMLSKCTEALALRKTFPAERSGIYTKE
EMAQEFSPLEEHLVERIAASRNDQGRS

ＵＰＩ０００２２Ｆ８Ｂ４Ｄ（配列番号１９６）

【化１１０】

SNNQLSTQQAKRDIAIDTSVWTFQDVKRYFDPQNLLTEKQVGQALSLIKGRNLNPLANE
VYIVAYKKKTGGTEFSLIVSKEAFLKRAAQNPNYEGFEAGVVTVDTDGVMHERKGALM
LPGDTLVGGWARVYRKNFKVPVEIFVSREEYDKKQSTWNAMPATMIRKTALVNALRE
AFPEDLGNMYTEDDGGETFDRIKQAEPVESREDVMARKMAQIEQMKQEQAQRQIDTSY
PTDDVIDPDDEPAQGELLEDLEY

ＵＰＩ０００２３１４Ｂ７４（配列番号１９７）

【化１１１】

AITPNPIPAQDGSPIPSPDDIVGELARRKIYAGIPDDDVALALALCQKYGFDPLLKHLVLL
ATKDRDETTGQGQKHYNAYVTRDGLLHVAHTSGMLDGLETIQGKDDLGEWAEAVVY
RKDMSRPFRYRVYLSEYVREAKGVWKTHPQAMLTKTAEVFALRRAFDVALTPFEEMG
FDNQNIAGDTGPSPKTGFTEKAGFTGNTDFSAEASLPGKARFSTEAGLTDMTVIPPNRVT
GSIPETSRLNTSAGSTGRQRRQLF

ＵＰＩ０００２５ＣＡＤ２Ｅ（配列番号１９８）

【化１１２】

STALATLAGKLAERVGMDSVDPQELITTLRQTAFKGDASDAQFIALLIVANQYGLNPWT
KEIYAFPDKQNGIVPVVGVDGWSRIINENQQFDGMDFEQDDESCTCRIYRKDRNHPICV
TEWMDECRRAPFKTREGREITGPWQSHPKRMLRHKAMIQCARLAFGFAGIYDKDEAER
IVENTAYTTERQPERDITPVNEETMSEINALLTSMEKTWDDDLLPLCSQIFRRYIRASSEL
SQAEAEKVLGFLKQKATEQKVAA

ＵＰＩ０００２５ＣＦ４９Ａ（配列番号１９９）

【化１１３】

EKPKLIQRFAERFSVDPNKLFDTLKATAFKQRDGSAPTNEQMMALLVVADQYGLNPFT
KEIFAFPDKQAGIIPVVGVDGWSRIINQHDQFDGMEFKTSETKVSLDGAKECPEWMECII
YRRDRSHPVKITEYLDEVYRPPFEGNGKNGPYRVDGPWQTHTKRMLRHKSMIQCSRIAF
GFVGIFDQDEAERIIEGQATHVVEPSVIPPEQVDDRTRGLVYKLIERAEASNAWNSALEY
ANEHFQGVELTFAKQEIFNAQQQAAKALTQPLAS

ＵＰＩ０００２ＡＤ９２Ｅ７（配列番号２００）

【化１１４】

TTVNQTELKNKLAEKAKTPAKTGNTVFDLIRKMEPEIKRALPKQISPERFARIAMTAVRN
TPKLQACEPISFIAALMQSAQLGLEPNTPLGQAYLIPYGKEVQFQLGYQGMLTLAYRTGE
YQSIYAMPVYANDEFEYEYGLNEKLVHKPAPDPEGEPIYYYAVYKLKNGGHGFVVMSR
QQIERHRDKYSPSAKQGKFSPWNTDFDSMAKKTVLKQLLKYAPKSVEFATQIAQDETIK
TEIAEDMTEVQGIEVEYEATDDQENQENQEQED

ＵＰＩ０００２Ｂ７８７７１（配列番号２０１）

【化１１５】

EFETDEEEKEMSNNQLSTQQAKRDIAIDTSVWTFQDVKRYFDPQNLLTEKQVGQALSLI
KGRNLNPLANEVYIVAYKKKTGGTEFSLIVSKEAFLKRAAQNPNYEGFEAGVVTVDTD
GVMHERKGALMLPGDTLVGGWARVYRKNFKVPVEIFVSREEYDKKQSTWNAMPATM
IRKTALVNALREAFPEDLGNMYTEDDGGETFDRIKQAEPVESREDVMARKMAQIEQMK
QEQAQRQIDTSYPTDDVIDPDDEPAQGELLEDLEY

ＵＰＩ０００２Ｂ７８Ｂ３４（配列番号２０２）

【化１１６】

TTNQVVTHKNFFNAPNVQKSFDDVWKGAGVQFATSILSVIQGNASLKSASNESIMTSAM
KAAVLNLPIEPSLGRAYLVPYKGQVQFQLGYKGLIELAQRSGKYKSINAGPVYKSQFVS
YDPLFEELTLDFTQPQDEVIGYFASFSLLNGFRKLTYWTKAEVEAHGKKFSKTFGNGPW
KTDFDAMARKTVLKHILSIYGPLSVEMQTGMQNDESENDNATRDIKTAEPVNADQQLL
EDLMNVDTETGEILEEVSELKDNGELDLKYEDPNAR

ＵＰＩ０００２Ｂ８８４Ｆ０／ＷＰ＿００３１５８８７．１　Ｂｅｔ　［Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ］（配列番号２０３）

【化１１７】

GTALTPLLTKFATRYEMGTTPEEVANTLKQTCFKGQVNDSQMVALLIVADQYKLNPFT
KELYAFPDKNNGIVPVVGVDGWARIINENPQFDGMEFSMDQQGTECTCKIYRKDRSHAI
SATEYMAECKRNTQPWQSHPRRMLRHKAMIQCARLAFGFAGIYDQDEAERIVERDVTP
AEQYEDVSEAICLIKDSPTMEDLQSAFSNAWKAYKTKGARDQLTAAKDQRKKELLDAP
IDVEFEETGDDRAA

ＵＰＩ０００２ＣＢ４Ａ６７／ＷＰ＿０１０７９２３０３．１　Ｂｅｔ　［Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ］（配列番号２０４）

【化１１８】

GTALTPLLTKFATRYEMGTTPEEVANTLKQTCFKGQVNDSQMVALLIVADQYKLNPFT
KELYAFPDKNNGIVPVVGVDGWARIINENPQFDGMEFSMDQQGTECTCKIYRKDRSHAI
SATEYMAECKRNTQPWQSHPRRMLRHKAMIQCARLAFGFAGIYDQDEAERIVERDVTP
AEQYEDVSEAVCLIKDSPTMEDLQSAFSNAWKAYKTKGARDQLTAAKDQRKKELLDA
PIDVEFEETGDDRAA

ＵＰＩ０００２Ｅ４Ｃ０ＢＦ（配列番号２０５）

【化１１９】

SSIAAAAESAEVTPASIINKYRDDIATVLPPKLRERIDRWIRLAIGAVNSNPELISRVRADQ
GASMMQALMKCAALGHEPGSGLFHLVPKGSRIEGWEDYKGILQRIDRSGVYARTVIGV
VYANDEYSYDQNVDERPRIIVRATGDRGEPISSYAYAVYPSGAITTVAEATPEQIASSKS
KARGADNAASPWRAPGAPMHRKVAVRLLEKHVATSAEDRREPISRSAANDVVIDATA
DYYQEP

ＵＰＩ０００３２８２６７７（配列番号２０６）

【化１２０】

TNELTQTKGAYLTDLQKLDGATLRNFVDPKHQASPQELQTLLAIVKNRNLNPFTKEVYF
IKYGNNPAQIVVSKDAFMKRAEQNQNYDGFESGIIYEDASGELKNKKGVILPKNCTLIGG
WCEVYRKDRTRPVYREVELSAYNTGKNWWQKAPGQMIEKVAIVAAVRDSFSEDVGGL
YTSEEMEQAAPIDVTPQESQEEVRTRKMAQIEEMKREQEKHQSSAYPEDEIPNFEDEPLQ
GELLEEMEY

ＵＰＩ０００３３８５３ＡＦ（配列番号２０７）

【化１２１】

NERTNLQYAPAPVERFKECLNSHEIKARLKNSLKNNWTQFQTSMLDLYSGDAYLQKCD
PMAVALECVKAATLDLPISKSLGFAYVVPYNNVPTFTLGYKGLIQLAQRTGQYRTINAD
VVYEGEIRGADKLSGMVDLSGERTGDEVVGYFAYFKLINGFEKMIYMTRAEAEKWRD
DYSPSAKSKYSPWRTDFDKMALKTCIRRLISKYGIMSVEMQGVMTEEAEPRAAAAAKR
AEETVQANANSKVIDIDAAPPAANESPAEAAPQPDF

ＵＰＩ０００３４２７６９５（配列番号２０８）

【化１２２】

DYVTKIQEVLNRLLDAKHDALPSGFKKTRFSENCRAYVKEYTDLQKYDEEEVALVLFK
GAVLGLDFLAKECHVITEGSALRFQTDYKGEMALVKKYSVRPILDIYAKNVREGDVFRE
EISEGKPLIHFNPLAFNNSQIIGSFAVALFSDGGMVYETMPAEEIESIRRNYGKNPGSDTW
EKSQGEMYKRTVLRRLCKTIEIDFDAEQSLAYEAGSSFEFNREPQPKKRSPFNPPEVEESE
VLSDDGTSEAE

ＵＰＩ０００３５３０９１Ｆ（配列番号２０９）

【化１２３】

SNALTITQDQTEFTPKQLSVLENLGVQGAAPQEVAMFFDYCQRTGLSPWARQIYMIGR
WDRNLGRKKYAVQVSIDGQRLVAERSGVYEGQTAPQWCGPDGQWVDVWLANEPPQA
ARVGVWRKSFREPAYGVARLSSYMPVTRDGKPQGLWGTMPDVMLAKCAESLALRKA
FPLELSGLYTSEEMQQADAPRTEPAPVDEDVVDAEIVDDEERMQWVEAIQAAETTDVL
RKMWADIKTCPDALQAELRELIPARAKELAA

ＵＰＩ０００３８６Ｄ６３１（配列番号２１０）

【化１２４】

IECAKLGLEPNNILGQAYLVPVCVDGVNKVEFQLGYKGLIELAYRSGKIKSLYANEVFE
KDEFHIDYGLDQKLIHKPFLGGDRGEVIGYYAVYQMDNRGASFVFMTRDEILGHSRKYS
RSFGCDLWESEFDAMAKKTVIKKLLKYAPLSIELQKSVSVDESVKGIGCIGVI

ＵＰＩ０００３Ｅ３Ｄ２３７（配列番号２１１）

【化１２５】

GTALTPLLTKFATRYEMGTTPEEVANTLKQTCFKGQVNDSQMVALLIVADQYKLNPFT
KELYAFPDKNNGIVPVVGVDGWARIINENPQFDGMEFSMDQQGTECTCKIYRKDRSHAI
SATEYMAECKRNTQPWQSHPRRMLRHKAMIQCARLAFGFAGIYDQDEAERIVERDVTP
GEPVEDVTEALSLINSAPTMDDLQAAFSDAWKAYKSKGARDQLTVAKDQRKKELLEAP
IDVEFEETGDDRAA

ＵＰＩ０００４４Ｆ７１４３（配列番号２１２）

【化１２６】

STALATLAGKLAERVGMDSVDPQELITTLRQTAFKGDASDAQFIALLIVANQYGLNPWT
KEIYAFPDKQNGIVPVVGVDGWSRIINENQQFDGMDFEQDNESCTCRIYRKDRNHPICV
TEWMDECRREPFKTREGKEHGPWQSHPKRMLRHKAMIQCARLAFGFAGIYDKDEAERI
VENTACTAEHQPERDITPVNDETMQEINTLLIALDKTWDDDLLPLCSQIFRRDIRASSELT
QAEAVKALGFLKQKATEQKVAA

ＵＰＩ０００４９９５Ｂ９０（配列番号２１３）
【化１２７】
TNNQLATQTKRNITTDPSLLTGADIKKYFDPQNLLTEKQVGQALALCKGRNLNPFANEV
YIVAYTNRNGGKEFSLIVSKEAFLKRAAQCKDYEGFEAGVVVVDSEGVMHERKGAIML
PEDTLIGGWARVIIRKNFKVPVEIFVSREEYDKKQSTWNTMPATMIRKVALVNALREAF
PEDLGNMYTEDDGGETFDRIKDVTPQESREDVVARKMAQIEQFNKEQEANHADPEPAQ
TEETIQGELLDGELEY

ＵＰＩ０００５１Ｆ５８７６（配列番号２１４）
【化１２８】
SNREIEVIRACSKAGNNGGSSPWDSFPDEMARKAIVKRASKYWPRRDRLDTAIDYLNTQ
GGEGIILNADHIPERDVTPASDEIINEITQAITEINKTWDDLLPLCSKTFRRTIASHEYLSQE
EAVKTLDFVKKKAARNKATAEAKIHATTENNSEAVS

ＵＰＩ０００５８８Ｃ８４８（配列番号２１５）
【化１２９】
ATNDELKNKLANKQNGGQVASAQSLDLKGLLEAPTMRKKFEKVLDKKAPQFLTSLLNL
YNGDDYLQKTDPMTVVTSAMVAATLDLPIDKNLGYAWIVPYKGRAQFQLGYKGYIQL
ALRTGQYKSINVIEVREGELLKWNRLTEEIELDLDNNTSEKVVGYCGYFQLINGFEKTVY
WTRKEIEAHKKKFSKSDFGWKKDYDAMAKKTVLRNMLSKWGILSIDMQTAVTEDEAE
PRERKDVTDDESIPDIIEAPITPSDTLEAGSVVQGSMI

ＵＰＩ０００５９８ＣＤ４０（配列番号２１６）
【化１３０】
TNNQLATQTKRNITTDPSLLTGADIKKYFDPQNLLTEKQVGQALALCKGRNLNPFANEV
YIVAYTNRNGGKEFSLIVSKEAFLKRAAQCKDYEGFEAGVVVVDSEGVMHERKGAIML
PEDTLIGGWARVHRKNFKVPVEIFVSREEYDKKQSTWNTMPATMIRKVALVNALREAF
PEDLGNMYTEDDGGETFDRIKDVTPQESREDVVARKMAQIEQFNKEQEANHADPEPAQ
TEEPIQGELLDGELEY

ＵＰＩ０００５ＤＣＥＢＡＤ（配列番号２１７）
【化１３１】
TNNQLATQTKRNITTDPSLLTGADIKKYFDPQNLLTEKQVGQALALCKGRNLNPFANEV
YIVAYTNRNGGKEFSLIVSKEAFLKRAAQCKDYEGFEAGVVVVDSEGVMHERKGAIML
PEDTLIGGWARVHRKNFKVPVEIFVSREEYDKKQSTWNTMPATMIRKVALVNALREAF
PEDLGNMYTEDDGGETFDRIKDVTPQESREDVVARKMAEIEQFNKEQEANHADPEPAQ
TEESIQGELLDGELEY

ＵＰＩ０００５Ｅ４ＣＢ７４（配列番号２１８）
【化１３２】
TNNQLATQTKRNITTDPSLLTGADIKKYFDPQNLLTEKQVGQALALCKGRNLNPFANEV
YIVAYTNRNGGKEFSLIVSKEAFLKRAAQCKDYEGFEAGVVVVDSEGVMHERKGAIML
PEDTLIGGWARVHRKNFKVPVEIVVSREEYDKKQSTWNTMPATMIRKVALVNALREAF
PEDLGNMYTEDDGGETFDRIKDVTPQESREDVVARKMAEIEQFNKEQETNHADPEPAQ
TEETIQGELLDGELEY

ＵＰＩ０００５ＦＥＢ４Ｂ０（配列番号２１９）

【化１３３】

NEIQAYDKINDRDGMEMLGAAIQRSGMFGAETKEQGIILALQCMVEKKPPLEMAKNYH
IIQGKLSKRADAMLADFRKAGGKFIFADLKNPTVQKAKVTFEDYKDFDVEYSIDDAKTA
GVYNAKGAWVKYPGAMLRARLVSETLRAIAPEIVTGVYTPEELETPINAKPELKCAQPV
KAKPEPKKAQPDVIEATVCESELDAKLVELIGDREQIVNLYWEKKGLIDGLDTTWRDLN
DDTKRKMIDQFDQFMDAAQRKAAQ

ＵＰＩ０００６２００２Ｄ２（配列番号２２０）

【化１３４】

AENEKQALLQEENKSENVVSTVKRTALATNPFSDTDQFNNIFKMAQLISQSDMIPATYK
GKPMNCVIALEQANRMGVSPLMVMQNLYVVKGVPSWSGQGCMMIIQGCGKFRDVDY
VYSGEKGTDSRSCKVVATRISDGKRIEGTEITMQMVKSEGWISNTKWKNMPEQMLGYR
AATFFARMYCPNELNGFATEGEAEDMNHKPQRIEAINVLGDTAHE

ＵＰＩ０００６４Ｂ４４Ｃ１（配列番号２２１）

【化１３５】

TIMDLLNDPKMKSQIQRALPNGMSAERIARIALTALRMNPQLQECSPQSFAAALMTSAQ
LGLEPNTPLGHAWLIPRKNHGKMEVQFELGYKGMLDLVRRSGMITAIFAEEVREKDEFE
FEYGTNPYLKHKPYLGGDRGKVLFYYAVATFKDGGYAFKVMSIPEIEEARKLSQSANSP
YSPWNRFYDEMAKKTVLKRLCKYLPLSIEVQRNLAQDETIRTQIEADDILDLPNENEFEV
VEVEEIPGEEEKEEAKEGPFPNKALRESPTPLT

ＵＰＩ０００６４Ｄ５Ｅ１３（配列番号２２２）

【化１３６】

STALTTLTSQLSQRFKLDGGEELLTTLKQTAFKGQVTDAQMTALLIVANQFGLNPWTKE
IYAFPDKNGGIVPVVGVDGWARIINEHPQFDGMDFEMDGEQSCTCVIYRKDRTRPIRITE
YMAECKKTGGGPWQSHPRRMLRHKAMIQCARMAFGFGGISDEDDAERIREKDITPQAE
VVPKALEPYPADKFEENFEQWKSLIESGRRSADDVIAKIKSRNTMTDEQETRLRACGGE
EGKTYENA

ＵＰＩ０００６５Ｃ２Ｄ４７　Ｂｅｔ　［Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｈａｇｅ　ＰＳ－１］（配列番号２２３）

【化１３７】

SNVATIKPSSLSARMAERFGVDPNEMMATLKATAFKGQVSDAQMQALLIVADQYGLNP
WTKEIYAFPDKGGIVPVVGVDGWSRIINENGAFDGMDFQQDDESCTCIIYRKDRNHPIK
VTEWMAECKRNTQPWQSHPKRMLRHKAMIQCARLAFGYTGIFDEDEAQRIVEKDVTP
AVNEPDITPALEAIKNASSMEELHAAFKAAWNQHPSARARLTAVKDERKKALSEPIEGE
LVENEDGPAQQ

ＵＰＩ０００６７Ａ７３４９　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｈａｇｅ　ＡＰＣＭ０１］（配列番号２２４）

【化１３８】

AKNELVKGEYLTDLQKLDGNTLRNFVDPKHRASPQELQALLAIVKNRNLNPFTKEVYFI
KYGSAPAQIVVSKEAIMKRAEENPNFDGFEAGIVIETKSGSIERLTGTIAPKRAELRGGWC
KVYRKDRSHAIEADADFAYYTTGKNLWQKMPALMIRKVAIVSAFREAFSESVGGLYTA
DEMEQNNTQETQEEVRARRMKQAYEEKLRLLTEMEAKSYKKVEDESASKEIEAAKTTK
NTKEVEVIEETEVTEEPTQEDSLEW

ＵＰＩ０００６ＣＥ３Ｆ５Ｄ（配列番号２２５）

【化１３９】

STALATLAGKLAERVGMDSVDPQELITTLRQTAFKGDASDAQFIALLIVANQYGLNPWT
KEIYAFPDKQNGIVPVVGVDGWSRIINENQQFDGMDFEQDNESCTCRIYRKDRNHPICV
TEWMDECRREPFKTRDGREITGPWQSHPKRMLRHKAMIQCARLAFGFAGIYDKDEAER
IVENTIYTTDRQPERDITPVSDETMREINDLLITMNKTWDDDLLPLCSQIFRRDIGASSDL
TQIEAVKALGFLKQKAAEQKVEA

ＵＰＩ０００７８Ｅ９０ＢＥ　ＲｅｃＴ　［Ｐｉｒｅｌｌｕｌａ　ｓｐ．　ＳＨ－Ｓｒ６Ａ］（配列番号２２６）

【化１４０】

SEATKEAKPETAIAKKPNGIKDWLKSDALKTQIASVAPKHMAPERVMRIALNAVSRTPK
LADCTPESFMRCLLDLSSWGLVPDGRHAHLIPYGTECTLVLDYKGLVTLAYRSGWVKKI
HADVVFEGDIFVYSLGTVCQHIPWEFRDDANKPEHKGHFRAAYCVVTMADGIEKHEV
MTASEIDAIKAKSRSGNSGPWKDHYTEMAKKTVYRRASKWLPLSPEQADAMERDDDRI
IDAVSVAVTQRLSKAAMPLIGANETGDTE

ＵＰＩ０００７８ＥＢＥ９１　ＲｅｃＴ　［Ｐｉｒｅｌｌｕｌａ　ｓｐ．　ＳＨ－Ｓｒ６Ａ］（配列番号２２７）

【化１４１】

SEATKEAKPETAIAKKPNGIKDWLKSDALKTQIASVAPKHMAPERVMRIALNAVSRTPK
LADCTPESFMRCLLDLSSWGLEPDGRHAHLIPYGTECTLVLDYKGLVTLAYRSGWVKKI
HADVVFEGDIFVYSLGTVCQHIPWEFRDDANKPEHKGHFRAAYCVVTMADGIEKHEV
MTASEIDAIKAKSRSGNSGPWKDHYTEMAKKTVYRRASKWLPLSPEQADAMERDDDRI
IDAVSVAVTQRLSKAAMPLIGANETGDTE

ＵＰＩ０００７８ＥＤ０２１（配列番号２２８）

【化１４２】

SEIQQQAEAQTQAHPTAVLDDYRGAIASVAPPGTNIDLFIRMTKSNVNRSDEIVAAVKR
NPGLFMQAVMDSAALGHIPGSEYYYLTPRRDGISGIESWKGVAKRIFNTGRYQRIVCEV
VYEGEQWEFQPGEDLKPKHVIDWDARQVGSKVRFTYAYAVDFEGNPSTVAVCTKLDL
DKAQKQSRGKVWDQWYEQMAKKTAIKRLEDFVDTSAVDLRADGSSRRHSAEVAE

ＵＰＩ０００７９５Ｄ８１５（配列番号２２９）

【化１４３】

ASKNEAIEVSPAEIASVKEKPASIVKAEKAKKEPCALVKYEDAEGREVVLTREDIINTISS
NPRITDKEIKLFIELARAQKLNPFTREIFITKYGDYPATFIVGKDVFTKRAQSNPLFKGMQ
AGIIVQRGNAVDQREGSATFGDEMLIGGWCKVYVQGYDVPIYDSVSFNEYAARKTDGT
LNAMWASKPATMIRKVAIVHALREAFPSDFQGLYDQSEMGLSGQGGE

ＵＰＩ０００７９Ｂ１３５Ｂ（配列番号２３０）

【化１４４】

ATSLKRAVTGDGKPATVQQLLTNPKIKSQIALALPQHLTPERLTRIVLTEIRRTPALAKCK
PESLLAAVMQCAQLGLEPGGSLGHAWLMPFKNEVQFIIGYRGMIDLARRSGQVLSIEAR
GVYESDTFHVSFGLEPDLTHQPDWDPADRGKLAFVYAVARLKDGGFQFDVMSRAEVE
KIRAQSPAGKSGPWVTHFEEMAKKTVIRRLFKYLPVSVEMARAVGLDEAAERGEQSDA
IDADCVIESEEEATPEEKGDSAA

ＵＰＩ０００７Ｂ４５ＥＣ７（配列番号２３１）

【化１４５】

SEISKAVATQQNPLAVVARYKRELGTVLPTVLRQDPDRWLMAAENAARKNPDIMAVT
KADQGASYMRALVECARLGHEPGSKDFHFIKRGNAISGEESYRGIIKRVLNSGFYRSVV
ARTVFSNDTYSFDPLTDIVPNIIVPAQGDRGKPLSAYAFAVIIWDGTPSTVAEATPERIAT
AKAKSFASDKPTSPWQLPTGVMYRKTAIRELEPYVHVAPEPQPRRHLDGTVGGIPATDF
DVDDGDVLDITADQLAEAGEIV

ＵＰＩ０００７Ｂ６４２ＦＥ（配列番号２３２）

【化１４６】

SELQQAAQGQADAGPVQVIYSHAKEIQNVLAKGTDMDRWLQMARLAVMRDPNLVNA
AKRDPGSLMQAMLDCAEKGHIPGTEDYYLVPRKGGIQGMESWKGIAKRIMRSGRYQSI
VAEVVYEGEDFDFNPNTMDRPVHQIKYMARTSGQPVLSYAYAVDHEGKPSTIAVADPR
YIAKVKANSKGTVWADWDEAMYKKTAVKMLVDYVDTSSTDRRGVSTVQVDGPVGTF
IDGVLEIEGGDQ

ＵＰＩ０００７Ｂ６４６９３（配列番号２３３）

【化１４７】

SELQQAAQGQQSNNPVSFIYSHAKDIQNVLTKGTDMDRWLQMARLAVMRDQNLVASA
KRDPGSLMQALLDCAEKGHVPGTEDYYLVPRKGGIQGMESWKGIAKRIMRSGRYQSIV
NEVVYEGETFEFNPNTMDRPVHNINYMTRTSGKPVMSYAYALDHDGKPSSVAIADPRYI
AKVKKNSRGSVWEDWDEQMYRKTAVKMLQDYVDTSSVDRRDVSTVQVDDANVIDV
DDTFTAREAGE

ＵＰＩ０００７ＢＣＡＥＡＢ（配列番号２３４）

【化１４８】

TQDLATAIADQQPAQRRTAFDLVESMRGELHKALPEHASIDNFLRLALTELKMNPQLGN
CSGESLLGALMTAARVGLEVGGPLGQFYLTPRRLKRDGWAVVPIVGYRGLITLARRAG
VGQVNAVVVHEGDTFREGASSERGFFFDWEPAVERGKPVGALAAARLAGGDVQHRYL
SLAEVHERRDRGGFKDGSNSPWATDYDAMVRKTALRALVPLLPQSTALSFAVQADEQ
VQRYDAGDIDIPALDETDTEDTK

ＵＰＩ０００７Ｆ１３Ｂ７８（配列番号２３５）

【化１４９】

TNQLAHKDFFNTPAVKQKFQEVLNGNERQFTASLLSIVNNNKLLARASNTSIMTAAMK
AAVLNLPIEPSLGFAYIVPYGQDAQFQLGYKGLIQLAIRSGQFKAINSGKVYKAQFKSYD
PLFETLDIDFTQPEDEVYGYFATFELVNGFKKLTFWTKEQAESHGKRFSKTYAKGPWST
DFDAMAQKTVLKSILSKYAPLSTEMQEGLISDNQTEEVETDPIDVTPKNEDTQTLLSDLM
SDEAESETEKV

ＵＰＩ０００８６５Ｆ４３Ｄ（配列番号２３６）

【化１５０】

TSQQLDTTHTINQQVTTFRHTLVQMKNEIAAALPAHMTGDRFLRLILTEVRKNPELAECS
TESIFGGILTAAALGLEPGLNGECWLIPRKVGKGPGSRKEATFQVGYKGIIKLFWQNPLA
SYLDTGVVYANDAWKFRKGLDPILEHTPATGDRGAVRGYYAVVGLTTGARIFDFFTPK
QISALRGTAGPNGGISDPEHWMERKTALLQVMKMAPKSTDLASAASVDGTVQTVEAA
AQVAAASTGPVNPTTGEVLEAEPVEGGAA

ＵＰＩ０００８６５ＦＢ１５（配列番号２３７）

【化１５１】

TQQMPIEAQGEPTKELQQKAAVDRFNATLHQMQNEIARALPKHMTGDRFVRIVLTEVR
KDPTLALCDPLTMFGSLLTAAALGLEPGLNGECWLVPRKNHGTLEAQLQVGYRGVVKL
FWQNPAAAYLDTGYVCERDHFRFAKGLNPILEHTPAEGDRGKVVRYYAVAGLNTGAR
VFDVFTPAQIKTLRGGKVGSNGDIPDPEHWMERKTALLQVLKLMPKSTQLAAVPAADG
RAHTISDAQQIFGGVDTSTGEVLEAEPVEGDAA

ＵＰＩ０００８Ｄ１８５３９（配列番号２３８）

【化１５２】

ETIDIKQELASQAQTDSKKEVKLTKAMSIAEMIKAMMPEIKRALPSMITPERFTRIALSAL
NNTPELQACTPMSFISALLNAAQLGLEINSPLGHAYLIPYKNKGVLECQFQIGYLGLIALA
YRNELMQTIQAQCVYENDEFLYEYGLNPKLVHRPATSDRGEPVFFYGLFKMINSGFGFC
VMSKQEMDEFARTYSKGLASSFSPWKTSYNEMAKKTVIKQALKYAPIKTDFQKALSTD
ESIKYAISEDMTEAVNEIVSQNTEVA

ＵＰＩ０００８Ｄ９９０ＣＢ（配列番号２３９）

【化１５３】

SNLKNQLANKAGGTATKKQPQTMQDWIKVMEPQIKKALPSVITAERFTRMALTAISTNP
KLAECTPESFMGALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYGKSVQFQVGYKGLMELAQRSGQ
FKSIYAHTVYENDEFEVEYGLTQNIVHKPNFDDRGKPIGFYAVYKLTNGGENFVFMTQR
EVEEFGKAKSKTFNNGPWKTDFEAMAKKTVLKQLLKYAPIKVEFQREIAQDATIKTEIA
EDMTEVPEEMVEAEYEVVEQNTMAEDADLKGTPFETK

ＵＰＩ０００８Ｅ１２２３１（配列番号２４０）

【化１５４】

SNNELLAKPVEFEVNGEAVKLTGKTVKNFLVSGNGEVSDQEVVMFINLCKYQKLNPFL
NEAYLVKFKSKSGPDKPAQVIVSKEAFMKRAEKHPNYEGFEAGIIVERDGQLVDIEGAIK
LTNDKLVGGWARVYRSDRQKPITTRISLSEFSKGQSTWNSMPLTMIRKSAIVNAQREAF
PETLGALYTEDDAKLDTTSSHDQEQVIEQEIKTKANQEVIDVEYTEESEQKSPQQEQTET
TQAGPGF

ＵＰＩ０００８ＥＡ８６３３（配列番号２４１）

【化１５５】

ATNSSLKNQLSKKENVTIGNTMQGLLNNPKMKKRFEEILDKKAPQYMSSILNLYNGDTS
LQKCEPMSVLSSSMIAATMDLPVDKNLGYAWIVPYKNKAQFQMGYKGYIQLALRTGQ
YKIIINAIEIIEGELVNWNPLTEELEIDFTKKESDKIIGYAGYFELLNGFKKSTYWTKTQIE
NHRKKFSKSDYGWNKDFDAMAIKTVIRNMLSKWGILSIEMQNAYTADENIIKDSFIDDS
ENVSANIEDLVEADYTVNQDSLESKEEFEGTPLE

ＵＰＩ０００９１Ｆ１ＥＢ０（配列番号２４２）

【化１５６】

KKMTVMKTSAPLCYADVAEVKCEEFYEDQYKAGAEELFDNTSYDRLKVYLEKHGGLE
GVHADVVRAGDTFVYRPGVIRRHGYVPGEQRGQVYAVYAKAHIKGGATRCVILARHE
VEIDMDAKHGGNPDGDWENLAKVVALRSLAEALPLPSAVLQSCRTWSAK

ＵＰＩ０００９５８Ｅ１１５（配列番号２４３）

【化１５７】

SNPPLAQADLQKTQGTEVKTKTKDQQLIHFINQPSMKAQLAAALPRHMTPDRMIRIVTT
EIRKTPALANCDMQSFIGAVVQCSQLGLEPGINALGHAYLLPFGNGKAKSGQSNVQLIIG
YRGMIDLARRSNQIISISARTVRQGDSFIIFEYGLNENLTIIVPGENEDSPITIIVYAVARLK
DGGVQFEVMTHNQIEKVRASSKAGQNGPWVSHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQK
AVILDEKAEANVDQENASVFEGEFEEVSQSA

50

ＵＰＩ０００９８０５Ｃ１Ｄ（配列番号２４４）

【化１５８】

ANELGIFSVDNLNMTTIKQYLDGGGKASDAELVLLINLCKQNNMNPFMKEVYFIKYGN
QPAQIVVSRDFYRKRAFQNPNFAGIEVGVIVLNKDGVLEHNEGTFKTHEQELVGAWAR
VHLKNTEIPVYVAVSYDEYVQMKDGHPNKMWTNKPCTMLGKVAESQALRMAFPAEFS
GTYGEEELPEPEKEPREVNGVKEPDRAQIESFDKEDYAAKKIEELKEKAQPQKEVVKET
GEVIDKITAEDF

ＵＰＩ０００９８０５Ｆ６３（配列番号２４５）

【化１５９】

ANELGIFSVDNLNMTTIKQYLDGGGKASDAELVLLINLCKQNNMNPFMKEVYFIKYGN
QPAQIVVSRDFYRKRAFQNPNFAGIEVGVIVLNKDGVLEHNEGTFKTHEQELVGAWAR
VHLKNTEIPVYVAVSYDEYVQMKDGHPNKMWTNKPCTMLGKVAESQALRMAFPAEFS
GTYGEEELPEPEKEPREVNGVKEPDRAQIESFDKEDYAARKIEELKEKAQPQKEVVKET
GEVIDEITAEDF

ＵＰＩ０００９８８０６９０（配列番号２４６）

【化１６０】

TNNQLVEAKGDFLTNPQLLNSGIIRKYLDPQGKASDEELAYFIAQAKAQNLNPFTKEIYFI
KYGTQPAQIVTAKSAFEKKADSHPQFDGKEAGVIYLLDGEIKYSKGAFIPKGAEILGGW
AKVYRKDRTYPTETEVSFEEYDNSKIRARVKELTQQGKDVTYPVMNSYGKPIGENNWD
TMPCVMIRKVALVSAYREAFPAELGASYEADEIQLDNTPKDITPQENREDVIARKMAQIE
QFNKEQAHTDPEPTQTEEPIQGELLDGELEY

ＵＰＩ０００９Ｆ５Ｅ５３２（配列番号２４７）

【化１６１】

RTDGTKEAGAAATAPTEGKAPAKAHKPADTIGAMIEKLKPQIERALPKHVTPDRMARM
ALTAIRNNPKLGQAEAVSLMGSIIQASQLGLEPNTPLGQCYIIPYNSKNGMQAQFQMGY
KGIVDLAHRSGQYRQLTAHPVDEADEFRYSYGLNPDLVHVPAEKPSGKITHYYAVYHL
TNGGFDFRVWSREKVEAHAKQYSKSFSSGPWQTNFDQMACKTVMIDLLRYAPKSVEIA
KATSADNRTHTINPEDPDLNIDTIDGDFELEGEER

ＵＰＩ０００９Ｆ８Ｆ６０４（配列番号２４８）

【化１６２】

EALLLRRWQMGNLTKTTGFALAPQNLEQAMQLATMICNSQLAPNNYKGKPEDTLVAM
MMGHELGLNPLQSIQNIAVINGRPSIYGDALLALVQNSPAFGGIQESFDEDTMTATCTV
WRKGGEKHTQHYSKDDADTAGLWGKQGPWKQHPKRMLAMRARGFAVRNQFADALA
GLVTREEAEDMEKEINPTPAPQAQSKRIGQKQSRTQYSESDFNENFPKWKAAVESGKKT
SEQIISMVSTKGDLTQGMIEAIESIEAGEPA

ＵＰＩ０００Ａ０８Ａ７９４（配列番号２４９）

【化１６３】

GHLVSKTEQDYIKQHYAKGATDQEFEHFIGVCRARGLNPAANQIYFVKYRSKDGPAKP
AFILSIDSLRLIAHRTGDYAGCSEPIFTDGGKACTVTVRRNLKSGETGNFSGMAFYDEQV
QQKNGRPTSFWQSKPRTMLEKCAEAKALRKAFPQDLGQFYIREEMPPQYDEPIQVHKP
KALEEPRFSKSDLSRRKGLNRKLSALGVDPSRFDEVATFLDGTPDRELGQKLKLWLKEA
GYGVNQ

ＵＰＩ０００Ｂ３６ＢＤ３Ｆ（配列番号２５０）

【化１６４】

TDVKQELERKVGKQDSTAVRLTKNMSIPDMIKALEPEIRRALPAVLTPERFLRMALSAV
NNTPKLAECTPMSFIAAMVNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKNQLECQFQIGYKGHDL
AYRTGQMQMIQAHAVHEFDDFEYEYGLNPKLIHRPGDGNRGEITYFYGLFKLVNGGFG
FEVMNREAMEAFAQQYSQSYGSQYSPWVKNFEDMAKKTVIKKALKYGPVKAEFQKAI
SMDETIKTEIAVDMTEVQNEESE

ＵＰＩ０００Ｂ３８Ｂ３７４（配列番号２５１）

【化１６５】

ENEVMTQDQAYEVASPFGSSENFQKLFDIGKMFASSSLVPDRYRGKPMDCTIAVDMAN
RMGVSPMMVMQQLYVVKGNPQWSGQACMSLIRGSSEYKNVRPVYTGKKGEDSWGC
YIEAEKKKTGEIVKGTEVTIAMAKAEGWYSKKDKYGNETSKWQTVMPELMLAYRAAAF
FARVYIPNALMGCAVEGEAEDIMKRAITAEDPFKEDAK

ＵＰＩ０００Ｂ４９Ｂ５Ｄ９（配列番号２５２）

【化１６６】

TLQAVCPTQDKAVESQLDQTKFELIKRTICKGTTDDEFQLFIHACKRTGLDPFMRQIFAV
KRWDSAERREVMTIQTGIDGYRLIADRTGRYAPGRDAEFGYDAHGGLRWAKAYVKKM
TPDGHWHEISATAFWTEYVQTTKDGRPTVFWMKKGHVMLSKCAEALALRKTFPAELS
GIYTQEEMAQTMSLPDTKGDSQTIGSDKAYEIERSIDNDPEFKTQLLTRLQRAFGCKSFS
DLPQDQFKNVKKVIENHQIKEKIA

ＵＰＩ０００Ｂ４ＢＥＦＥ６／ＷＰ＿０８８２５８６２４．１　Ｂｅｔ　［Ｆｉｍｂｒｉｇｌｏｂｕｓ　ｒｕｂｅｒ］　（配列番号２５３）

【化１６７】

TDIAHRSYSAPQLSLIRRTVAKDTNQDEFDLFIEICKQQGLDPFKKQIFAQVYNKDKADK
RQIVIVTSIDGYRAKAQRCGDYRPAEEETRFEADAALKIRRQPMGSFVRSCGLQVRPGQ
GVVSRVGEARWDEFAPLDDAEFDWVDTGETWPDTGKPKKKKVAKSAKKTLKEGNWK
NMPHVMLGKCAEAQALGGGGRKRSAACTSKRRWTRSTWT

ＵＰＩ０００Ｂ５６６１ＡＡ（配列番号２５４）

【化１６８】

TASKQTDIFSFVSGGEDITITLADIKNYFCANATDQECVLFGQLCKANGLNPWLKEAYLI
KYDKNAPAAMVTGKDAYMKRANEHPAFDGYEAGVKVYLPDVGQVEYREGTAYYEDL
GEQLIGGYAKVYRKDRSRPYYEEVPLKEYDTKQSKWKTSPATMIRKVALVHALREAFP
TNIQGMYDADETPYAADYEGSFREMDDPTPAPSMRGRIAPAPVADPLEDLEADVIEAGD
VE

ＵＰＩ０００Ｂ９４Ｂ１Ｄ１（配列番号２５５）

【化１６９】

ADLTKTANGADLAAAIGGKQAETGRATAFDLVKSMEAEFAKALPRHVPVEQFMRTAV
TELRQNADLQRSTSESLLGAFLTAARLGLEVGGPMGEFYLTPRFAKLPGQDQKAWQVV
PIVGYRGLVKLARNAGVGAVKAWVVYEGDHFVEGANSERGPFFDFHPVPGDPAGRKE
VGVLAVARLSGGDVQHTYLTIEQVEKRKARGSAGDKGPWATDRAAMIRKSGIRALAGE
LPQSTLLALARVVDEEVQTYVPGSLVDVGTGELEA

ＵＰＩ０００ＢＤ０４ＥＣＥ（配列番号２５６）

【化１７０】

NTELETMNNVYDNLQSVIMQQGIAALLPAQVTPEQFTRTAATALIENVDLQNADKQSLV
LALTRCAKDGLMPDGREAALVVRSTKVNKQFVKKAVYMPMVDGVIKRARQSGQVANI
IAKVVYSQDEFEYVIDENGEHLTHRPAFVDGDDIVKVYAFAKLNSGELVVEVMSRAGV
EKIRDTVQSAKYDSSPWVKWFDRMALKTVIHRLARRLPCASELFSLFEVYEDANSTEKT
LRMAPASFKRLSIN

ＷＰ＿０３２６８６９４１．１　ＲｅｃＴ　［Ｒａｏｕｌｔｅｌｌａ　ｐｌａｎｔｉｃｏｌａ］（配列番号２５７）

【化１７１】

TKQPPIAKADLQKTQGTRVSSPKGNNDVISFINQPSMKEQLAAALPRHMTAERMIRIATT
EIRKVPALASCDTMSFVSAIVQCSQLGLEPGGALGHAYLLPFGNKNEKSGKKNVQLIIGY
RGMIDLARRSGQIASLSARVVREGDEFSYEFGLEEKLTHRPGENEDAPVTHVYAVARLK
DGGTQFEVLTSKQIELVRSQSKAANSGPWVTHWEEMAKKTAIRRLFKYLPVSIEIQRAV
SIDEKEALTIDPADTSVLTGEYSVINSESEE

ＷＰ＿０６９７２８５１５．１　ＲｅｃＴ　［Ｐａｎｔｏｅａ　ｂｒｅｎｎｅｒｉ］（配列番号２５８）

【化１７２】

SNQPPIASADLQKTQQSKQVANKTPEQTLVGFMNQPAMKSQLAAALPRHMTADRMIRI
VTTEIRKTPQLAQCDQSSFIGAVVQCSQLGLEPGSALGHAYLLPFGNGRSKSGQSNVQLII
GYRGMIDLARRSGQIVSLSARVVRADDEFSFEYGLDENLVTIRPGENEDAPITHVYAVAR
LKDGGTQFEVMTVKQVEKVKAQSKASSNGPWVTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEM
QKAVVLDEKAESDVDQDNASVLSAEYSVLESGDEATN

ＷＰ＿０４５９５８２９４．１　ＲｅｃＴ　［Ｘｅｎｏｒｈａｂｄｕｓ　ｐｏｉｎａｒｉｉ］（配列番号２５９）

【化１７３】

TNTPPLAQADLQKAQPQTKVAATKDQALIQFINKPSMKAQLAAALPRHMAPDRMIRIVT
TEIRKTPALANCDMQSFVGAVVQCSQLGLEPGSALGHAYLLPFGNGKSKTGQSNVQLII
GYRGMIDLARRSGQIVSISARTVRDGDQFHYEYGLNENLTHIPGENEDAPITHVYAVARL
QDGGVQFEVMTRKQVEKVREKSSAGNNGPWVTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQ
KAVILDEKADANIDQDNAAIFEGEFEEVGNDG

ＷＰ＿１０２０８６７７９．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｒｏｔｅｕｓ　ｍｉｒａｂｉｌｉｓ］（配列番号２６０）

【化１７４】

SNPPLAQADLQKTQGTEVKTKTKDQQLIHFINQPSMKTQLAAALPRHMTPDRMIRIVTT
EIRKTPALANCDMQSFIGAVVQCSQLGLEPGNALGHAYLLPFGNGKAKSGQSNVQLIIG
YRGMIDLARRSNQIISISARTVRQGDSFHFEYGLNENLTHVPGENEDSPITHVYAVARLK
DGGVQFEVMTHNQIEKVRASSKAGQNGPWVSHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQK
AVILDEKAEANVDQENASVFEGEFEEVGSNGN

ＷＰ＿１０９６１５０６７．１　ＲｅｃＴ　［Ｅｄｗａｒｄｓｉｅｌｌａ　ｐｉｓｃｉｃｉｄａ］（配列番号２６１）

【化１７５】

TNNQQPPIATADLQKAQSQAPAVKPDQKLINFINQPSMKGQIAAALPRHMAPDRMIRIIT
TEIRKTPALATCDMQSFIGSVVQCSQLGLEPGGALGHAYLLPFGNGKAKSGQSNVQLIIG
YRGMIDLARRSGQIVSISARTVRDGDQFHYEYGLDETLKHVPGDNESSPITHVYAVAKL
KDGGVQFEVMTFNQIEKVRGQSKAGNNGPWQTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQ
KAVILDEKAEANIDQENASVISAEFSVVED

ＷＰ＿１２４５３７５９４．１　ＲｅｃＴ　［Ｍｏｒｇａｎｅｌｌａ　ｍｏｒｇａｎｉｉ］（配列番号２６２）

【化１７６】

SNPPIAQADLQKAQGTAVKEKTKDQQLIQFINQPGMKAQLAAALPRHITPDRMIRIVTTE
IRKTPSLATCDMQSFIGAVVQCSQLGLEPGNALGHAYLLPFGNGKAASGQSNVQLIIGYR
GMIDLARRSGQIISISARTVREGDSFHFEYGLNEDLTHVPGENDSGPITHVYAVARLKEG
GVQFEVMSFSQIEKVRDSSKAGKNGPWVSHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQRAVIL
DEKAEANVDQEHASIFEGEYETVSPE

ＷＰ＿００６６５７６２２．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｒｏｖｉｄｅｎｃｉａ　ａｌｃａｌｉｆａｃｉｅｎｓ］（配列番号２６３）

【化１７７】

STPPLAKSDLQKTQGTEVKIKTNEQKLVEFINQPGMKAQLAAALPKHITSDRMIRIVSTEI
RKTPSLANCDIQSFIGAVVQCSQLGLEPGNALGHAYLLPFGNGKSDNGQQNVQLIIGYR
GMIDLARRSGQIISISARTVRQGDNFHFEYGLNENLTHIPEGNEDSPITHVYAVARLKDG
GVQFEVMTYNQIEKVRNLSKAGKNGPWVTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQKAVI
LDEKAEANIEQEHSAIFEAEFEEVDSNGN

ＷＰ＿１０９４０１４３８．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｒｏｔｅｕｓ　ｔｅｒｒａｅ］（配列番号２６４）

【化１７８】

SNPPLAQADLQKTQGTEVREKTKDQMLVEFINKPNMKAQLAAALPRHMAPDRMIRIVT
TEIRKTPELANCDMQSFVGAVVQCSQLGLEPGNALGHAYILPFEKKRKQGNQWVTVRT
DAQLIIGYRGMIDLARRSGQIVSISARTVRQGDSFHFEYGLNENLTHVPGENEDSPITHVY
AVARLKDGGVQFEVMTHNQIEKVRTSSKAGQNGPWVSHWEEMAKKTVIRRLFKYLPV
SIEMQKAVILDEKAEANVDQENSSVFEGEFEEVGQGA

ＷＰ＿１１５１４９７８４．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｌｅｓｉｏｍｏｎａｓ　ｓｈｉｇｅｌｌｏｉｄｅｓ］（配列番号２６５）

【化１７９】

SNQRPPIATADLQKAQSQPPAAKPEQNLINFINQPSMKSQIAAALPRHMAPERMIRIITTEI
RKTPKLATCDVQSFIGAVVQCSQLGLEPGGGLGHAYLLPFGNGKAESGKPNVQLIIGYR
GMIDLARRSGQIVSISSRIVREGDQFHIYEYGLNETLKHIVPGDNESAPITIVYAVAKLKDG
GTQFEVMSFNEIEKIRGQSKAGNDGPWIKHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQRAVIL
DEKAEADIEQDNASIIGAEYSVVENAA

ＷＰ＿０３４９１０１０７．１　ＲｅｃＴ　［Ｇｉｌｌｉａｍｅｌｌａ　ａｐｉｃｏｌａ］（配列番号２６６）

【化１８０】

SEQNQPPIAKSDLEKTQLTNQDKKPATLAELVNSPKIKNQLAMALPKHMNPDRMARIVT
TEIRKTPALADSNIQSFLGAVVQCSQLGLEPGGALGHAYLLPFGNGKAKDGKSNVQLIIG
YRGMIDLARRSGQIISISARTVREGDDFHYEYGLNEDLKHTPKADESAPITYVYAVARLK
DGGSQFEVMTFNQIESVRKQSKAGDKGPWITHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEIQQAVI
LDEKAEAGISQDNEMILDADFSVVEA

ＷＰ＿０１６９７９８７８．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ］（配列番号２６７）

【化１８１】

NSTAETATPFSSQDLEKTQPTKAQSKTGSLASLLASPKMKSQFAAALPKHMTPERMARI
VTTEIRKNPELVKCEQHSFLGAVIQCAQLGLEPGNTLGHAYILPYGKQAQLIIGYRGMID
LARRSGQIISISARTVREGDYFEYEFGLDENLIHRPVETTQPGAVTHVYAVARLKDGGRQ
FEVMSRAQIEEVRVQSKAAKSGPWVTHWEEMAKKTVIRRVFKYLPVSVEIQRAVMLDE
KAEAGVCQENECVFDGDFEVITDTEE

ＷＰ＿０８０９７７９６８．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｔｕｔｚｅｒ

ｉ］（配列番号２６８）
【化１８２】
STENVAPFSQKDMQQATGQQVKPRSPADSLAAMLASPKMKAQFAAALPKHMTAERM
ARIVTTEIRKTPALVKCDQHSFLGSVIQCAQLGLEPGNSLGHAYLLPYGNQVQLIIGYRG
MIDLARRSGQIVSLSARTVREHDEFDYQLGLHEDLTHKPFEGEHAGEITHVYAVARLQG
GGVQFEVMSKAQVEAVRAQSKAGKSGPWVSHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSVEIQRA
VTLDEAAEAGLPQGNEYVFDGDFEVVNDASGAQQ

ＫＸＪ３９３６４．１　ＡＸＡ６７＿０２２０５　［Ｍｅｔｈｙｌｏｔｈｅｒｍａｃｅａｅ細菌Ｂ４２］（配列番号２６９）
【化１８３】
ATSLKRAVTGDGKPATVQQLLTNPKIKSQIALALPQHLTPERLTRIVLTEIRRTPALAKCK
PESLLAAVMQCAQLGLEPGGSLGHAWLMPFKNEVQFIIGYRGMIDLARRSGQVLSIEAR
GVYESDTFHVSFGLEPDLTHQPDWDPADRGKLAFVYAVARLKDGGFQFDVMSRAEVE
KIRAQSPAGKSGPWVTHFEEMAKKTVIRRLFKYLPVSVEMARAVGLDEAAERGEQSDA
IDADCVIESEEEATPEEKGDSAA

ＷＰ＿１０６４７８１５３．１　ＲｅｃＴ　［Ｈａｌｏｍｏｎａｄａｃｅａｅ細菌Ｒ４ＨＬＧ１７］（配列番号２７０）
【化１８４】
SEVATQDTLGKELQQHSGQQKKPMPTTIQGMLKDPRFTSQIARALPKHITPDRITRIALTE
VNKTPALGKCDPVTLFGSIIQSAQLGLELGGALGHAYLVPYGNQAQFIIGYRGMIDLARR
SGQMVSLQAHTVIIDNDEFDFEYGLDEKLRHVPARGDRGPMVAVYSVAKLVGGGIIQIE
VMWKEDVDAIRSKSKAGNSGPWRDHYEEMAKKTAIRRLFKYLPVSVEMQKAVALDEQ
AEAGVQDNNVFDGEFSYGEAE

ＷＰ＿１２９１４１４８８．１　ＲｅｃＴ　［Ｈａｌｏｍｏｎａｓ　ｃｏｒａｌｉｉ］（配列番号２７１）
【化１８５】
TDQATAEPQEDLGKQLQQHSQRKPMPTTIQGMLKDDRFTGQIARALPKHITPDRISRIAL
TEVNKTPALGKCDPMSLFGSIIQSAQLGLELGGALGHAYLVPYKDQAQFIIGYRGMIDLA
RRSGQMVSLQAHTVHENDDFEFEYGLDEKLRHVPARGQRGPMIAVYAVAKLTGGGHQ
IEVMWKEDVDAIRQQSKAGNSGPWRDHYEEMAKKTAIRRLFKYLPVSVEMQKAVSLD
EQAEAGVQDNNVFDGEFSYQEPE

ＷＰ＿０８４２６１９００．１　ＲｅｃＴ　［Ｚｙｍｏｂａｃｔｅｒ　ｐａｌｍａｅ］（配列番号２７２）
【化１８６】
TNTVQQQAPQQDQLAQQLQQASGNTPQKKPMPSTIQGMLKDDRFKTQIARALPKHVTP
ERIMRIALTEINKTPKLKECDPIGLFGSIVQSAQLGLELGGALGHAYLVPYGKQAQFIIGY
RGMIDLARRSGQMVSLQAHTVHENDEFNFEYGLNENLRHVPARGERGPMIAVYAVAK
LVGGGHQIEVMWKEDVDAVRKSSKAGGSGPWRDHYEEMAKKTAIRRLFKYLPVSVEM
QRAVSLDEQAEEGVQDNNVFDGDYTVAEH

ＷＰ＿０２０００７３６９．１　ＲｅｃＴ　［Ｓａｌｉｎｉｃｏｃｃｕｓ　ａｌｂｕｓ］（配列番号２７３）
【化１８７】
STNESLKNQVATNQKNEVSNGNKPKTIGDYIDQMAPAMAQALPKHMSVERMTRMATT
VIRTTPQLKEADVASLLGAVMQSAQLGLEPGPMGHCYFLPFKNNKKGTTEVTFIIGYKG
MIDLARRSGHISTIYAHAVYENDEFEYELGLHADLKHKPSEDERGAFKGAYAVAHFKD
GGYQFEYMPKSDIDKRRSRSKAGNSNYSPWATDYEEMAKKTVIRHMWKYLPVSVEMQ
QAVAHDEGTGKDIKDVTPDEDSFVDMPEYIADVPAEGEGE

ＷＰ＿１３１５２１４０５．１　ＲｅｃＴ　［ｕｎｃｌａｓｓｉｆｉｅｄ　Ｌｙｓｉｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ］（配列番号２７４）

【化１８８】

ATTTDLKAQMQQAPATQQKPKTIDDYLKQMAPAMAQALPKHMDVDRLMRLAMTTIR
TTPALKDADVSSLLGAVMQAAQLGLEPGLMGHCYLLPFKNNKKGITEVQFIIGYKGMID
LARRSGHIQSIYAHAVYQKDEFEYELGLDPKLKHKPCMDEDKGNFVGAYAVAHFKDG
GYQFEFMSKAEIEKRKGRSKAANSTYSPWATDYEEMAKKTVVRHMWKYLPISVEMQQ
QVAYDEGTAPKREMKDITPETEFFVDAPEIEVEVVNE

ＷＰ＿１３２７６９７９５．１　ＲｅｃＴ　［Ｔｅｐｉｄｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ］（配列番号２７５）

【化１８９】

ATNEKVKTQLANRANGQAPTPTPEQTIAAYMKKMAPRFAEVLPKHMDIDRMTRIALTTI
RTNPKLLEASVPSLLGAIMQAAQLGLEPGLVGHCYLVPFKNGKTGQTEVQFIIGYKGMI
DLARRSGNIESIYAHAVYENDTFEYEYGLHPKLVHKPAMTDRGEFIGAYAVAHFKDGG
YQFEFMPKEEIEKRRNRSKTANGGPWVTDYEEMAKKTVVRHMWKYLPISIEIQQAAAQ
DEVIRKDVTSEPEFVDDVIDISTEIEEQSVEVEGEEAQ

ＷＰ＿１２０１９１０５２．１　ＲｅｃＴ　［Ａｍｍｏｎｉｐｈｉｌｕｓ　ｏｘａｌａｔｉｃｕｓ］（配列番号２７６）

【化１９０】

STKATSNELKNQLANRQGNNAATNNNPANTIAAYLKRMAPEIEKALPAHMDADRLARI
ALTTIRTTPKLLECTIPSLMGAVMQSAQLGLEPGLIGHCYIIPYGKEATFIIGYKGMIDLAR
RSGNIESIYAHAVYKNDEFEYEYGLKPNLVHKPAMSDQGDFIGAYAVAHFKDGGYQFE
FMPKEEIDKRRNRSAASKGGPWVTDYEEMAKKTVVRHMWKYLPISIEIQQAATQDEVV
RKDITEDPMPVDVLDIPFEASDAEETSEEGEINFD

ＷＰ＿０６６７９０８１０．１　ＲｅｃＴ　［Ｒｕｍｍｅｌｉｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｔａｂｅｋｉｓｉｉ］（配列番号２７７）

【化１９１】

ATTTELKEQMKQQAPAQTKKPKTIEDYMKQMAPAMAEALPKHMSVDRLTRLAMTTIR
TTPALRQADVSSLLGAVMQAAQLGLEPGLLGQCYLLPFKNKKKAITEVQFIIGYKGMID
LARRSGIIQSIYSIIAVFENDVFEYELGLEPKLKIITPTMSTDKGAFIGAYAVAIIFKDGGII
QFEFMSKADIEKRKGRSKAANSDYSPWLTDYEEMAKKTVIRHMWKYLPISVEMQEQV
AYDEGVGRSIKDVTPEEDVFVQAPDEILEAEATEA

ＷＰ＿０９８４０８２８０．１　ＲｅｃＴ　［Ｂａｃｉｌｌｕｓ］（複数種）（配列番号２７８）

【化１９２】

TQAEKLKNDIAKQEQKNEVAQDDKPKTILDVMMQHKESFEMALPKHLDADRLIRLAVT
EFRKNPMLKECTPESLLGAVMQAAQVGLEPDALGSAYLVPYYNKNKNVKEVQLQIGY
KGLIELVRRSGQVTSIVANEVYENDEFDFEYGINEKLYHKPTMDADRGKLKCFYAYARF
KDGGHAFTVMSVEQINQIRDKFSKSQKNGKHFGPWADHYESMAKKTVIKQLVKYMPIS
VEIQNQITRDETVHSSFKEEPKPIYAFEESPDIIDAPIEN

ＷＰ＿０４７１５０９９６．１　ＲｅｃＴ　［Ａｎｅｕｒｉｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｔｙｒｏｓｉｎｉｓｏｌｖｅｎｓ］（配列番号２７９）

【化１９３】

SDLKEKLEKRANETEAAPPSPAQTIAAYLKRMEPEIARALPKHMDVERLTRIALTTIRTN
PRLLECTVPSLLGAVMQAAQLGLEPGLLGQCYIIPHGREATFIIGYKGMIDLARRSGNIKS
IYAHDVRENDEFEYEYGLHPFLKHRPAMTDRGKFIGVYAVAHFNDGGYQFEFMPYEEIE
RRKLRSRSYKNGPWVTDYEEMAKKTVIRHMFKYLPLSVEIMRSAAQDETVRPDLTSDP
VSIYERPIEGKIITAEDVQPEEIPNVPDAEQGDV

WP_018705791.1 RecT [Siminovitchia fordi] （配列番号２８０）

【化１９４】

ATNQDIKNQLANKANGNKPASPANTIAAYLKKMGPEIEKALPKHMDADRLARIALTTIR
TTPKLLECNISSLMGAVMQSAQLGLEPGLIGHCYIIPYGKEATFIIGYKGMIDLARRSGQI
QNIYAHAVFENDEFDYALGLHPKLEHKPAGSNRGEIIGAYAVAHFKDGGYQFEYMAKE
DIEKRKSRSAAARSKHSPWATDYEEMAKKTVIRHMWKYLPISVEIQQQAIQDEVVRKD
VTSEPEFIDMEDMPEVEEGQSEESEQVEAPFD

WP_035430909.1 RecT [Bacillus sp. UNC322MFChir4.1]（配列番号２８１）

【化１９５】

ATNKDVKNQLANRKENKPATPEQKVEAYMTAMAPRFAEVLPKHMSMDRMSRIALTTI
RTNPKLLECSVPSLMGAVMQAVQLGLEPGLLGHCYILPYKSEATFIIGYKGMIDLARRSG
HIQSIYAHAVYENDEFDYELGLHPKLTHKPSFGERGEFIGAYAVAHFKDGGHQMEFMPK
SEIEKRRSRSASGNSSYSPWKSDYEEMAKKTVVRYMFKYLPISIEVQSQAQHDEVVRKD
ITEEPEFIEMDSIEVAEASEGDGQKEFVIEE

RDC50983.1 RecT [Acinetobacter sp. RIT592]（配列番号２８２）

【化１９６】

ADLKNKLANKAAGTVTKTSPNAGMKQLMKSMSKEIEAALPSHMSSERFQRVALTAFG
NNPKLMNCDPMSFIAAMMDSAQLGLEPNTPLGQAYLIPYGTKVQFQVGYKGLLELALR
SGKIKTLYAHEVRENDTFEVKYGLHQDLIHEPVLKGNRGEVIGYYAVYHLDTGGHSFVF
MTKDEVLEHAKGKSKTFNNGPWQTDFDAMAKKTVIKQLLKYAPLSIEMQKAVSSDET
VKSKIDEDMSLVVDESDSIEANFEIKEDEDGQLDVYVK

WP_150051132.1 RecT [Methylomonas rhizoryzae]（配列番号２８３）

【化１９７】

SELLSALNAPETQKPQTLPAMLKQHQPRFKAIAPRDVDVTRFSAALMADVRSNQKLAE
CNPMTVLGAFIRSTQLGLEPGSQLGQAYFVPFKGECQLVIGYRGMIELAYRSGKVASISA
RTVYENDVFEWELGTDERITHKPATGDRGALVAVYAMAKLTTGGIHFEVLDLAEIEKA
KRASKSSSFGPWKDHFEEMAKKTAIRRLFKYLPVGTDLTRAVALDEKAESGSQQNDIEA
ETVLDGEFYPAGGGNDG

WP_097006457.1 [Lacrimispora amygdalina]（配列番号２８４）

【化１９８】

AVDVKNELERKASGQNSQVKLTKSMTIADMVKALEPEIKRALPAVLTPERFTRMALSAI
NNTPELAGCTPMSFIAAMVNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKGVLECQFQIGYKGMID
LAYRTGQIQVIQGQAVREFDYFEYQYGLDPKLVHRPGEEERGEITFIYGLFRLSNGGYGF
EVSNKADMDAFAAKYSKSFGSKYSPWTENYEDMAKKTVIKRALKYAPVSVDFQKAMS
MDETIKTEISVDMSEIRNECPEISENGEAA

WP_087225255.1 RecT [Lachnoclostridium sp. An14]（配列番号２８５）

【化１９９】

TDVKQELERKVGKQDSTAVRLTKNMSIPDMIKALEPEIRRALPAVLTPERFLRMALSAV
NNTPKLAECTPMSFIAAMMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKNQLECQFQIGYKGIIDL
AYRTGQMQMIQAHAVHEFDDFEYEYGLNPKLIHRPGDGNRGEITYFYGLFKLVNGGFG
FEVMNREAMEAFAQQYSQSYGSQYSPWVKNFEDMAKKTVIKKALKYGPVKAEFQKAI
SMDETIKTEIAVDMTEVQNEESE

WP_002566991.1 RecT [Enterocloster bolteae]（配列番号２８６）

【化２００】

GVNVKHELEQRAAGQGASVRLTKNMTIVDMVKALEPEIRRALPAVLTPERFTRMALSSI
NNTPELAECTPMSFIAALLNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKGKLECQFQLGYKGLIDL
AYRTGQVQIIQAQVVREFDSFEYQYGLDSKLVHKPGEGARGEITYVYGLFKLSNGGYGF
EVSNKTEMDTFAARYSKSFGSKYSPWTEDYESMAKKTVIKRVLKYAPISSDFQKALSM
DETIKTGIAVDMSEIRNECLPEEAGSEAA

ＷＰ＿１３２４１２７３０．１　ＲｅｃＴ　［Ｋｒｉｂｂｅｌｌａ　ａｌｂｅｒｔａｎｏｎｉａｅ］　（配列番号２８７）

【化２０１】

ATADSVREELARSKEVERTQPKASNADNVIGLINRSLPEIAKALPGHVKPERIARIATTAV
RVTPKLADCTQASFLGALLTAAQLGLEPNTPTGEAYLLPFGRNVQLIIGYRGYIKLANQS
GQVRNIMAMTVYENDHFDYKYGSNPFLEHTPTLGQDPGPVKCWYACATFTNGGTNFV
VLDKFKVEGYRARARSKDDGPWVTDYDAMARKTCIRRLAPYLPMSVELAQAMQVDE
EVTAFTPGVSDPEVLATLAGVDTGTGEVQQ

ＷＰ＿１３００６７３９６．１　ＲｅｃＴ　［Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｌｂｕｓ］（配列番号２８８）

【化２０２】

ATNEKLKNQLANRKESAPATPEQTVEAYMKKMAPKMAEVLPKHMDMGRMSRMALTT
MRTSPKLLNCTVSSLMGAVMQAVQLGLEPGLLGHCYILPYKGEATFIIGYKGMIDLARR
SGHIQSIYAHAVHENDEFDYELGLHPKLEHKPVHGDRGAFVGAYAVAHFKDGGYQME
FMPKSEIEKRRKRSASANSSFSPWKSDYEEMAKKTVIRYIFKYLPISIEVQLLAAQDEVVR
KDITEEPEFIEADPIDVEQPTTEGDGQQEFSIEE

ＷＰ＿０８７０９９０３３．１　ＲｅｃＴ　［Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｕｓ］（配列番号２８９）

【化２０３】

ATNEKIKNQLANRKANASLSPEQTVEAYMKKMAPRFAEVLPKHMDMDRMSRIALTTIR
TNPKLLECNVPSLMGAVMQAVQLGLEPGLLGHCYILPYKGEATFIIGYKGMIDLARRSG
IIIQSIYAIIAVYENDEFEYELGLNPQLKIIKPSFGDRGEFIGAYAVAIIFKDGGIIQMEFMP
KSEIEKRRKRSASANSNYSPWKSDYEEMAKKTVVRYMFKYLPISIEVQSQAQHDEVVR
KDITEEPQFIEADSVEVEETPTEGTNQEEFVIEE

ＷＰ＿１４９２１６３０２．１　ＲｅｃＴ　［Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ．　ＪＡＳ２４－２］（配列番号２９０）

【化２０４】

ATNKDVKNQLANRKASAPVTTEQTVEAYMKKMGPKMAEVLPKHMDMDRMSRIALTT
IRTNPKLLECSVPSLMGAVMSAVQLGLEPGLLGHCYILPYKSEATFIIGYKGMIDLARRS
GHIQSIYAHAVYENDEFEYELGLHPQLKHKPSFGDRGEFIGAYAVAHFKDGGHQMEFM
PKSEIEKRRGRSASANSNYSPWKTDYEEMAKKTVVRYMFKYLPISIEVQSQAQQDEVVR
KDITEEPEFIEVEQQTEGDGQGDFVIEGE

ＷＰ＿１２５１４１６３６．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｔｒａｎｓｐｌａｎｔｉｆａｅｃａｌｅ］（配列番号２９１）

【化２０５】

TDVKEELARKAGNTGKQEIRLNKNMSIPDMVKVLEPEIKRALPSVLTPERFTRMALSAIN
NTPKLAECSPMSFIAALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKNQLECQFQIGYKGYIDL
AYRTGQVQMIQAQAVHEFDYFEYEYGLTPKLVHRPGEGERGEITYFYGLFKMINGGFGF
EVMNRAAMDAFAKQYSQSINSKYSPWNSQYEEMAKKTIIKKALKYGPVKSDFQKAISM
DESIKTELSIDMSEVRNEDLIDGEFEEAA

ＷＰ＿１２００５５５６６．１　ＲｅｃＴ　［Ｌａｃｈｎｏｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｐ

ａｃａｅｎｓｅ］（配列番号２９２）
【化２０６】
TDVKQELEKRAGSSNQAIKLTKSMTIVDMVKALEPEIKRALPAVLTPERFTRMALSAINS
TPKLAECTPMSFIAALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLLPYKNKGVLECQFQIGYKGVIDLA
YRTGQIQMIQAQAVRESDYFEYQYGLEPKLVHRPGDGARGEVTFIYGMFRLTNGGYGF
EVSNKADMDAFAEKYSKSYGSRYSPWTENYEDMAKKTVIKRALKYAPISSDLQKALSS
DETIKTVLSVDMSEINNECQIDEVIQEDAA

ＷＰ＿１１８２４６６１９．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｓｐ．　ＡＭ５８－１ＸＤ］（配列番号２９３）
【化２０７】
SVDVKNELEKRAAGTVNPAVKLTKNMTIVDMVRALEPEIKRALPTILTPERFMRMALSA
INNTPELADCTPMSFIAALMNAAQLGMEPNTPLGQAYLIPYKNKGTLECQFQIGYKGLID
LAYRTGLIQVIQAQTVREFDSFEYQYGLDSRLTHRPGDGERGEITYIYGLFKLTNGGYGF
EVSNKADMDAFAEKYSKSFGSRFSPWKENYEDMAKKTVIKRALKYAPVSSDFQKALS
MDETIKSELSIDMSEIRNECQVEASGQEGAA

ＷＰ＿０２５１１４３９６．１　ＲｅｃＴ　［Ｌｙｓｉｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｆｕｓｉｆｏｒｍｉｓ］（配列番号２９４）
【化２０８】
ATTNELKAKSQNQVQQNVTPEQSLNTLLKRMGPQIQRALPKHMDADRIARIALTAVRA
TPKLLECDQMSFVAALMQSAQLGVEPNTGLGQAYLIPYGKQVQFQLGYKGLIDLAVRS
GQYKAIYAHEVYKEDEFSFAYGLHKDLVHVPSTNPEGEPIGYYAVYHLKNGGYDFVYW
TRERIDKHAHEFSQAVKKGWTSPWKTNYDAMAKKTVLKEVLKYAPKSIELQKVVEAD
ETIKTEVSEDMSDVIDVTDYSVIEDESAQEELIIEQ

ＷＰ＿０８３０４８４０９．１　ＲｅｃＴ　［Ｍａｒｉｓｐｉｒｏｃｈａｅｔａ　ａｅｓｔｕａｒｉｉ］（配列番号２９５）
【化２０９】
RTDGTKEAGAAATAPTEGKAPAKAHKPADTIGAMIEKLKPQIERALPKHVTPDRMARM
ALTAIRNNPKLGQAEAVSLMGSIIQASQLGLEPNTPLGQCYIIPYNSKNGMQAQFQMGY
KGIVDLAHRSGQYRQLTAHPVDEADEFRYSYGLNPDLVHVPAEKPSGKITHYYAVYHL
TNGGFDFRVWSREKVEAHAKQYSKSFSSGPWQTNFDQMACKTVMIDLLRYAPKSVEIA
KATSADNRTHTINPEDPDLNIDTIDGDFELEGEER

ＷＰ＿０９９４２４１４０．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｏｌｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ．　Ｒ５－４１］（配列番号２９６）
【化２１０】
ATSNELKKQAQGQVTAKPTTPEGSLNALLKKMGPEIQRALPKHMDADRIARIALTAVRT
TPKLLECDQLSFVAALMQSAQLGVEPNTGLGQAYLIPYGGKVQFQLGYKGLIDLAVRSG
QYKAIYAHEVYADDEFSFAYGLHKDLVHVPSANPSGDPIGYYAVYHLKNGGYDFVYW
TRERIDIHSKAFSQAVQKGWTSPWKTNYDAMAKKTVLKEVLKYAPKSIEMQKVVEADE
TIKNEVAPDMSNVIDVTDYSILEDPQDVTDAQ

ＷＰ＿０７６０６５２８２．１　ＲｅｃＴ　［Ｖｉｒｉｄｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ．　ＦＳＬ　Ｈ８－０１２３］（配列番号２９７）

【化２１１】

ATNNALKEQMKQAPSKEVKPEQSLNTLLKRMGPEIQRALPKHMDADRIARIALTAVRN
TPKLLDCDQMSFVAALMQSAQLGVEPNTGLGQAYLIPYGKQVQFQLGYKGLIDLAVRS
GQYKAIYAHEVYEDDEFSFAYGLHKDLVHVPAPNPTGEPIGYYAVVTHLQNGGYDFVY
WTRERIDQHAHKFSMAVQKGWTSPWKTNFDAMAKKTVLKEVLKYAPKSIEMQKVVD
ADETVKTDVSDDMSNVIDVTDYTVMDQEQETIQEPTK

ＷＰ＿０２４２９２３８８．１　ＲｅｃＴ　［Ｌａｃｒｉｍｉｓｐｏｒａ　ｉｎｄｏｌｉｓ］（配列番号２９８）

【化２１２】

SDVKQELEKRAAGGGGQSQSVRLTKNMTIVDMVKALEPEIKRALPSILTPERFTRMALS
AINNTPKLGECTPMSFIAALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKGVLECQFQLGYRGLI
DLAYRNERMQSVEAQVVYENDEFSYELGLHPSLIHRPSFDEPGEIRAFYAIFRLDNGGFR
FEVMSKSYVDAYAARYSKAFTSDFSPWKSNYEGMAKKTVIKQLLKYAPMKSEFQKAV
TMDETIKTELSVDMSEVSNQEVIDRELTEQVA

ＷＰ＿００９５２４９３１．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｅｐｔｏａｎａｅｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｔｏｍａｔｉｓ］（配列番号２９９）

【化２１３】

GAKELIQKKQENKQISPTSNMNMLLQSMAGAIKKALPAQINSERFQRVALTAFSSNQKL
QQCDPISFLAAMMQSAQLGLEPNTPLGQAYLIPYGKQVQFQVGYKGLLELAQRSGQFK
SIYSHEVRENDEFEMEYGLNQKLVHKPNLKQERGEVIGYYACYHLTNGGESMFFMTKD
EIINFGKSKSKTFNNGPWQTDFDAMAKKTVLKQLLKYAPLSIESQKFMSMDETVKSDIS
ANMDEINNDTVDFEVDIQTGEVINDIVVENTNEDEAN

ＷＰ＿０１５３５８１１１．１　ＲｅｃＴ　［Ｔｈｅｒｍｏｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｓｔｅｒｃｏｒａｒｉｕｍ］（配列番号３００）

【化２１４】

TTVNQTELKNKLAEKAKTPAKTGNTVFDLIRKMEPEIKRALPKQISPERFARIAMTAVRN
TPKLQACEPISFIAALMQSAQLGLEPNTPLGQAYLIPYGKEVQFQLGYQGMLTLAYRTGE
YQSIYAMPVYANDEFEYEYGLNEKLVHKPAPDPEGEPIYYYAVYKLKNGGHGFVVMSR
QQIERHRDKYSPSAKQGKFSPWNTDFDSMAKKTVLKQLLKYAPKSVEFATQIAQDETIK
TEIAEDMTEVQGIEVEYEATDDQENQENQEQED

ＷＰ＿００２５９５１４６．１　ＲｅｃＴ　［Ｅｎｔｅｒｏｃｌｏｓｔｅｒ　ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｏｆｏｒｍｉｓ］（配列番号３０１）

【化２１５】

GIDVKHELEKRAAGQDKPVKLTRNMTIADMVKALEPEIKRALPAILTPERFTRMALSAV
NNTPELANCTPMSFIAALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKGTLECQFQLGYKGLID
LAYRTGQIQIIQAQAVREFDYFEYQYGLDSRLVHKPGNEERGQITFIYGLFKLSNGGYGF
EVSNKAEMDAFAAKYSKSFGSKYSPWTEDYESMAKKTVIKRALKYAPVSSDFQKALSL
DETVKSEIAVDMSEIRNDCIPADMGTEAA

ＷＰ＿１００３０６４１８．１　ＲｅｃＴ　［Ｌａｃｒｉｍｉｓｐｏｒａ　ｃｅｌｅｒｅ　ｃｒｅｓｃｅｎｓ］（配列番号３０２）

【化２１６】

SDVKQELEKRAAGGGSQSQSVKLTKNMTIVDMVKALEPEIKRALPSILTPERFTRMALS
AINNTPKLGECTPMSFIAALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKGVLECQFQLGYRGLI
DLAYRNDRMQSIEAQVVYENDEFSYELGLHPSLTHRPSFDEPGEIRAFYAIFRLDNGGFR
FEVMSKSYVDAYATKYSKAFTSDFSPWKNNYEGMAKKTVIKQLLKYAPIKSDFQKAIT
LDETVKTQLSIDMSEIRNECLPDTSENSEVA

WP_071062796.1 RecT [Andreesenia angusta]（配列番号３０３）

【化２１７】

SNLKNQLANKAGGTATKKQPQTMQDWIKVMEPQIKKALPSVITAERFTRMALTAISTNP
KLAECTPESFMGALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYGKSVQFQVGYKGLMELAQRSGQ
FKSIYAHTVYENDEFEVEYGLTQNIVHKPNFDDRGKPIGFYAVYKLTNGGENFVFMTQR
EVEEFGKAKSKTFNNGPWKTDFEAMAKKTVLKQLLKYAPIKVEFQREIAQDATIKTEIA
EDMTEVPEEMVEAEYEVVEQNTMAEDADLKGTPFETK

SFO83314.1 RecT [Amycolatopsis arida]（配列番号３０４）

【化２１８】

HGTALNPERFTRVALTVIRQSADLQRCRPESLLGALMTSAQLGLEPGPLGEAYLVPYGD
QVTFIPGYRGLIKLAWQSGQLRHISARVVHEGDRFSYSYGLHPDLIHQPTRGDRGPITDV
YAAATLIDGGVEFEVLDVATVETIRARSRAGRKGPWVTDWEAMARKTAIRQLAKWLP
MATVMSRAIAAEGTVRTDLDADALDDLTADPGPEVLDADPAWDGPEPPGDQARNQEP
TTQGDA

WP_110092637.1 RecT [Corynebacterium striatum]（配列番号３０５）

【化２１９】

GTNLEQRMAANNAPAKQNRPVTLADQIRSMESQFQLAMPKGMEAQQLVRDALTCLRQ
TPKLAECTPQSVLGGLMTCSQLGLRPGVLGHAYLLPFWDRKQGGMVAQLVVGYRGLV
ELAIRSGQIQSLIARTVYENDHFDVDYGLDDKLVIIKPCMNGPKGNPIAYYAVAKFTTG
GHSFIVMSKDEMLAYRDEFAKAKNKQGEVFGPWADNFDAMAHKTCVRQLAKWMPSS
TDLDRGIAADETVRVDLSESALDYPQHVDGEVVDSKPAEDEAA

WP_129692339.1 RecT [Gottfriedia acidiceleris]（配列番号３０６）

【化２２０】

ATPAELKNLLAAKPKGEVKLTPDQQVSSYLKAYEGTFRQIAPKHFNTERFQRIALSEIRK
NPKLLDCNLPSLMSAVLQSVKLGLEPGLFGQAYLIPYGKEVQFQIGYKGLIELAQRSGRI
AKIQAREVYEHDEFEVSYGIDDTIIHKPKLDGDRGDVRLYYAVAWFKDGAAQFEIMSKS
DVENHRDKFSKTKNYGPWKENFDAMARKTVLKKLVNQLPMDVEFHEAVQEDETVRK
TINDEPEVIAAEYEHIDAPEVVEGNE

WP_118016648.1 RecT [未分類Coprococcus]（複数種）（配列番号３０７）

【化２２１】

ANNIDLKQELAEQASKVPAKKDEEVKLTKSMTIPDMVKAMMPEIKKALPAVMTPERFT
RIALSALNTTPALNQCTPMSFLAALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNHGTLECQFQIG
YKGLIELAYRSGQMQTIQAQTVYENDEFAYQYGLEPVLVHRPAYSDRGEVKYFYGIFKT
VNGGYGMAVMSRAEMDLYAKTYSKAYDSSYSPWKSNYEDMAKKTVIKQALKYAPIK
TDFQRALSFDETIKKEISLDMSTVKNELLDVA

WP_051200279.1 RecT [Butyrivibrio sp. FCS006]（配列番号３０８）

【化２２２】

PYLFGGQMKEQEIKNQLAAKAVETTNPKLSKNMNIADLIKAIEPEIKKALPTVITPERFTR
IALSALNTTPKLAECSQMSFLAALMNAAQLGLEVNSPLGQAYLIPYNNKGKLECQFQIG
YKGMLGLAYRNPEIQTIQAQVVYENDDFKYELGLDSKLYHKPSLSDRGKVRCYYALYK
LRNGGYGFEVMSRRDVEEYAKRYSKVTDSLYSPWANNFDSMAKKTVIKQLLKYAPLR
TDLEKAMSMDESIKTRVSVDMSEVENEETFDAEVEV

WP_107514794.1 RecT [Staphylococcus equorum] （配列番号３０９）
【化２２３】
ATNETLKQKVVERKPNGVKEQSPKTQLNHLLKKMAPEIQRALPKHMDSDRMARIAMT
AVSNTPKLLECDQMSFIAALMQASQLGVEPNTGLGQAYLIPYAGKVQFQLSYKGLIDLA
TRSGQYKSIYAHEVYTNDEFEYRYGLFKDLIHIPSQEPEGNPIGYYAVYHLKNGGYDFV
YWTRERVDKHAKEFSQAVQKGWTSPWITNYDAMAKKTVLKEVLKYAPKSIEMNKAV
ENDSTIKEEIDKDMSTVIDVTDYSEVEEQESLETGGQTSK

WP_117624242.1 RecT [Hungatella hathewayi] （配列番号３１０）
【化２２４】
RRDRNVTAVKQELEKKAAGTSQAVKLTKNMTIVDMVKALEPEIKRALPSILTPERFTRM
ALSAINNTPKLAECTPMSFIAALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKGVLECQFQLGY
RGMIDLAYRNERMQSIEAQTVYEHDEFFYELGLHPALVHRPTFEDRGEIRAFYAIFRLDN
GGYRFEVMSKSYVDAYAMRYSKAFTSEFSPWKSNYEGMAKKTVIKQLLKYAPVKSEF
QKAITLDETVKTELSVDMSEVQNEDLSETLTAESAA

WP_118771779.1 RecT [Roseburia intestinalis] （配列番号３１１）
【化２２５】
GDIRSELAKKAEQTQGNTKLTKSMSIADLIKAMEPEIQKALPSVITPERFTRMALSALNTT
PKLQECTPMSFLAALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKNVLECQFQLGYRGMIDLA
YRNGIIMQSIEAQAVYENDVFSYALGLIIPELVIIKPTLEEKGALKAFYAIFRLDNGGFRFE
VMGKTYIDWYANRYSKAFTSEFSPWKSNYEGMAKKTVIKQLLKYAPLKTEFQRALSTD
ETIKNSLNVDMGEVLSEDIIDMPCEEVA

WP_107378794.1 RecT [Staphylococcus chromogenes] （配列番号３１２）
【化２２６】
ANAKEFKKQMNSKNEVAETNNAPQKAKGPRQQVSDLLDRMAPEIQKALPNNMSAERM
ARIAMTAVSSNPKLLECDPKSFIGALMQASQIGLEPNTALGQAYLIPYGNQVQLQLSYLG
LIELATRTGQYKAIYAHEVYKDDEFSYEYGLYKNLIHKPVDDPNGEPIGYYAVYHLMNG
GYDFAYWTRKKVEAHAQQYSKAVQQGWNSPWKSDFNAMAKKTVLKDLLKYAPKAIE
VSQAIGSDSKVSEINDEGEIIDVTDYSQEEEK

WP_094369469.1 RecT [Romboutsia weinsteinii] （配列番号３１３）
【化２２７】
TNLKNTLKNKEAKGNNLAINPSYAMKQLMIKMKGEITSALPKELCSERFQRVALTAFNS
NPKLQNCAPMTFIAAMMQSDQLGLEPNTPLGQAYLIPYKVKGIDKVQFQIGYKGLLELA
HRSGRLKTLYAHEVRENDEFDIDYGLEQRLIHKPLLKGNRGEVIGYYAVYHLEHNGYSF
VFMTYDEVLEHGKKYSKSFEGGIWEKEFDSMAKKTVIKKLLKYAPLSIEIQKAINFDESV
KGSIDSDMLLVDKADESIDVEGNVLNQRGIKYGCI

CDF42377.1 [Roseburia sp. CAG：182] （配列番号３１４）

【化２２８】

DVKEELAKMAEEKPTKKLTKSMSIQDMIKVIEPEIKKALPSVLTPERFTRMALSAINNTP
KLAECSQISFLAALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPFQNKGKLECQFQIGYKGIIELVYRN
PLIQTIQAQVVYENDEFEYELGLNSRLFHRPALYDRGETVLFYALFKMSNGGYGFEVLS
KQDMDAYAKRYSKGISSEYSPWKSNYEEMAKKTMIKKVLKYAPIRTDFQKAVSMDESI
KKELSVDMSEVSNENIIDMEEITQEEE

ＷＰ＿１２３６０９００６．１　ＲｅｃＴ　［Ｍｏｂｉｌｉｓｐｏｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｅｎｅｇａｌｅｎｓｉｓ］（配列番号３１５）

【化２２９】

KDIKSALEKKVDKQDVKLTKSMSITDMIKALEPEIKKALPSVITPERFTRMALSAVNNTP
KLAECSQMSFLAALMNAAQLGLEPNTSLGQAYLIPYQNKGKLECQFQLGFKGMIDLVY
RNEKVQTIQAHCVYEEDYFEYELGLDSKLAHKPALANRGKMILVYAFFKLENGGFGFE
VMSKEDIDIHALKYSKGYSSQYSPWKSNYEDMAKKTVIKKVLKYAPLKIDFQRAISVDE
TVKAEISIDMSEVQNEEIIDGQCTDVGEIEEK

ＷＰ＿１１５８５６８９２．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｅｌｉｓ］（配列番号３１６）

【化２３０】

ANANSFKEQVSNKNEVSENNNTPQQKTKGPRQQVSDLLERMAPEIQKALPSHMSAERM
ARIAMTAISSNTQLLECNPRSLIGALLQASQIGLEPNTALGQAYLIPYYNRNKGEFEAQLQ
LSYLGLIELATRTGQYKAIYAHEVYKEDEFYYEYGLHKNLVHKPVDDPKSEPIGYYAVY
HLQNGGYDFSFWTRNKVELHSGQYSKAVQKGWNSPWKTDFNAMAKKTVLKDLLKYA
PKSVEVSRAVGTDSKVSEISQNGEIIDVTDYSKEEE

ＷＰ＿１０８４０４８２７．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｌｉａｎｇｇｕｏｄｏｎｇｉｉ］（配列番号３１７）

【化２３１】

KDLETRMAANQQPAQQRPTTLADQIRGMEQQFALAMPKGAEASQLVRDALTALRQAP
KLAQCTPQSVLGSLMTCAQLGLRPGVLGHAYLIPFYDRRAGGLVAQLVIGYQGLVELA
HRSGQIKSLIARTVYENDVFDVDYGLEDKLVHKPYMGGDKGQPIAYYAVAKFTTGGHA
FYVMSHPEMLDYRARFAKSAERGPWVDNFEAMALKTCVRQLSKWMPKSTELATAIAA
DESVRVDLTPDAINYPEHVDGEVVDAQGTTEDTAGEGEQSA

ＷＰ＿０２１７４７３８７．１　ＲｅｃＴ　［ｕｎｃｌａｓｓｉｆｉｅｄ　Ｏｓｃｉｌｌｉｂａｃｔｅｒ］（複数種）（配列番号３１８）

【化２３２】

KEGLIQGTQSAQAAKKGPATMQDYIKKMQGEIAKALPSVLTPERFTRITLSALSTNPKLA
QTTPKSFLGAMMTAAQLGMEPNTPLGQAYLIPFKNHGVLECQFQLGYKGLIDLAYRSG
EVSTIQAQTVYENDEFEYELGLEPKLHHVPAKGERGEPVYFYAVFRTKDGGYGFEVMS
VDDVRTHAKKYSKAYSNGPWQTNFEEMAKKTVLKKALKYAPLKTEFMRGLTSDETIK
TEISEDMYSVPDETVIEAEGYEVDGDTGEVIERPADGQ

ＷＰ＿１０３１１０６１５．１　ＲｅｃＴ　［Ｂｒｅｖｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｓｚｅｒｉ］（配列番号３１９）

【化２３３】

SNKLAQRAGQQTQPVKPDQQISALLKRMEPEIARALPKHLTSDRLARIAMTSIRQNPKLL
ACDQMSLLAGVMQSAQLGLEPNTPLGEAYLIPYGKEAQFQVGYKGIISLAHRTGEYQAI
YAHEVFKNDEFSYSYGLDKTLNHKPADEPEGDPIYFYAVYRLKNGGFDFVVWSTKKID
AHAKKYSQAYQKGWTTPWKTDFVAMAKKTVLKEVLKYAPKSAEMAKALVMDETVK
NEISEDMSEVPGMVIDIEADAANVEETAGGGASE

ＷＰ＿０１６９９８６７９．１　ＲｅｃＴ　［Ｍａｍｍａｌｉｉｃｏｃｃｕｓ］（配列番

号３２０）

【化２３４】

ATNESIKNQVASRKKNEVQNKSPKTQLNDLLIKMGPEIQRALPKHMDADRMARIAMTA
VSTTPKLLECDQMSFIGALMQASQLGVEPNTGLGQAYLIPYGGKVQFQLSYKGLIDLAT
RSGQYKAIYAIIEVFPNDEFNYQYGLFKNLEIIIPSQEPEGEPIGYYAVYIILKNGGYDFVY
WTRERVDKHAKDFSQAVQKGWTSPWKTNYDAMAKKTVLKEVLKYAPKSIEMNKAVN
SDSTIKDEINEDMSSVIDITDYEEVNDQQEEKKEESK

ＷＰ＿１４７５４００９０．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉａｃｅａｅ細菌］（配列番号３２１）

【化２３５】

SNLKKALKTNETKGNSVTVSKAYAMKQLMIKMKGEITSALPTNLSSERFEKVALTAFNS
NPKLQKCDPRTFIAAMMQSAQLGLEPNTALGLAYLIPYEVKGINKVQFQIGYKGLLELA
NRSGKLKTLYAHEVRENDEFDIDYGLEQKLIHKPLLKGNRGNVIGYYAVYHLEPSGYNF
VFMTYDEVLEHGKKYSKSFEGGVWEKEFDSMAKKTVIKKLLKYAPLSIEMQKAIVFDE
SVKGSIDSDMLLVDKEDESIEGSELN

ＷＰ＿０１９１６８１２２．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｉｎｔｅｒｍｅｄｉｕｓ］（配列番号３２２）

【化２３６】

ANANSFKEQVSKNEVQETNNEKPKGPRQQVSDLLERMAPEIQKALPSHMSAERMARIA
MTAISSNPQLLECNPRSLIGALLQASQIGLEPNTALGQAYLIPYYNHKKKEFEAQLQLSYL
GLIELATRTGQYKAIYAHEVYKEDEFYYEYGLHKNLVHKPVDDPNGEPVGYYAVYHLQ
NGGFDFAYWTKNKIELHAGNYSKAVQKGWNSPWKTDFNAMAKKTVLKDLLKYAPKSI
EISQAVGSDSKVTEINKQGEIIDITEYGQEALEG

ＷＰ＿１４８８２０２３６．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｕｒｅａｌｙｔｉｃｕｍ］（配列番号３２３）

【化２３７】

AKNLEARMQQSTNAPARADKPLSLPDQIRQMEDQFRLAMPKGAEATQLVRDALTCLR
QTPQLAQCTPASVLGGLMTCAQLGLRPGVLGHAYLIPFNDRRSGNSVAQLVIGYQGLVE
LAHRSGQIKALIARTVYENDHFDVDYGLEDKLVHKPHMGADKGNPVAYYAVVKFTTG
GHAFYVMSHPEMLQYRDKNAKSPKRGPWVDNFEAMAHKTCVRQLAKWMPKSTEFSQ
ALATDESIRLDVTPDAINYPDHPAEGEVIDGEVEQDGGQQ

ＷＰ＿０９６８２３８５７．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｎｅｐａｌｅｎｓｉｓ］（配列番号３２４）

【化２３８】

ATQNQFKNQLTQKKENNNQPQQKAVGPKQEISNLLDRMAPQIQKALPQHMSAERMARI
AMTAVSSTPKLLECDPKSLIGALMQSSQIGLEPNTNLGQAYLIPYGKEVQLQVSYLGMIE
LANRSKQYKAIYAHEVYPEDYFEYQYGLQKDLIHKPADNPQSEPIGYYAVYHLLNGGY
DFVYWSKAKIDDHARQFSKAVQKGWQSPWKTNFNAMAKKTVLKDLLKFAPKSIEMN
NAVSSDSKAQQIDDDGNIIDVTDYSQVNDEPEQLQEGQ

ＷＰ＿０９８１７０６０５．１　ＲｅｃＴ　［Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ．　ＡＦＳ０１７３３６］（配列番号３２５）

【化２３９】

ATNESLKNQITNKKTGEVPLTPAQQVSSYLKAYEGTFQQIAPKHFNTERFQRIALSEIRKN
PKLLECSVPSLMSAVLQSVKLGLEPGLFGQAYLIPYGKEVQFQIGYRGLIELSQRSGRILK
IQAREVYENDEFEVSYGIDDNIIHKPALDVDRGKVRLYYAVAWFKDGGAQFELMSISDV
EKHRDKFSKTAKFGPWKDHFDEMAKKTVLKKLVKQLPMDVEFQEAVQEDETVRKTIT
DEPEILQAEFEIVDQPEISVE

ＷＰ＿０８７２９０９６２．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｓｅｕｄｏｆｌａｖｏｎｉｆｒａｃｔｏ

ｒ ｓｐ． Ａｎ１８４］（配列番号３２６）
【化２４０】
ATEKAIQRATGRAPALENRPALQQYIKQMSGEIKKALPSVMTPERFTRIVLSALSTNPKL
AETTPQSFLGAMMTAAQLGLEPNTPLGQAYLLPYWNSKANAYECQFQLGYKGLLDLA
YRSGEISVIQAHVVYSEDQFSYSFGLKPELKHIPAGEERGEPVYVYAIFHTKDGGYGFEV
CSIDDIRAHAQRYSKSFQNGPWQTNFEEMAKKTVLKRVLKYAPLKSEFLRGLAQDETIK
QEISEDMYMVEAAYAEPDVSSAEND

ＷＰ＿０５１２６４７０３．１ ＲｅｃＴ ［Ｎａｋａｍｕｒｅｌｌａ ｌａｃｔｅａ］（配列番号３２７）
【化２４１】
ASNLAARAAEQVEQQTAPNRPPTIKEQIGRMESQFALAMPRGSEAAQLVRDAITAINTN
PQLAECTPASVLGALMTCAQLGLRPGVLGHAWVLPFRSKGVMQAQLVIGYQGLVELA
HRTGQVASLIAREVHERDHFDVDYGLADSLIHKPLLNGDRGPVTGYYAIVKFKGGGHSF
IYASKADVEAHRDKFSKMKSFGPWVDNFDSMALKTVVRMLAKWMPKSTEFANAISAD
EGVRVDYSPTADVAQATEYVQPQLEEAPVEGVVVSEGGES

ＣＣＺ６１３６５．１ ［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｈａｔｈｅｗａｙｉ ＣＡＧ：２２４］（配列番号３２８）
【化２４２】
ANDIRGELARRASGTETQAVKLTKNMSIPDMIKALEPEIKRALPTILTPERFTRIALSAINN
TPKLAECSPMSFIAALMNAAQLGLEPNTPLGQAFLIPYKVKGSLECQFQIGYRGMIDLAY
RNERVQSIEAHTVYENDVFEYELGLNPRLVHIPTMEEPGDPIAFYGIFRLDNGGFRFEVM
NKNAIDAYAARYSKAYDSASSPWKNNYESMACKTVLKQLLKYSPMKSEFQKAVSMDE
SVKTELSVDMSEVQNVNLIEETQEDAA

ＷＰ＿０６８７２０５７６．１ ＲｅｃＴ ［Ｖｅｉｌｌｏｎｅｌｌａｃｅａｅ細菌 ＤＮＦ００６２６］（配列番号３２９）
【化２４３】
KTTGGLQQQQQQQAQALQNGGTTLKGYLQAMMPEIKKALPTVMTPERFTRIVMTTIST
NPALQNCTPQSFLGAVMQAAQLGVEPNTPLGQAYLIPYGNQVQFQLGYKGLIDLAYRS
GEVQSLQAHEVYQNDTFEYELGLNPKLKHIPALTNRGDVILYYAVIKFKNGGEGFEVMS
KEDVEAFAKSKSKTYGRGPWQTDFDEMAKKTVLKKVLKYAPMKTDFIRAVATDETVK
SSVAEQMADLPDETVTIDTEAQVVVDKETGEVKS

ＷＰ＿０３７４０４１９３．１ ＲｅｃＴ ［Ｓｏｌｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｍｏｏｒｅｉ］（配列番号３３０）
【化２４４】
TEIKAAKAPATVAKAGVSTQNKTIKDYITIMKPEIEKALPSTITPERFTRITLSAVSNNPKL
QACSPSTFLSAMMQSAQLGLEPNTPLGQAYLIPYGNSCQFQLGYKGLLQLAYNSGQIKTI
RTETVYENDEFKYELGLHSDLVHVPAMSNRGNPTAYYAVIEYTNGGYGFEVMSHDDVL
EHAKKFSKTFNNGPWQSDFESMAKKTVLKQALKYAPLSTELVSKINTDETVKSSISDHM
EEVKNDIDLSQIIDAETGEIHE

ＷＰ＿０２７３４７４７０．１ ＲｅｃＴ ［Ｈｅｌｃｏｃｏｃｃｕｓ ｓｕｅｃｉｅｎｓｉｓ］（配列番号３３１）
【化２４５】
AQAKELLENKTNNTVKKSEKQTMENLLTLMADEIKKALPENVKSERFRRIALTAFNGN
KDLQQCEPTSFLAAMMQSAQLGLEPNTPLGQAYLIPYNNSKKNIKEVQFQVGYKGMLD
LAHRTNQYKNIQANIVYEKDEFDIEYGLNPKLKHIPNMKEDRGQAIGYYAVYNLINGGQ
GFEYMTRAEVEKHAQKFSKTYRNGPWQTDFDEMAKKTVLKKVLKYAPMSTELQEATA
IDERVVNEENIKSKNEDKFVDVDWSYVDDVEEDVIE

10 20 30 40 50

WP_072526012.1 RecT [Clostridium sp. Marseille-P3244]（配列番号332）
【化246】
AARATNSVKEELAKKAETKAVGEKKLTRSMSIADLIKAMAPEIKKALPEVITPERFTRM
ALSALNTTPKLQECTQMSFLAALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPFNNKGTMECQFQIGY
KGLIDLGYRNPQMQIISAQAVYENDEFEYELGLNPKLEHRPALIIDRGELRLFYGLFKLV
NGGFGFEVMSKEAVDAYAKEYSKSFDSSFSPWKTNYEAMAKKTVIKQALKYAPIKADF
RKALSTDETIKNEIAEDMSEIHGEDIFDAEYTEQTA

WP_092453396.1 RecT [Clostridium fimetarium]（配列番号333）
【化247】
ETIDIKQELASQAQTDSKKEVKLTKAMSIAEMIKAMMPEIKRALPSMITPERFTRIALSAL
NNTPELQACTPMSFISALLNAAQLGLEINSPLGHAYLIPYKNKGVLECQFQIGYLGLIALA
YRNELMQTIQAQCVYENDEFLYEYGLNPKLVHRPATSDRGEPVTFYGLFKMINSGFGFC
VMSKQEMDEFARTYSKGLASSFSPWKTSYNEMAKKTVIKQALKYAPIKTDFQKALSTD
ESIKYAISEDMTEAVNEIVSQNTEVA

WP_027295741.1 RecT [Robinsoniella sp. KNHs210]（配列番号334）
【化248】
TTRTGNIKEELAKKAEGTNGDTRLTKAMSIADLIKAMEPEIKKALPEVITPERFTRMALS
ALNTTPKLRECTQISFLAAMMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPFNNKGTMECQFQIGYKGM
IDLSYRNPQMQMISAQAVYENDEFKYELGLNPTLIHRPVLRGRGEVILFYGLFKLTNGGY
GFEVMSKEEMDAYAKAYSKAIDSSFSPWKSNYNGMAKKTVIKQVLKYAPIKADFRKAL
SSDETIKNEISENMSEIHGEIIFDTDYMEESA

WP_117768035.1 RecT [Blautia sp. OF03-15BH]（配列番号335）
【化249】
NVKEELAQKAEITQKEVKLKKSMSISDMIRALQPEIKKALPSVVTPERFIRMALSALNTT
PKLAECSQISVLAALMNAAQLGLEPNTPMGQAYLIPFNNKGKMECQFQIGYKGLLELVY
RNPAIQIIQAQTVYENDYFEYELGLNSRLIHRPELEDRGEIRLFYGLFKMVNGGYGFEVM
SRQEMDQYAARYSKSFASGFSPWENNYEDMAKKTMIKRVLKYAPVKIETARALINDESI
KLHLSEDMSEVENETVVDGQAEEKAA

SCJ42694.1 [Ruminococcus sp.]（配列番号336）
【化250】
GTSIQKNVENNALQKEKMPTMQAYIKKMEGEIKKALPSVMTPERFTRITLSALSTNPKL
AATTPGSFLGAMMTAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYSNKGKLECQFQIGYKGLIDLAYRSG
SISVIQAHTVYENDDFEYELGLDPKLKHIPSKSADKGNPAWFYAVFKTKDGGYGFEVMS
IEDIRSHAAKYSQSYNSAYSPWKTNFEEMAKKTVLKKALKYAPLKSDFVRQISTDETIKT
KLSDDMFSVPAETIEVEGIEVDTETGEITEVDHA

WP_092724975.1 RecT [Romboutsia lituseburensis]（配列番号337）
【化251】
SNLKNVLKNQEDKGQGITVNPTYAMKQLMIKMKNDIDLALPKNLSSERFQKVSMSAFN
NNEKLQNCEPTTFIAAMMQSAQLGLEPNTPLGQVYLIPHNLNGVDKVQFQVGYKGLLQ
LAHRSGKLKTLYAHEVKENDEFEIDYGLEQKLIHKPLLKGNRGDVIGYYAVYHLEPSGY
SFEFMTYDEVAKHGKKYSKDFEGGIWEKDFDSMAKKTVIKKLLKYAPLSIEMQKAVAF
DESVKSSIDSDMLLVESIGE

ＫＫＺ７４８８１．１　ＶＯ６３＿０５３８５　［Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｓｈｏｗｄｏｅｎｓｉｓ］（配列番号３３８）

【化２５２】

TSDARNAVARRAANVGQVEQAGEQPKPTMAQQIERMKPEIARALPKHMDADRIARIAL
TLIRKNPDLANCTTESFLGALMTCSQLGFEPGSPTQEAYIIPRKGQAEFQLGYQGMVTLF
YQIIPMASSVKVETVRENDYFEIIEEGLEERLIIIRPFADGPRGKAIAYYSVARLINGGRTF
KVMYPAEIEERRQKLPSKNSPAWRDNYDEMAKKTVLRNHFKALPKSAELARALAHDG
TVRTDWQPDAIDVPPEYLSEPQRPELEAGAQ

ＷＰ＿０５５２８４１０９．１　ＲｅｃＴ　［Ｄｏｒｅａ　ｌｏｎｇｉｃａｔｅｎａ］（配列番号３３９）

【化２５３】

TVGKTDEIKQELARKVENTKAGTKLKKSMSIADMIKVMEPQIKKALPEVITPERFTRMA
LSALNTTPKLNECTPMSFLAALMNAAQLGLEPNTPLGQAFLIPYNNKGKMECQFQLGY
KGLIDLSYRNPNMQIITAHTVYENDEFEYELGLNPCLDHRPTLGERGEIRLFYGLFKLTN
GGFGFEVMSKTAMDDFAKEYSKAFDSSFSPWRTNYESMALKTIIKKALKYAPLKSEFRN
ALSTDETIKNEIGADMSEINSENIFDTVYQEECA

ＳＤＬ２８８８３．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｉｎｄｉｃｕｓ］（配列番号３４０）

【化２５４】

STDARNAVARRAETVGQVEQQAQQQPTLAQQIERMKPEMERALPKHMSADRMARIAL
TLIRKNPDLATCNTQSFLGALMTCSQLGFEPGSPTQEAYIIPRKGNAEFQLGYQGMVTLF
YQIIPMASSIKVETVRENDYFEIIEDGLEERLVIIRPCATGPRGRAIAYYSVARLINGGRTF
KVMYPDEIEERRQKLPSKNSPAWRDNYDEMAKKTVLRNHFKALPKSAQLARALAHDG
TVRTDATADVIDVAPEYPQRPELEAGPTA

ＷＰ＿１４５４５８２０９．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｅｔｔｅｎｋｏｆｅｒｉ］（配列番号３４１）

【化２５５】

ATQKDFKNQISQKETQQKQEVQKKKKGPRQQVSDLLDRMAPEIEKALPNHLSADRMAR
VAMTAVSSNPKLLECDPKSFIGAVMQSAQLGLEPNTALGEAYLVPYAGKVNFQLSYLG
LINLATRSGQYKAIYAHEVYAEDEFRYQYGLIIKDLIIKPVDNPKGKPIGYYAVYIILLNG
GYDFVYWTTERIQKHAKKYSFAVQKGYQSPWNDEFDAMAKKTVLKDLLKYAPKSIEM
NNAVRSDDKQSELSDEGVVIDVTNYDEENGEEK

ＷＰ＿１１７７８７２５２．１　ＲｅｃＴ　［Ｔｙｚｚｅｒｅｌｌａ　ｎｅｘｉｌｉｓ］（配列番号３４２）

【化２５６】

AGVKEELAKKAESTKGETKLTKSMSIADLIKAMEPEIKKALPEVITPERFTRMALSALNT
TPKLRECTQMSFLAALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYNNKGVMECQFQIGYKGLIDLS
YRNPQMQIISAQAVYENDDFSYELGLNPKLEHCPTLGERGEVRLFYGFFKLVNGGFGFE
VMSKTAMDEYAKEYSKAFDSSFSPWKSNYIGMAKKTVIKQALKYAPLKTDFRKALSND
ETIKTELSDDMSDIHGEEIWDVEYQEKTA

ＷＰ＿０７３１１２６３０．１　ＲｅｃＴ　［Ｈｅｓｐｅｌｌｉａ　ｓｔｅｒｃｏｒｉｓｕｉｓ］（配列番号３４３）

【化２５７】

ADIKEELAKKVAEGTEDKKKLTKSMSIADLIKAMEPEIKKALPEVITPERFTRMALSALN
TTPKLKECTQTSFLTALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKGNLECQFQIGYKGLIDLS
YRNRQMQIIQAQAVYENDEFEYELGLNPVLVHRPALQNRGAVKLFYGIFKLTNGGFGFE
VMSKADMDAYAKEYSKAFDSSFSPWKSNYIGMAKKTVIKQAIKYAPLKTDFRKALSTD
ETIKTEFCEDMSEVQCKDIWDTEYKERSA

ＣＤＤ３６３２２．１　［Ｒｏｓｅｂｕｒｉａ　ｓｐ．　ＣＡＧ：３０９］（配列番号３４４）

【化２５８】

DVKNELAKKAENTGKVKLTKSMSIADMIKTLEPEIARALPSVITPERFTRMALNALNNTP
KLAECTQMSFLAALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKGVLECQFQIGYKGMLDLVY
RNEMVQTVQAQVVYQNDEFHYALGLTGRLEHIPTLRDRGEPYAFYALFKLENGGYGFE
VMSKTDMDAFALQYSKGISSEYSPWKTNYIDMAKKTVIKKVLKYAPLKTEFQRALSND
ETIKTHFAVDMSEVEPETVIDMEEGELLESAS

ＷＰ＿１２８５２０９０４．１　ＲｅｃＴ　［Ａｂｓｉｃｏｃｃｕｓ　ｐｏｒｃｉ］（配列番号３４５）

【化２５９】

TTTNQQGMITKKANNSVAKKTNRTMKDYITMYQGEIAKALPSVMTPERFVRIATTAVT
NTPKLASCTPQSFIGALLNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYGNQCQFQIGYLGMVELAQRA
GTNVDAIIVVYANDEFDYSLGLIIPDIKIIVPAMKDRGEAIAYYAVWIINGENFGFEVMSR
EDVEKHMKKYSKTYSNGPWKTEFDEMAKKTVLKRALKYAPKKTDLARAVMQDETIK
QFNPKADNDMADAKNDFFDVEYDEVIDENTDPVTGEVK

ＧＡＫ０１４８３．１　ＲｅｃＴ　［Ｇｅｏｍｉｃｒｏｂｉｕｍ　ｓｐ．　ＪＣＭ　１９０５５］　（配列番号３４６）

【化２６０】

GYKGMIDLARRSGHIKSIYAHTVHANDEFEYELGLEPKLVHKPATGDRGNMEYAYAVA
HFVDGGYQFEVFSHHDIEQVKKRSKAGNFGPWKTDYEEMAKKTVVRRMFKYLPISIEIQ
QHASQDETVRRDITEEAEKVDNIIDLPNYEDPNNIDVPDEEQDEQKDEKQKQQGSAEEIA
LDFK

ＷＰ＿１３５３２９９６１．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｓｐ．　ＭＺ０４］　（配列番号３４７）

【化２６１】

STNLAARVEARRQNPTTKQPARRGKAAQQPTLVQFVQSMRGEIARALPSHVASPERIAR
IALTELRRVDHLAECTQESFGGALMTCAALGLEPGGVGGEAYLLPFWNKKVRAYEVTL
VIGYQGMVRLFWQHPAAAGLAAHTVHEGDEFDFEYGLEPFLRHKPARTGRGKPTDYY
AVAKMANGGSAFVVMNVEDIEAIRHRSKARDAGPWSTDYGLRRHGAQDLHSAVVQV
AAEVC

ＷＰ＿０７９５８８５８２．１　ＲｅｃＴ　［Ａｃｅｔｏａｎａｅｒｏｂｉｕｍ　ｎｏｔｅｒａｅ］（配列番号３４８）

【化２６２】

SNLKNELAKKANNSVTDGNKEPQTIKDWIKVMEPAIKKALPSVITPERFTRMALTAISVN
PKLAECTPKSFMGSLMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKGNMEVQFQIGYKGLIELAY
RSGEFANIYAKEVFENDEFEYEFGLEPVLKHKPASGNRGEVIAYYAVFKLTNGGFGFEV
MSKEDITNHAKTYSQAYSSSYSPWSKNFDEMAKKTVLKKVLKYAPIKVEFVKQIVQDS
TIKTEINSDMTEVESQNVFEAEETDYEVIDQEETK

ＷＰ＿１０７６３５８９２．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ］（配列番号３４９）

【化２６３】

ATQNEFKNQLAKKEDKGNTNAPTQTKSTNPRTIAQNYLAKMKPEIEKALPAHMSHERM
TRIALSAVNSNPELTEVILNNPTSFLGALMQSAQLGLEPNTNLGHAYLIPYYDKNSGKKI
VNLQLGYMGLLDLAHRSGMYQKIFAMPVYKDDYFEYQYGTNEKLNHVPAQVSKGEPI
GYYAFYKLTNGGVHFVYWSRQKMQMHKDRYTRRGSVWNNNFDAMALKTVIKDVLK
YAPKSVEMGEAVQSDENNFEFNEDSKVIDVTDYETEENK

ＷＰ＿１０７６３８９５３．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｈｏｍｉｎｉｓ］（配列番号３５０）

【化２６４】

ATANDFKNQVTKKESDNTKESSNKKTELATTSPRQVAQNYLEKMKPEIAKALPAHMSH
ERMTRIALSAVNSNPQLTEVILNNPTSFLGALMQSAQLGLEPNTSLGHAYLIPYNFKGKK
IVNLQLGYMGLLELAHRSGLYKKIFAMPVFKDDFFEYQYGTNEKLNHIPAQVQNGDAV
GYYAFYQLTNGGVHFVYWSRQKMERHKDLYTRKGSVWNTNFDAMALKTVIKDVLKY
APKSVEMSSAVQSDNSNFEFSEDSSTVIDVTDYETEDNK

ＳＵＹ４９７５０．１　ＲｅｃＴ　［Ｌａｃｒｉｍｉｓｐｏｒａ　ｓｐｈｅｎｏｉｄｅｓ］（配列番号３５１）

【化２６５】

ADVKQELEKRAAGSGGQSVKLTKNMTIVDMVKALEPEIKRALPCILTPERFSRMALSAI
NNTPKLGECTPMSFIAALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKGVLECQFQLGYRGLID
LAYRNERMQSIEAQVVYDNDEFSYELGLHPSLIHRPTFDEPGEIQAFYAIFRLDNGGFRFE
VMSKNYVDSLCHALFKSIYFRFQSLEK

ＣＤＥ６８２９１．１　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｓｐ．　ＣＡＧ：２７７］（配列番号３５２）

【化２６６】

DFKEELAAKAEVAATTKKSDGVKLTKNMSIVDMIKALEPEIKRALPSVLTPERFVRMAL
TAVNNTPALAQCTPMSFIAALMNAAQLGLEPNTPLGQAYLIPYKNKKKGVVECQFQIGY
KGMIDLVYRNDNVQTIQAHIVRENDHFEYELGLESKLRHIPAMEGRGEMMYVYALFKL
TNGGYGFEVLNKEAVIAHAERYSPSYDGFSPWKTDFESKGLELFLILDLSSKQSGK

ＷＰ＿０６０９０５３９１．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｓｃａｂｉｅｉ］（配列番号３５３）

【化２６７】

DADRMARIALTLIRKNPDLATCSGESFLGALMTCSQLGFEPGSPTQEAFIVPYKGEATFQ
LGYQGMVTLFYQHPMASSVKVETVRENDYFEHEEGLEEKLVHRPCKTGPRGKAIAYYS
VARLINGGRTFKVMYPAEIEERREKLPSKNSPAWRNSYDEMAKKTVLRNHFKALPKSA
ELARAMAHDGTVRTDWQPDAIDVPPEYLSEPQRPELGTGSTQ

ＷＰ＿１４６６７８２７１．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｉｒｅｌｌｕｌａ　ｓｐ．　ＳＨ－Ｓｒ６Ａ］（配列番号３５４）

【化２６８】

SEATKEAKPETAIAKKPNGIKDWLKSDALKTQIASVAPKHMAPERVMRIALNAVSRTPK
LADCTPESFMRCLLDLSSWGLEPDGRHAHLIPYGTECTLVLDYKGLVTLAYRSGWVKKI
HADVVFEGDIFVYSLGTVCQHIPWEFRDDANKPEHKGHFRAAYCVVTMADGIEKHEV
MTASEIDAIKAKSRSGNSGPWKDHYTEMAKKTVYRRASKWLPLSPEQADAMERDDDRI
IDAVSVAVTQRLSKAAMPLIGANETGDTE

ＷＰ＿１２６０３２９０９．１　ＲｅｃＴ　［Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｃａｓｔｏｒｉｓ］（配列番号３５５）

【化２６９】
GALATTAKNNELTTMNTMGDIHALIRGRRAQIESVMSGVLTPERLYSLLQSAVSHEPKL
LQCTPESIVACCMKCAVLGLEPSNVDGLGKAYILPYGNKNYQTGQVEATFILGYKGMIE
LARRSGEIKSLNVTPVFEDDGIKLFMDEAGQPYIKAGEVNPLANHTPDKLMFVFLNAEF
TNGGHYRTYMTRAEIDAAKKRSSAGDRGPWKTDYVAMARKTVVRRAFPYLPVSTEAQ
SAAVEDETTPHFDFLDRNTTPVGEPSDVMQEATA

ＷＰ＿１１４５９９５０５．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｗａｒｎｅｒｉ］（配列番号３５６）
【化２７０】
ATQNDFKNQITDKKENKPQQSTNPRQVASDLLERMKPEIAKALPAHMSQDRMTRIALS
AVNSNPKLSEVILNNPTSFLGALMQSAQLGLEPNTNLGHAYLIPYGNIVQLQLGYLGLLE
LAYRSGKYQKIMAMPVYKDDFFEYQYGTDEKLNHIPAQQQTGDAVGYYAFYKLTNGG
THFVYWSRQKMNMHQQQYSKGGNVWRNNFDAMALKTVIKDVLKYAPKSIEMGEAVT
SDNNNFDFKDGGDIIDVTDYETEEN

ＳＣＱ７２８６９．１　ＲｅｃＴタンパク質　［Ｐｒｏｐｉｏｎｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｆｒｅｕｄｅｎｒｅｉｃｈｉｉ］（配列番号３５７）
【化２７１】
TQQMPIKAQGEPTKELQQKAAVDRFNATLHQMQNEIARALPKHMTGDRFVRIVLTEVR
KNPTLALCDPLTMFGSLLTAAALGLEPGLNGECWLVPRKNHGTLEAQLQVGYRGVVKL
FWQNPAATYLDTGYVCERDEFRFAKGLNPILEHTPAEGDRGKVVRYYAVAGLNTGAR
VFDVFTPAQIKTLRGGKVGSNGDIPDPEHWMERKTALLQVLKLMPKSTQLAAVPAADG
RAHTISDAQQIFGGVDPTTGEVLDAEPVEDGAA

ＷＰ＿１２７１００７８０．１　ＲｅｃＴ　［Ａｓａｉａ　ｓｐ．　Ｗ１９］（配列番号３５８）
【化２７２】
SNALATPTEKLRTQITSMTGEFRNALPSHIKPEKFQRVVMTVVQQNQGLMNADRKSLLA
SCLKCAADGLIPDGREAALVMFGQQVQYMPMLAGIQKRIRNSGEIASIQAHVIYENDHFI
WHQGIDASIEHRPLFPGDRGKAIGAYAVAKFKDGSDPQFEVMDVAAIEKVRAVSRAGK
SGPWVQWWDEMARKTVFRRLSKWLPMDTEAEDLMRRDDENDAQDVAAPTIRVEAEA
PSKLDALEHDDDGVVLEETRELEGSAA

ＥＩＣ０９１１７．１　ＲｅｃＴタンパク質　［Ｍｉｃｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｌａｅｖａｎｉｆｏｒｍａｎｓ　ＯＲ２２１］（配列番号３５９）
【化２７３】
TDLSTVAAAAKQNPTMKDLVEAQLPAIERQLGGTMNSDAFVRAVLSEITKSPDLMQAD
PKTLLGGVMLAAQLRLEIGSGLGEFYLTPRKDHGRMICLPIVGFQGMVKLALRSEFVTN
VQAFIVREGDDFTYGANAERGMFYDWTPKDFEEKRPMVGVVATARMKQGGTTWAYL
TREQVEDRRPSYWQKTPWGSHPDEMAKKTAVRALAKYLPKATDLGRAIEADEQKVQH
VKGLDEVTVTRLDDEPETVVVQETTDAWAATPVAEVQP

ＷＰ＿１３６０４６２７１．１　ＲｅｃＴ　［Ｍｉｃｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｐ．　Ｋ４１］（配列番号３６０）
【化２７４】
SKDLSTAAAAAKSQPTMKDLVEAQLPAIERQLGGAMNSDAFVRAVLSEIGKSPDLMNA
DPKTLLGGVMLAAQLRLEIGSGLGEFYLTPRKDRGRQICLPIIGYQGMIKLALRSEYVLN
VQAFLVREGDDFTYGGNSERGMFYDWTPKDFEESRPWIGVVATAKMRGGGTTWVYLT
RTQVIDRRPSYWASTPWKTNEDEMVKKTAVRALAKFLPKSTDLGRALEADEAKVQHL
KGVDEVQVTRLDDDAETFVVQEQDPMSRTPEEQAEDEANR

ＷＰ＿１３６３０９２８７．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅ

ｎｅｓ］（配列番号３６１）
【化２７５】
SDLSVAAAAAKTQPTMKDLVEAQLPAIERQLGGAMNSAAFVRAVLSEIGKSPDLMAAD
PKTLLGGVMLAAQLRLEIGSGLGEFYLTPRKERGRQICLPIIGYQGLIKLALRSEFVMNV
QAFLVRQGDQFSYGANAERGMFYDWVPQDFEETRDWIGVVATARMRSGGTTWVYLT
RTQVIDRRPSYWNSTPWKTNEDEMVKKTAVRALAKFLPKSTDLGRALEADEAKVQTLR
GLDEVEVTRLDDEADTVVVQEQNPMSRTPEEQAEDAEAQR

ＷＰ＿１１０９９０９０７．１　ＲｅｃＴ　［Ｍｅｓｏｔｏｇａ　ｓｐ．　ＴｏｌＤＣ］（配列番号３６２）
【化２７６】
KASEIASMVKKEDERRNHKPDPLAGIVKNLTSIKGEIANALPDAGITPERMIRIVVTLLRQ
NKSLAEAAMQNPASLLGAVMMAAQLGLDPTNGLDQCALVPRKGKVCFDIMYEGLVEL
GYRSDRMESIVARTVYEKDTFSLKYGLNEELVHIPYLDGDPGESKGYYMVGKLKGGGN
IIVYMTKEQVHKIRDRYSVAYKAGLSGSRKDSPWFTSEDRMGEKTVVKAGFRWIPKSPII
RTALALDETAREASRLPMRN

ＷＰ＿１０９１９６２２４．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｓｐ．　ＣＳ０１４］（配列番号３６３）
【化２７７】
TENTVTAAVAVRDTGPAAQIEAYRDEYAALVPSHINADQWVRLAVGAIRGNEDLTNAA
RTDIGVFLRELKTAARLGLEPGTEQFYLTPRKSKAHRGQKIIKGIVGYQGIIELIYRAGAV
SSVIVESVRANDTFRYVIGRDERPVHEIDWFGGDRGDLVGVYAYATMKDGATSKVVVL
NHAQVMQIRAKSDSKHSEYSPWNTNPESMWLKSAVRQLMKWVPTSAEYMREQLRAQ
AEVAAEQPPAADLPPMPSVELNDEDEAVDAELVDEEA

ＷＰ＿０６８２０２７５９．１　ＲｅｃＴ　［Ｉｓｏｐｔｅｒｉｃｏｌａ　ｄｏｋｄｏｎｅｎｓｉｓ］（配列番号３６４）
【化２７８】
TQDLATAIADQQPAQRRTAFDLVESMRGELHKALPEHASIDNFLRLALTELKMNPQLGN
CSGESLLGALMTAARVGLEVGGPLGQFYLTPRRLKRDGWAVVPIVGYRGLITLARRAG
VGQVNAVVVHEGDTFREGASSERGFFFDWEPAVERGKPVGALAAARLAGGDVQHRYL
SLAEVHERRDRGGFKDGSNSPWATDYDAMVRKTALRALVPLLPQSTALSFAVQADEQ
VQRYDAGDIDIPALDETDTEDTK

ＷＰ＿１１４７９７３２７．１　ＲｅｃＴ　［Ｇａｉｅｌｌａ　ｏｃｃｕｌｔａ］（配列番号３６５）
【化２７９】
STAVARRDPVAEVCTTIASKEFEAKIVQALPDGVTPARFVRTTLTAIQQNPDVVKGTRQS
LYNAVIRCAQDGLLPDGREAALVVFRAKGTDVVQYLPMIGGLRKIAAEYGIKIETAVVY
ERDKFEWELGFEPRVLHVPPALGEDRGEPIGAYAVATDKLGRKYVEVMSRQEIEEVRK
VSRAATSEYGPWVKWWAEMARKTVGRRLFKQLPLHDLDERGERVISASDAEISFSPSG
LDSLPHVDPSEPEEVLTGDVMDDDDDDGIPFGEPAA

ＰＡＶ１０７１２．１　ＣＢＧ２５＿０１４５５　［Ａｒｓｅｎｏｐｈｏｎｕｓ　ｓｐ．　ＥＮＣＡ］（配列番号３６６）
【化２８０】
NTELETMNNVYDNLQSVIMQQGIAALLPAQVTPEQFTRTAATALIENVDLQNADKQSLV
LALTRCAKDGLMPDGREAALVVRSTKVNKQFVKKAVYMPMVDGVIKRARQSGQVANI
IAKVVYSQDEFEYVIDENGEHLTHRPAFVDGDDIVKVYAFAKLNSGELVVEVMSRAGV
EKIRDTVQSAKYDSSPWVKWFDRMALKTVIHRLARRLPCASELFSLFEVYEDANSTEKT
LRMAPASFKRLSIN

ＷＰ＿１４７９８１９４４．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｓｐ．　ｍｓ１９１］（配列番号３６７）

【化２８１】

VEHYKADLAQVMPSHVKPDTFIRLAVGVLRRDRNLAQAAQNNPAALMGALMDAAQL
GLTPGTEQFYLVPRKKAGRLEVQGIRGYQGEIELIYRAGAVSSVIVEVVRQADTFRYSPG
RDERPEHEIDWDAEDRGPLRLVYAYAVMKDGATSKVVVLNRAQVMKAKAMSQGSDS
AYSPWQKHEEAMWMKTAAHRLTKWVPTSAEYMREQLRAAAEVAAEHRPTPVAAAPG
MPSVPGEDEAIEAEFVDEDEVA

ＢＡＱ９３８０６．１ファージＲｅｃＴファミリー（ＴＩＧＲ００６１６）　［非培養ＭｅｄｉｔｅｒｒａｎｅａｎファージｕｖＭＥＤ］（配列番号３６８）

【化２８２】

TSSITPLVAMQGTLEKMADKFTEALPRQMDVNKFISVAKLTLNKNPRLLQADKTSLMQ
TFMKAAQDGLYLDGKEAAAVQYGQSVQYIPMVEGIIKVLHNSGLIKTISAEVVYENDFF
DYELGTAPKITHKPLIVGDRGKPMCVYAVAITTNDGEYYEVMNMDQINQCRQVSKASS
SPHSPWVKWFDQMAKKTVIHRIAKRLPKNDAINSVVTVDDEPNFQQAVNVTPSEPKDS
LSRLRDSIGMEGKDVEQAANDLLEKYNKEAREE

ＷＰ＿０６１４０５２６２．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ］（複数種）（配列番号３６９）

【化２８３】

SQISNALATRDQGPAAQIEQYRDEYAALVPSHVNADQWVRLAVGAVRGDEKLMEAAQ
NDIGLFLREMKTAARLGLEPGTEQFYLTPRKSKPHGGRKVIKGIVGYQGIVELIYRAGAA
STVIVEAVRENDTFRYVPGRDDRPVIHEIDWFANDRGPLVGVYAYAVMKDGAVSKVVV
LNRSRVMEFKAKSDSKHSEYSPWNTNEEAMWLKSAVRQLAKWVPTSAEYRRDQLLAH
TETADSVVASVSTAPLPPQPSALDDADPDDDGPIDAELVD

ＷＰ＿１１４０１４９６５．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｒｅｎｉｏｃｈａｌｉｎａｅ］（配列番号３７０）

【化２８４】

SQISNAVAKRDNSPGAMVQQYKADFSTVLPDHVKPDTWVRLAQGVLRRDKNLAQAAE
RNPGSLMTALLDCARLGHEPGTESFYLVPFGGEVQGIEGYRGVVERMYRAGAIASVKA
EVVCQGDDFDYQPDMDKPRHRVDWFGDRGPIVGAYAYAIFKDGSTSRVAVINRAYIDK
VKKESKGSDRATSPWMKWEEQMVLKTVAKRLEPWVPTSNEWRREQLRAAREVANEP
TPPTTPAPPAPEQVDPDTGEVIDGELVDDTPTQ

ＷＰ＿０２７６９９７４８．１　ＲｅｃＴ　［Ｗｅｉｓｓｅｌｌａ　ｏｒｙｚａｅ］（配列番号３７１）

【化２８５】

SNNLTSAQYFNAPNIKGKFEEVLGKNANGYVTSLLSVINGSQQLQRAEPSSIMVAAMKA
ATLNLPIESSLGFAYIVPYGNNAQFQIGYKGLIQLALRSGQIKGLNSGVVYETQFISYDPL
FEELEIDFKKPAEGKIAGYFASMKLTNGFSKVVYWTKEQVEQHRDRFSKGKNNGPWKS
DFDAMAQKTVMKAMISKYAPLNQEMQQAIVEDSESELTVPRDVTTSNEAAELNSLLTT
PKVQEGANTDLSEPFPNAEETQLFDDLASVTGD

ＳＹＷ１３６９２．１　Ｐｈａｇｅ　ＲｅｃＴファミリータンパク質　［Ｏｅｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｏｅｎｉ］（配列番号３７２）

【化２８６】

SNELKTILNAPTTKEKFDEVLGRNAQGYINSVLNAVGNSKLLQNASPNSILSGAMKAAT
LNLSIDPNLGYAYFVPYGHEAQLQIGYQGLIQLAQRSGQIKILNAAPIYDEQFKSLDPVTG
KLTLNKKIVPDTNKKPTGYVAYLKTVTGFEHTEFMSYADIEKFAKRFSKSFNSSTSPWK
TDFNAMAKKTLIKQVLKYAPMSIDLQTAVSADNDDIEPKDITPDEDKETVDKISNLISDN
KQDDTLSQLEEVANANN

ＷＰ＿１４１１５８２５０．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｓｅｕｄａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ　ｓｐ．　ＮＩＢＲＢＡＣ０００５０２７７１］（配列番号３７３）

【化２８７】

TSQLAEATAAKAVEQRKNPTARDLIQAQQAAIETQLAGAMNSAAFVRAAISSVSASPQL
QQATPASLLGGIMLAAQLKLEIGPALGHFHLTPRMVSKKDGDNWVEVWTCLPHGYQG
YIELAYRSGRIEKIESLLVRKGDKFDHGANSERGRFFDWAPADYEETREWTGVIALAKIK
GAGTVWAYLPKEKVIARRPDRWEKTPWATNEEEMARKSGIRALAPYLPKSTELGKALE
ADEHKVEHIAGVHDLVVSKAEDEPLEEPTA

ＴＡＫ０４１８３．１　ＥＰＯ３４＿０３４９５　［Ｐａｔｅｓｃｉｂａｃｔｅｒｉａグループ細菌］（配列番号３７４）

【化２８８】

TNQPTTHVATTPNQRPATTLEQFRHQLVGDYQKQVLNYFNGQKEKAMKFMSAVVYSA
QKNPALLECDRITLLHAFMACAEYQLYPSSVSGEAYVIPYKGKAQFQLGYQGIITLLYR
AGVEAVNAQIICENDAFEYEEGLEPNLVHKPNVLKDRGKPIGVYAIAAINGHKLFKVLSE
AEVMKFKGFSQSKNSEYTPWNPDNDPELWMWRKTAIKQLSKLLPKNDALQKAISEDN
QDSVIEARRSTLDAGGPAVGRALHDPNASNEPEGK

ＷＰ＿０９２６０１２０２．１　ＲｅｃＴ　［Ａｃｔｉｎｏｐｏｌｙｓｐｏｒａ　ｘｉｎｊｉａｎｇｅｎｓｉｓ］（配列番号３７５）

【化２８９】

TGQTIGTAVAKKDDENPSAIIATNRADLARVMPSHVRTDSWVRIAQGIVRRDKNLAHAA
RQSPGTLMVALMEAARLGLEPGTEQYYLTPRKNKGKPEVLGIPGYQGLIELMYRSGAV
SSVVVETVRENDTFQWAPGRMERPEHEADWFAINGERGQLRGVYAYAIMSNGATSKV
VVLNRNDIARARDSAQGADSEHSPWKNHEEAMWLKTAARRLAKWVPTSTEDRRIVQG
VAERSDQPTEAPLDLTDEPDTDQPIEGELVDEEATQ

ＷＰ＿０６７０２４９６９．１　ＲｅｃＴ　［Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｐ．　１２４５４９９．０］（配列番号３７６）

【化２９０】

TTQPEYKPVAQGADKQMTTGKLLKMLEPEIGRALPKGMDPDRICRLVMTEVRKNPMLT
QCTQESFAGALLTASALGLEPGVNGEAWLVPYRDRKRGIVECQFIMGYNGVAKLFWQS
PHADRLDAQLVCANDHFRYVKGLSPILEHVESDGDRGDPIAYYAIVGVKGAQPMWDVF
KPEAIAQLRGGRVGTKGDIDDPQRWMERKTALKQVLKLAPKSTRLDLAIRADERSGSDL
YKSQGMEVHAIEPGFIETEAEPETQEQ

ＷＰ＿０７５７３７４８５．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ａｃｉｄｉｓｃａｂｉｅｓ］（配列番号３７７）

【化２９１】

TDNAISNAIATRDNGPEAIVQQHRDDLTLVLPAHHKGETWMRLATGALRRDANLRQTA
ARNPGSLMNALLECARLGHEPGTESFYLVPFGNEVQGIEGYRGIVERIYRAGAVKAVKA
EVVYENDHFRYHPGMDRPEHEPDYFADRGRIIGAYAYGVFQDGSTSRVVVINRAYIDK
VKKESKGSDRASSPWVKWEEGMVLKTVARRLEPWVPTAVEWRTEPTPASAAEATAPV
GDGVKAIAAPAPTSPYDDEGPIEGEFVDEYDGGAA

ＡＫＴ７３１８２．１　ＲｅｃＴ（プロファージ関連）　［Ｙｅｒｓｉｎｉａ　ｐｅｓｔｉｓ］（配列番号３７８）

【化２９２】
NQVATLESIHADLSSALTRQGIQSLLPSHVSPEQFTRTAATALVADPELQNADRQSLVMS
LIRCAQDGLVPDGREAAMVVYNTKQGDQWVKKAQYLPMVDGVLKRARQSGQVANIT
GKVVHMADKFDYWVDENGEHIEHRPAFENHGEIRLVYAFAKLTSGEIVVEVMSRSEVE
KVRDATAKKDRDGKPKVPAVWQKWFDRMALKTVLHRLARRLPCASELYSLLDVNQIA
DEAEKPAECGAQRESSTTAA

ＷＰ＿１２３１２７０７８．１　ＲｅｃＴ　［Ｒｕｆｉｂａｃｔｅｒ　ｌａｔｅｒｉｃｉｕｓ］（配列番号３７９）
【化２９３】
SNQLQVAREQVISAQKSFKNVPNNKLDFEREAGFAMQMIQSNPFLASMDANSIRNCIVN
VALTGLTLNPVLKLAYLVPRKGKLILDPSYMGLINVLVTSGAAKKIEADVVCENDFFDY
EKGTNGFIKHKPSLSSRGEIIAAYAIAHLPNGEVQFEIMNREELEKVRKSSEAAKKGSSPY
DGWASEMMRKAPIRRLFKYLPKHNIPDQVINTLSLDEQNNGVDFSAQKQEAFKGKAAD
FFEDEPANTVDADYTDMSHEEADNELAA

ＷＰ＿０９３５８７５８４．１　ＲｅｃＴ　［未分類Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ］（複数種）（配列番号３８０）
【化２９４】
SQIGNAIATRDEGPAAQIEVYRDEYAALVPSHVNADQWVRLAVGAIRGNDDLLKAAGN
DIGLFLREMKTAARLGLEPGTEQFYLTPRKSKAHGGRPVIKGIVGYQGIVELIYRAGAAS
TVIVEAVRQNDVFRYVPGRDDRPVHEIDWFGQDRGPLVGVYAYAVMKDGAVSKVVVL
NKARVMELKAKSDSKNSPYSPWNTNEEAMWLKSGVRQLAKWVPTSAEFRRDQLLAHT
DTADGVIASVSAPPLPPQSAALEDLDPDDEGPIDGELLDD

ＷＰ＿０３０９７５２１４．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｓｐ．　ＮＲＲＬ　Ｓ－１８２４］（配列番号３８１）
【化２９５】
SEISNAIATRDQGPAAQIEAYRDEYAALVPSHINVDQWVRLAAGAIRGNEDLMEAARND
IGVFLRELKTAARLGLEPGTEQFYLTARKSKAHGYALIIKGIVGYQGIVELIYRAGAVSSV
IVEAVRANDTFSYVPGRDDRPIIHEIDWFGGDRGPLVGVYAYAVMKDGAVSKVVVMNL
KRVMEIKARSDSKNSQYSPWNTDEESMWLKSAIRQLAKWVPTSAEYKSEQLRAHAEAI
GELASVASAPLPPQPSVLDDVDPDDEGPIEGELVD

ＲＫＴ６０１０４．１　ＲｅｃＴ　［Ａｇｒｏｍｙｃｅｓ　ｓｐ．　ＯＶ４１５］（配列番号３８２）
【化２９６】
STTVALPAQKAEAVIQQVTGAANGFAAALADRIGPDRFVRAAVTSIRTSPQLAQCEPLSI
LGGLFVAAQLALEVGGPRGLAYLVPYGREAQLIVGYRGYVELFYRAGARKVEWFIVRD
GDTFRQWSTGRGGRDYEWTPLDDDSNRRPIGAVAQIQGAHGEFQFEHMTVDQINERRP
KRATSGPWVDWYEEMALKTVMRQLAKTARQSIDDLAFAAANDGAVITQVEGGQARV
VHPATSEPEQPLSLDALERTPGELAEETNP

ＷＰ＿０１７４１５７４７．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｔｕｎｉｓｉｅｎｓｅ］（配列番号３８３）
【化２９７】
TTKANVTSVKNALKEQIQVQQVAAQTDTSFQGVLTKQLQHQFKAIQSLVPKHVTPERLC
RIGINAASRNPQLMNCTPETIVGAIVNCATLGLEPNLLGHAYIVPFYNNKTGKMEAQFQV
GYKGALDLIRRTGAVSTLSAHEVYGPRSIFWTQYFY

ＲＹＥ０５８３６．１　ＥＯＰ３３＿０１０６０　［Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａｃｅａｅ細菌］（配列番号３８４）

【化２９８】

TNSIETNIEDLSPGNQTKTQISETNAPIVSEIRTIKRDGVYDLCSSRREKVLPFLGNNSQKF
ERLARSFAFEINTNPKLASCDQLSILQAFYKCCEYGLDPASSLQQIWMIPYNGKIDFQIGY
KGWLQLLWGSKLITNAYSCAVYQGDQFEYELGLNPNIKHIPQHKSINDVNELIATYGVI
KLKSNEVQLRVCWRDELEKSKKSSKSNGREDSPWNRHFEAMALIVPMRKMAKNLALA
LRAEDFDDEDYVNENNNQGMA

ＷＰ＿０５２３９９１４７．１　ＲｅｃＴ　［Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｓｐ．　ＦＳＣ１００６］（配列番号３８５）

【化２９９】

SNLVVAKQCLASAEKSFIGISGDEKKYKRECNFAVQSLQANSYMLQQANANPNSLRNAI
INLASMGLTLNPAEKKAYLVPYGGKNPRVDLQISYMGLIDLAISDGAIMWAQAKVVRQ
NDLFNITGVDTPPEHKYNPFDSEQTRGDVIGVYCVAKFPNSDYITEIMSITDINSIKSRSSG
VKSGNTTPWDTDFDEMAKKTVIKRASKYWKGSSKLSKAIDFLNNENNEGINFNKQEEK
PKQNINDLMNDDVVDIDSEVGDE

ＷＰ＿０６７３４９１０７．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｎｏｕｒｓｅｉ］（配列番号３８６）

【化３００】

TSPIRAAVARRAGDPAALISQYTADFAAVLPSHIKPATFVRLAQGILRRDEKLAQAAAND
PGQFMSVLLDAARLGLEPGTEAYYLVPFKGRVQGIVGWQGEIELMYRAGAISSVIVETV
REDDVFVWTPGLVDRETPPRWEGPMSYPFIEVEWAGDRGPLRLVYAYAVMKGGATS
KVVVLNAQDIERAKKTSQGADSPSSPWRQHEAAMWSKTAVHRLAKYVPTSAEYITAQ
VRAVRQADALSAPPVEEVVDVELVGDGQEQEARR

ＷＰ＿１４３８８７８０２．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌｕｔｅｔｉｅｎｓｉｓ］（配列番号３８７）

【化３０１】

ANQLQMSHKDFFNRPAVKNKFSEVVSGKSDQFITSLLSVVNNNKLLSKADNNSILNAA
MKAATLNLPIEPSLGSAYIVPFKGQAQFQLGYKGLIELAQRSGQYKSINAGVVYKAQFK
SYDPLFETLDLDFNQPQDEVIGYFACFELLNGFRKITYWTREEVYNHGKRFSKSFNNGP
WKTDFDAMAKKTLLKSIIGTYGPKSVDMQEAITDDNKTEYEKAEPIDVTPQEENLTDLI
GETPQEELPIANPETGEIQEEQTALFNQLGDLTDD

ＷＰ＿０７３７９３１４３．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｕｎｃｉａｌｉｓ］（配列番号３８８）

【化３０２】

SQISTAIATRDNGPAAVVEQYRESLALVMPSHLQQRVGAWIRNTQGLLRRDSKLMEAA
QNDVGQFVAVLMDAARLGLEPGTEHYYLVPRWNNKKRATEVTGVRGYQGEIELMYR
AGAVSSVIVEVVHTQDQFRFRPGRDARPVHDIDWDLEDRGSLRLVYAYAVMKDGATS
KVVVLNRQHIAAARAKSDSAAKDWSPWNTDEEAMWLKTAAHRLTKWVPTSAEYLRE
QIRAQVAVESEQRPEPLPVAPPPAPGTVDADPDDEGPIDGELVD

ＷＰ＿１１６２００７０９．１　ＲｅｃＴ　［Ａｍｙｃｏｌａｔｏｐｓｉｓ　ｃｉｒｃｉ］（配列番号３８９）

【化３０３】

ISQTVTTAVAQQKDSSPAALVRKYRTDFATVLPSHIKPETWLRIATGALRRSPQLANAA
KRNPSSLLVALLEAARKGLEPGTEQFYLVPRKGKNGPEVLGITGYQGEVELMYRAGAV
SSVKVEVVREHDTFAYNPGEHDRPVHEIDWRADRGDLVLTYAYAVMRDGATSNVVVL
SADDIAVILKKADGADSPFSPWQWNPKAMWLKSAARQLAKWVPTSAEYVRLPDVPLE
SLPPAKPLDLPRVDDVVDAEIVEDWPTAPDDTADGAR

ＷＰ＿０２０１３５１１１．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｓｐ．　３５

１ＭＦＴｓｕ５．１］（配列番号３９０）
【化３０４】
SQISNAIEKRDQGPGAVIEQYKQELALVAASHVKVDTFARLAVGALRQNPKLAAAAQS
NPGSLMSALMTAARLGLEPGTEQFYLRPIKRKGVAEVQGIVGYYQGIVELIYNAGAASSV
VVEVVRANDQFNYVIPGLHERPVHNVDWFGDRGDLVGVYAYAVMAGGATSKVVVLSR
THINRAKAKSDGADSDYSPWRTDEEAMWLKTAARRLGKWVPTSAERLTMPAERTDTV
LPVGSAAPALDAADPDEDEGPVDGELEPAGGWPETAQPPQ

ＷＰ＿０９９４２１１８０．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｍａｃｅｄｏｎｉｃｕｓ］（配列番号３９１）
【化３０５】
ANQMQVSHKDFFNSPAVKNKLSEVVGGKSDRFIASLLSILNNNKLLSSADNNSILTAAM
KAATLNLPIEPSLGFAYIVPYKRQAQFQLGYKGLIQLAIRSGQIKSINSGVIYKAQFKSYD
PLFETLEVDFSQPEDEVAGYFATIELLNGFKKLIYWTKERAYNHGKRFSKSFGNSPWQT
DFDAMAQKTLLKQIISKYAPLSVELQEAITADNENEDEKAAPIDVTPQEESLSDLIGEAA
QEELPAADPETGEIQEEQTALFEQLGDLTDD

ＷＰ＿１４１９２５９０４．１　ＲｅｃＴ　［Ｈａｌｏａｃｔｉｎｏｓｐｏｒａ　ａｌｂａ］（配列番号３９２）
【化３０６】
GQSVTNAVAQRDTSPSGMVGKYRDDFAQVMPSHVNGAGWVRIAQGILRRDAKLAEAA
RNAPQSLMSALMDAAQQGLTPGTTEFYLVPRKRKGSLEVQGITGYQGEIELIYRAGAVA
SVVAEIVHEHDTFEWIPGKHERPIHEADWFGNRGTMVGAYAYAVMNSGSTSKVVILNQ
HDIEKARAMSDGADSSYSPWQKWPESMWLKTAAHRLAKWVPTSAEYRHEQERARAR
SEDTEIPASPDSDVVHAEIVEENDDEQAT

ＷＰ＿１３６７１０８３６．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｔｙｒｏｂｕｔｙｒｉｃｕｍ］（配列番号３９３）
【化３０７】
SDKKMVVLGESHKALSKLLETKQEALPKDFNKARFLQNCMTVLQDTKDIDKCQPISVA
RTMLKGAFLGLDFFNRECYAIPYGGNLQFQTDYKGEIKLAKKYSFNSIKDIYAKIVREGD
DFQESIEDGRQTINFKPLPFNNGEIIGAFAVCLFQDGSMLYETMTKQEIEDIRNNFSKAKN
SPAWVKTPGEMYKKTVLRRLCKLIELDFDSVETKKTYDETSEFEFGSANHEVSNFDKDD
SNIIEADAEIQDDVQEGDGEDE

ＷＰ＿１３２１１００７３．１　ＲｅｃＴ　［Ａｃｔｉｎｏｃｒｉｓｐｕｍ　ｗｙｃｈｍｉｃｉｎｉ］（配列番号３９４）
【化３０８】
SQTVTAAVAQRDNGAQALIAKYRTDFAQVLPSHLRPTTFVRLSQGLLRRNVKLAEAAE
RNPASFLAALLECARLGHDPGTDQFALVPFNDRKRNTVEVVGIEQYQGVIERMYRAGA
VRSVKAEVVRAADPFEYAPDVMDRPGHKPNWFADRGELIGVYAYAEFFDGSTSRVVM
MNRETVMAHKAKSRGATSEDSPWQAWEESMWLKTAVHELEKWVPTSSEDRRAARDG
TADPAPVEVPRVADEVLDADLVEDDHADHPTATPTGDVR

ＷＰ＿１２５７６９５０９．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｏｍｐａｎｉｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｆｕｒｆｕｒｉｃｏｌａ］（配列番号３９５）

【化３０９】

VNNLAKLPIQTLVKEPKIVEKFESVLGNKSAQFVTSLINVVNSNQSLKNVDQMSVVASA
MVAASLDLPINQDLGYMWLVPYGGKAQPQMGYKGYIQLAQRTGQYKHLNAVAVYED
EFQSYNPLTEQLDYEPHFKDRDSSEKPVGYVGYFELTSGFEKTVYWTRKQIDDHRQSFS
KMSGKSKPSGVWATNFDAMALKTVLRNLISKWGPMSVEMQKAYESDEHATTISANDI
KDIEVQEQEPATDVSQLINGSATEVNVNDSTTNSKDSE

ＷＰ＿００４２３４４３７．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐａｒａｕｂｅｒｉｓ］（配列番号３９６）

【化３１０】

ANQLTVVNTLQSDAVKEKFEAVMGEKANGFVSSVLSVVTNNNILSKADFNSVYTSAMK
AAVLDLPVEPSLGMAHIVPYKGKAQFQIGYKGLIQLALRSGQVVGLNAGKVYEGQFKS
FNALTEKLDIVDIYNPKKDEPIVGYFAYMKLSNGFEKTTYWTKEQVEEHGKKYSQSYDS
KFSPWQTNFDAMARKTVLKSILSTYAPLTIEMQNANDFDNGKNTGIEPLEVKDVTPETD
NESLLTDLLEDEPSVNTETGEIIEDTELDLDYGQINAK

ＷＰ＿００６８４５７１１．１　ＲｅｃＴ　［Ｗｅｉｓｓｅｌｌａ　ｋｏｒｅｅｎｓｉｓ］（配列番号３９７）

【化３１１】

ANELVKQLKSEKVAAQFETTAGKNAAAFASEVAISVMGNKALENASLSSVVVEATKAS
ALGLSLLPTVGEAYLVPYKGQAQFQLGYKGLVQLAMRSGQMKSFGTVKVYEGEHPRW
DKYSQELHTDGDETGEVVGYYAQFTLINGFKKADYWTKSAVEEHRSRFSKSKSGPWST
DFDAMAQKTVLKSILQYAPKSSEMTRAMASEDMNGDISEGTAKPIDITPETETPKVEEA
NQNQQIDTNEMVDEIKEYAKETNEAPKEQTVSAADEFFK

ＷＰ＿０７３８４６１８５．１　ＲｅｃＴ　［Ａｍｙｃｏｌａｔｏｐｓｉｓ　ｓｐ．　ＣＢ０００１３］（配列番号３９８）

【化３１２】

TTQTVTSAVAQQDSSPAALVRKYRTDFATVLPSHIKPETWLRIATGALRRSSQLAHAAE
KNPTSLLVALLDAARKGLEPGTEQYYLVPRKTKRGPEVLGITGYQGEVELMYRAGAVS
SVKVEGVREHDTFAYNPGEHDRPVHEINWRANRGDLVLAYAYAYAKMRDGATSNVS
VLSADDIAVILSKAEGADSPFSPWQWNPKAMWLKSAAHQLAKWVPTSAERVWQPDGP
PLEAPPATPVTLPTVEDVVDAEVVEDWPITPADTADSEQ

ＷＰ＿１４２５１１２２９．１　ＲｅｃＴ　［Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ　ｐｓｅｕｄｏｍｅｓｅｎｔｅｒｏｉｄｅｓ］（配列番号３９９）

【化３１３】

ANEITLAKQLSSDKVVEQFAATAGESAKSFAKEVALTISGNPALQHAKLGTVIVEATKAS
ALGLSLLPTVGEAYLVPYKGDAQFQLGYKGIVQLAMRSGQMKSFGAESVYEGENPKW
DKYNQELVTDGEETGKIIGYYAFFTLVNGFKMAAYWPKEKVEAHRDRFSKSKKGPWST
DFDAMAKKTVLKSILQYAPKSSEMKRALAEDTQAEYVQAGIQDVTPEPANIEAPIETAN
APEINAQEESLFGELSDVDKETAPNPFAQNLGGDN

ＷＰ＿０２３０５５８０４．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｅｐｔｏｎｉｐｈｉｌｕｓ　ｓｐ．　ＢＶ３Ｃ２６］（配列番号４００）

【化３１４】

TNIQKQENRALSPVNQMKNLLANQGMQNLFADALKENKDRFIASIIDLYNGDNYLQNC
DPKEVAMEALKAATLNLPINKSLGYAYIVPFKNKGKLTPQFQIGYKGYIQMAQRSGQYK
ALNAGIMYEGMEIKRDFLRGTFEIVGEPKSDKAIGYFAYFQLLNGYEKALYMSKEDITD
HAKRYSQSFGSDFSPWKNQFDEMAQKTVLRRLLTKYGVLTTEFQEAAKREEDEEVLKA
TEENAMIEMNSQEETIAVDPKTGEIIEETEAPF

10

20

30

40

50

ＰＣＲ９８６６１．１　ＲｅｃＴ　［Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｆｕｊｉｅｎｓｉｓ　ＪＣＭ　１６３９５］（配列番号４０１）

【化３１５】

KSAPVQARFQEVLGKKSSGFVSSLLTVVNNNNLLKRATPDSIMTAAMKAATLDLPIEPS
LGFAYIIPYGQEAQFQIGYKGLIQLALRSGQITGLNSGIVYKSQFISYDPLFEELEIDFMQP
EDEVVGYFASMKLSNGFMKVVYWTKARVENHKKRFSKAGAKSPWATDFDAMAQKT
VLKAMISKFAPLSQEMQIAVIADNESETLEPKDVTPEQPLISIDEPKENENSQSQISIPEDQ
APQQENEEFVEELFPVGQA

ＷＰ＿１０６３１６８０３．１　ＲｅｃＴ　［Ａｃｔｉｎｏｐｌａｎｅｓ　ｉｔａｌｉｃｕｓ］（配列番号４０２）

【化３１６】

PETIANAVAQRDQSPTALVADYRNDFAAVLPSHLPPATFVRLAQGVLRRDQNLMRTAM
NNPGSLMTAMLDCARLGHEPGTPAYYFVPIKGAIEGWEGYRGVIERIYRAGAVQSVRA
EVVRENDFYEYEEGMPHPIHRYERFASPEQRGPLLGVWAYAVMLDGGMSRPVEMGRE
EVLAHRDMNPSNNRSDSPWKKWERSMWLKCAVHELEKWVPSSTEYRREIARMSAPQP
AAAAAPVTYVPPQVGQRDAIEGEVAEDWPEPAEVPGGAQ

ＷＰ＿０１３６５５８３０．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｅｌｌｕｌｏｓｉｌｙｔｉｃｕｍ　ｌｅｎｔｏｃｅｌｌｕｍ］（配列番号４０３）

【化３１７】

SDKKELVLKETHSRLNQLLATKMEAMPKDFNQTRFLQNCMTVLQDTKGIENCHPVSIA
RTLLKGAFLGLDFFQRECYAIPYGGELQFQTDYKGETKMAKKYSIRDIKDIYAKVVRKG
DEFKEEIVAGQQVVDFKPLPFNDAEIIGAFAVVLYQDGGMEYETMSTKQIEGIRDNFSK
MKNGLMWTKTPEEAYKKTVLRRLTKKIEKDFASIDQAKAYEESSDMQFKQDEQKQDA
KDPFADAVDVEFTEETEGQVRLDGEADGAK

ＷＰ＿１４８００１９８８．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｓｐ．　ａｄｍ１３（２０１８）］（配列番号４０４）

【化３１８】

SQIGNEIARQSHSPAAIIEQHKADLAVVAASHVRVDTFARLAVGVLRQNEKLAAAAANN
PGSLMSALMTAARLGLEPGTEQFYLRPIKRKGQLEVQGIVGYQGIVELIYNAGAAQSVV
VEVVRARDEFAWTPGALDEHRPPRWPGAMKQPHHKVDWFGDRGPLVGAYAYAVMQ
GGAISKVVVLNRDHIARAKAKSDGADTDYSPWRTDEEAMWLKTAARRLGKWVPTSAE
KRTGVIERLDTPPAPLNEIDPDEDDEPIDGELVD

ＷＰ＿０１１９８８９８５．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｋｌｕｙｖｅｒｉ］（配列番号４０５）

【化３１９】

PDKKMMVLSESHKALNKLLETKKEALPKDFNKSRFLQNCMTVLQDTKDIDKCQPISVA
RTMLKGAFLGLDFFNRECYAIPYNGNLQFQTDYKGEIKLAKKYSINPIKDIYAKVVRKG
DEFQESIVNGHQTVNFKPLPFNNDEIIGAFAVCLFQDGSMIYETMTKQEIEDIRNNFSKAK
NSPAWVKTPGEMYKKTVLRRLCKFIELDFNSIESKKTYDEASDFQFEHEPNKEVSNFDK
GSIDEDKTVEADTETEAKEDNREYAFKESE

ＧＡＣ４２７８６．１組換えＤＮＡ修復タンパク質　［Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｏｐｉｌｌｉａｅ　ＡＴＣＣ　１４７０６］（配列番号４０６）

【化３２０】

STSHLLTIIHNNLEKLIDSKREAMPKSFNKTRFLQNCMTVLQDTKDVGKCDPQSVARTLL
KGAFLGLDFFNKECYAITYGGSVQFQTDYKGEKKLAKKYSVRPVKDIYAKLVREGDEFI
EEIKDGQPTVQFKPLPFNDSEIKGAFAVSLFEDDGLAYEVMSVAEIELTRKNYSKQPNGQ
AWVKSKGEMYKKTVLRRLCKNIELDFDTIEQAQAFEDSSDFEFNKEPKQAQQSPLNPQA
TVIDAEYEEVKEESDNETNQE

ＯＢＲ９１０２２．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｒａｇｓｄａｌｅｉ　Ｐ１１］（配列番号４０７）

【化３２１】

LDKQANGFITSLLNLKQDKLKGCNDMTVLGSALKAAPLKLPIDPNLGFAWIIPFKNHGK
LEAQFQVGYRGFIQMAQRSAQYKKLNVTEIYEGQLKSFNPLTEELELDLDNKQSDEVVG
YAAYFRRLNGFEKMVYWSKEKVTAHARRFSKSFGNGPWKTDFDAMARKTVLKNMLS
TWGILSIDMQEAITSDSKIIKTTEDDYELLEEGTEDESNANVTDVEYTESDESGKEEDGK
DPYEGTPFSENNTES

ＳＥＩ７７１９５．１　ＲｅｃＴ　［Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｏｌｙｍｙｘａ］（配列番号４０８）

【化３２２】

PDKLLVIHDNLNKMLDEKSEAMPTSFNKTRFLQNCMAVLQDTKDIEQCDAKSVARTML
KGAFLGLDFFNKECYAIPYNENIGTKNKPRWIKSLQFQTDYKGEKKLAKKYSTRRVKDI
YAKLVRDGDDFREEIESGQPTINFRPLPFNDGIIRGAFAVALFEDGGMIYETMSLKEIEKT
RDDYSKQSTGKAWTKSPGEMYKKTVLRRLCKNIELDFDTIEQAQAFEDSSDFDMNKEL
KPQQQSPLNPNTTIIDAEYEEIKEEPADGPEQE

ＫＫＴ７２１５４．１　ＲｅｃＴ　［Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ　Ｃｏｌｌｉｅｒｂａｃｔｅｒｉａ細菌　ＧＷ２０１１＿ＧＷＢ１＿４４＿６］（配列番号４０９）

【化３２３】

SNQIQIKSEVDLKMILANQYMKQINNFFGNEKQAMKFLSSVMSAVQRIPELLNCEPKSLI
NSFMTMAQLGLMPSEVSGEAYVLPYNNKNGKVAQFQLGYQGLVTLFFRAGGQKIRAEI
VRKNDEVSYVNGEIKHTIDIFKSNEERGEAVGAYAVATINGQEVCKYMNATDILAFGSR
FSKSWTTSFTPWKEANDPELNMWKKTVLKQLGKMLPKNESINLAIAEDNKDSIISDRLL
PAVEESKNLTMGSIVKTEEPVIEVEPEEIKQ

ＷＰ＿１２５７７７１６３．１　ＲｅｃＴ　［Ａｎｔｒｉｂａｃｔｅｒ　ｇｉｌｖｕｓ］（配列番号４１０）

【化３２４】

SADVVIRQHATELTSVLPSHLAEKGDGWLNAAVAAVRKDRNLWNAANSDPGAVMNA
LAEAARLGLQPGSKEYYLTVRGGKVLGIVGYQGEIELMYRAGAVSSVIVEPVFERDGFE
YTPGVDDRPKHRIDWDADDRGPIRLAYAYAVMKDGAVSKVVVVNKTRIRRAKDASAT
AGKSHSPWTSDEVAMWMKTAAHDLAKWVPTSAEYIREQLRAVKEVEAEPARASDPRP
EPVHIVEAQILDEDPFPNAPEDGAA

ＷＰ＿１３０１２３２２３．１　ＲｅｃＴ　［Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．　Ｓ－１３］（配列番号４１１）

【化３２５】

SNQITKTQQTLKSPEVKAKFEEVLGKKADGFVASLLSVVGNSNLKTVEANSVMTAAMK
AATLDLPIEPSLGFAYVIPYGREAQFQIGYKGFIQLALRSGQLTGLNCGIVYESQFVSYDP
LFEELELDFTQQASGDAVGYFASMKLANGFKKVTYWSKEQVLAHKKKFVKSANGPWR
DHFDAMAQKTVLKAMLTKYAPASIESKMIQTAITEDDSERFENAKDVTPDEPVISIDEPV
TSEVSQNESSAESQEQFPEDEVEELFPIGKS

ＷＰ＿１４７２６５８１９．１　ＲｅｃＴ　［Ｎｏｃａｒｄｉａ　ｐｕｒｉｓ］（配列番号４１２）

【化３２６】

AESISSEVARQASPLAVVARYRSELAGSLPAAVRHDVDRWLMVAEMAVRRSPDLMEIV
RRDQGASLMRALIECARLGHEPGSPEFYLIPRGGIVSGEESYRGIIKRILNSGEYQRVVAR
VVHERDRFSFDPRIDEIPDHRPAEGERGAPARAYAFAVRWDGTPSTVGEATPERIIAAKA
KARGVDRKDSPWNSPTGVMYRKTAIRELASYVHTSAEPRPRPAAPTEPPAVDEVSTVY
DAEVIDEVDVLDITAEPTA

ＴＣＰ１８１０１．１　ＲｅｃＴ　［Ｎｉｃｏｌｅｔｅｌｌａ　ｓｅｍｏｌｉｎａ］（配列番号４１３）

【化３２７】

LKNADPQSVFNAACMAATLNLPIQNGLGFAYIVPYQNKKEKKTEAQFQLGYKGLIQLA
QRSGQFKRLVAVPVYEKQLIAEDPINGFEFDWKQKPENGEKPIGYYAYFKLLNDFTAEL
YMTTHEVDEHAQRYSQTYRTYLDKKSKGQWASSVWADNFEAMALKTVMKLLLSKQA
PLSVEMQQAVLADQAVVKNVETNEFSYVDNQIEEAEYTELKVSTDIFEKCKQSILNKET
TLQELCDSGYEFSQEQYAELEKLEVE

ＯＡＢ２７８４３．１リコンビナーゼ　［Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｍａｃｑｕａｒｉｅｎｓｉｓ　ｓｕｂｓｐ．　ｄｅｆｅｎｓｏｒ］（配列番号４１４）

【化３２８】

SDKLLVIHKNLENLLDSKREAMPSNFNKTRFLQNCMTVLQDTRDIDKCDATSVARTML
KGAFLGLDFFNKECYAITYAGAVQFQTDYKGEKKLAKKYSVRPVRDIYAKLVKEGDDF
KEEVKDGQQTIQFAPKPFNDGEVLGAFAVALFEDGGLVYEVMSKVDIETTRKNYSKQA
NGQAWTKSPGEMYKKTVLRRLCKNIELDFDTIEQAQAFEDSGDMDLNKEVKPPQVSPL
NATVIDAEYTEIREGDPNATNQE

ＷＰ＿０１９４１７３３０．１　ＲｅｃＴ　［Ａｎｏｘｙｂａｃｉｌｌｕｓ］（配列番号４１５）

【化３２９】

ATTQSLKNQIAKKQNSNIQQGVTLKQLLNSESMKKRFEEVLGKRAQQFATSILNLYNSE
KMLQKCEPMSIISSAMVAASLDLPVDKNLGYMYIVPYGTTATPIMGYRGYIQLALRTGQ
YKHINVIEVYEGELQKWDRLTEEFEMDSKQKKSDVVVGYAAYFELINGFRKTVYWTRE
QIEAHRKKYSKSDFGWKNDFDAMAKKTVLKSLLSKWGILSIEMQNAFNEDEKEVDTKE
VKDITSEVQEAEYIEAEAFEVPIETETPQQEEIVFDAQ

ＣＤＡ７１４６９．１ファージＲｅｃＴファミリー　［Ｒｕｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．　ＣＡＧ：５７９］（配列番号４１６）

【化３３０】

NERTNLQYAPAPVERFKECLNSHEIKARLKNSLKNNWTQFQTSMLDLYSGDAYLQKCD
PMAVALECVKAATLDLPISKSLGFAYVVPYNNVPTFTLGYKGLIQLAQRTGQYRTINAD
VVYEGEIRGADKLSGMVDLSGERTGDEVVGYFAYFKLINGFEKMIYMTRAEAEKWRD
DYSPSAKSKYSPWRTDFDKMALKTCIRRLISKYGIMSVEMQGVMTEEAEPRAAAAAKR
AEETVQANANSKVIDIDAAPPAANESPAEAAPQPDF

ＷＰ＿０１９１０８１２１．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｅｐｔｏｎｉｐｈｉｌｕｓ　ｓｅｎｅｇａｌｅｎｓｉｓ］（配列番号４１７）

【化３３１】

TNQIARKPVNEIKNVLSVPSVRNLFDNALADNAGAFVSSLIDLYGGDSYLQNCEPKDVV
MEALKAATLKLPINKNLGFGYVVPFKNKNGKLVPTFIIGYKGLIQLAMRTGQYKAINSGI
IYEGMEIKEDVLRGTLEIKGSKQSEKIKGYFAYFQLINGFEKALYMDVEEAADWGRKYS
KSFAKGPWTTEFDAQAQKTCLRRLLSKYGVLSTEMQRLEKTEEDVDIAVGTIENNAVEE
LNIPSSQADYIVDEETGEILDDEEIVAPF

ＡＦＨ２２５７６．１　ＲｅｃＴファミリータンパク質　［ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ　Ｈａｌｏｐｈａｇｅ　ｅＨＰ－３０］（配列番号４１８）

【化３３２】

TEQNQTPAKTESKSPIKAQLYKDNVQQRFQELLGERASAFMTSVMSVVKDNDQLSQAE
PSSVLNAAMTAATLDMPIDNNLGMAYIVPYKDGKSGKTYAQFQLGYKGFIQLAQRSGQ
FKTISATPVRQGQIVTADPLRGYEFDFTQGQDKEVVGYAAYFALLNGFEKTLYMSKAE
MEQHAASYAAGYKKGYSNWNRKFDEMALKTVIKQLLSKYAPLSVDMQKAQQTDQTV
SVEEPNAIEQQEAAPEIDASSNNNQNQ

ＷＰ＿１３８０６７９５７．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｓｅｕｄｏｐｏｒｃｉｎｕｓ］（配列番号４１９）

【化３３３】

ANQLTVVNTLQSDAVKEKFEAVMGEKANGFVSSVLSVVTNNNLLAKADFNSVYTSAM
KAAVLDLPVEPSLGMAYIVPYKGKAQFQIGYKGLIQLAQRSGKVTKLNSGKIYKGQFKS
YNALSEELDIDDIYTPKEDEEVVGYFGYMKLSNGFEKITYWTKERVEKHGKKYSQSYDS
KFSPWQTNFDAMAEKTVLKSILSTYAPLTIEMQNANDFDNGKNTGIEPLEVKDVTPEND
NESLLSDLLEDEPSVDAETGEIMENTELDLDYGSINAK

ＷＰ＿０７２９０４３４６．１　ＲｅｃＴ　［Ｈａｔｈｅｗａｙａ　ｐｒｏｔｅｏｌｙｔｉｃａ］（配列番号４２０）

【化３３４】

ADSKKELILKESYSVLDRLIETKISAMPKDFNRTRFLQNCMTVLQDTKDIEKCQPISVART
LLKGAFLGLDFFQKECYAIPYGGTLQFQTDYKGETKMAKKYSIRPIKDIYAKVVREDDL
FEEEIKEGQQFVNFKPIPFSDKPIIGAFAVVLYQDGGMEYETMSKTQIEGIRDNFSKMKN
GLMWTKTPEEAYKKTVLRRLTKKIEKDFDTIEQAKTYEETSDSEFKKEEKCNEKSVFDV
EYSEVESEELEQQTMLENSPFGGEQ

ＧＡＥ１７７３２．１　ＲｅｃＴ　［Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ　ＤＳＭ　２０６１１　＝　ＪＣＭ　６２９４］（配列番号４２１）

【化３３５】

QVADPQSVLNSAVIAATLDLPINPNLGFAAIVPYNDRKSGKCIAQFQLMYKGLVELCLRS
GQFASLIDEVVYEGQIVKKNKFTGEYIFDEDAKTSNKVIGYMAYFRLVNGFEKTFYMTS
EEVTAHAKAYSQSFKSGYGVWKDNFDIMARKTVLKLLLSKYAPKSIEMQRAITFDQAA
VKGDLTETNVDEAEIEYIDNESGSDKIKQAAEDAVIQSQQKTLL

ＣＤＦ０９４０６．１　［Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｓｐ．　ＣＡＧ：７６］（配列番号４２２）

【化３３６】

AERKQITTKEYLAEVKGGLENELNLNAKALPENFNQSRFVLNCISLIKSNLSNYNNITPES
VYLALAKGAYLGLDFFNGECYAIPYSGEVNFQTDYKGEIKLAKTYSRNPIKDIYAKNVR
DGDFFEEIIESGKQSVNFRPVPFSDKKIIGTFAVVLFKDGSMMYDTMSVKEIEEVRNNFS
KAKNSKAWAATPGEMYKKTVLRRLCKLIDLDFNSQQRLAYEDAGDFDKEKADEPVAD
DTVNVFDAEFKEVEPENKDAAIIEEMGLEEA

ＷＰ＿０９９２９９６５６．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｅｄｉｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｅｎｔｏｓａｃｅｕｓ］（配列番号４２３）

【化３３７】

MNDISKVPMKVLVQQDKVQRMLENTLKGKTRQFTTSLINVVNSNQSLADVDQMSVIKS
AMVAASLDLPIDQNLGFMWLVPYKGMATPQIGYKGYIQLALRTGQYKKLNTIVVHEGE
MKYWNPLTEDFEYDPKGKESDEVIGYLGYLRMINGFEKTVYWTKQNIEDHRMKFSKM
SGKAKPSGVWASNYDAMALKTVMRNLLSKWGIMSIEMQQAVVQDEKAPETDVRDVT
PTETNSIDSLLAPEPKGEPINDSNEATVPTNAE

ＷＰ＿１１８２２７０４７．１　ＲｅｃＴ　［Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｅｇｇｅｒｔｈｉｉ］（配列番号４２４）

【化３３８】

GTVTTVPQLKSMLANENVKSRFKEILGKKAPGFISSIVAVANSNTLLQKAEPQSIMNAAV
LAATLDLPINPNLGFAYIIPYGNQASFQIGYKGMTQLAMRSGQYKTINVTEVYEGEIKSEN
RFTGEYTFGERKSDKIVGYMAYFSLTNGFEKYMYMSREECEKHGKKFSQTYKRGGGL
WATDFDSMSKKTVLKMLISKYGILSIDMQRAQTFDQAVVKDDLVEKNIDEAEVSYEDN
PTNADVRRNAMKEALEEAEVVDETTGEIFNQPAQ

ＷＰ＿０９４７５４４９５．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｒｉｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｂｅｒｇｅｒｏｎｉｉ］（配列番号４２５）

【化３３９】

EVNNMNNQMQQTATQVTPINQMKNLLANKGINQMFEQALKMNAGAFISSLIDLYNSD
GYLQKCEPKDVAMEALKAATLNLPINKGLGFAYIVPYGKAPQFQIGYKGYIQLAMRTG
QYKHINAGAVYEGEEVKENRLAGTVEILGDKKNDNETGYFAYFKLTNGFEKCLYMSKQ
EMTTHAQRFSKAFKNGPWQSDFSAMATKTVLRLLLSKYGVLSTQMQEAIAKENDDELQ
QQINQNANKEVIDIEKIDNKNVIDIEAIDAADDDIEAPF

ＷＰ＿０４５５５３７２０．１　ＲｅｃＴ　［Ｌｉｓｔｅｒｉａ］（複数種）（配列番号４２６）

【化３４０】

ATNDELKNQLANKQNGGQVASAQSLDLKGLLEAPTMRKKFEKVLDKKAPQFLTSLLNL
YNGDDYLQKTDPMTVVTSAMVAATLDLPIDKNLGYAWIVPYKGRAQFQLGYKGYIQL
ALRSGQYKSINVIEVREGELLKWNRLTEEIELDLDNNTSEKVVGYCGYFQLINGFEKTVY
WTRKEIEAHKQKFSKSDFGWKKDYDAMAKKTVLRNMLSKWGILSIDMQTAVTEDEAE
PRERKDVTEDESIPDIIDAPITPSDTLEAGSEVQGSMI

ＷＰ＿１０６０２４５１８．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｔｈｅｒｍｏｐａｌｍａｒｉｕｍ］（配列番号４２７）

【化３４１】

ATVNELKNEIATKKETGVGSAGNTIKGLINSPAIKKRFEDVLNKKAPQYMSSIVNLVNGD
TNLKKCDQMSVIASCMVAATLDLPIDKNLGYAWIVPYGNRAQFQLGYKGYVQLALRT
GQYKAINVIEVHEGELIEWNPLTEELKIDFSQKKSDAIIGYAGYFELLNGFKKSTYWTKE
QIIRHKNKFSKSDFGWKKDFDAMAKKTVLRNMLSKWGILSIEMQNAYTADQATIRPEA
VETGDIKGNVDYVEADFEENYEGTPFEEVEEGGVNE

ＷＰ＿０７３０１０６５４．１　ＲｅｃＴ　［Ｖｉｒｇｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｃｈｉｇｕｅｎｓｉｓ］（配列番号４２８）

【化３４２】

ATNSSLKNQIANKGNGNQNTPQGYTVKQLMSASSVKNRFEETLGKKAPQFMASVINLV
NGDTNLQKCDQMSVVSSAMVAAALDLPIDKNLGYAWVVPYGNKATFQMGYKGYIQL
ALRTGQYKNINVIEVYEGEVKSFNRLTEEIELEFEGKESDKVIGYVGYFELINGFRKTVY
WSKDEIERHKKRFSKTGFAWKDNYDAMAKKTVIRNMLNKWGILSIDMQTAVTTDGNA
VTQDFEQEDSGLVIDAEFSEVNEASEGQQEIKFENADA

ＷＰ＿１１１９２１３０６．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｃｏｃｈｌｅａｒｉｕｍ］（配列番号４２９）

【化３４３】

ATNESLKNQLATKKETGIGSAGNTIKSLINSPVIKKRFEEVLDKRAPQYMSSIVNLVNSDT
NLKKCDQMSVIASCMVAATMDLPVIDKNLGYAWIVPYGNKAQFQMGYKGYVQLALRT
GQYKSINVIEVHEGELEEWNPLTEELKIDFSKKESDAVIGYAGYFELLNGFKKSTYWTKE
QITKHKNKFSKSDFGWKKDFDAMAKKTVLRNMLSKWGILSIEMQNAYTADHGVIKNEI
METGEVKENVEYIEADFESYEGTSIEEGGSNE

WP_019125538.1 RecT [Peptoniphilus grossensis]（配列番号４３０）

【化３４４】

TNIQKQENRALSPVNQMKNLLKNQGMQNLFADALKENKDRFLASIIDLYNGDTSLQDC
NPKEVVMEALKAATLNLPINKNLGYAYIVPYNSKGTTRPQFQIGYKGYIQMAQRSGQY
KALNAGILYEGMEVKRDFLRGTFEIIGEPKSDKVMGYFAYFQLLNGYEKAIYMTKDEVT
EHAERYSQSYGSKYSPWKKQFDEMGQKTVIKKLLSKYGVLTTEFQDAVKEEEDREVLR
ATENNAMLEMTNPDEEEETIEVNPETGEIIEDDVKAPF

ERL63827.1 YqaK [Schleiferilactobacillus shenzhenensis LY－７３]（配列番号４３１）

【化３４５】

SAVSESKDLQHVDQLSVLNSAMTAASLNLPINQNLGFFYLVPYKGIAQAQMGYKGYIQ
LAQRSGQYQRLNAIPVYADEFGSWNPLTEELDYTPHFEDRKASDKPVGYVGFFKLANG
FEKTVYWSRKQIEAIIRDRFSKSSKSSASPWNTDFDAMALKTVLRNLITKWGPMTTDIQR
ANDADEGDYKNDLSTDTSEPKDVTPGASLEQFLGETDQQQKPATKPAPKKKAEEAKPN
DLKPDVTIIDPNEIITEQTSLSDDDLPFD

WP_051267408.1 RecT [Gulosibacter molinativorax]（配列番号４３２）

【化３４６】

TDLTEKIATKAVAVKKDPKIADLMKSYEPQFARSLGKSMDAAKFGQDALTAIKQTPKLL
EADQRSLFGAIFLAAQLKLPVGGPLAQFHLTPRKVAGEMTVVPIIGYNGYIQLAMNTGL
YSKVGAFTVHANDHFRTGANSERGEFYDYERATGDRGELTGVIGYAKVKGFDESSFVY
LDAATVRERHRPKFWDKTPWASDEGEMFRKTAIRVLQKYLPKSIEAAPLALAAQADQA
TVRRVDGVDDLQIDHEDIAIAEVIEDD

WP_112330076.1 RecT [Cereibacter johrii]（配列番号４３３）

【化３４７】

TENTAQAPAAARQLTPIQAISQTLESDAFAPKISASLDGTGISPARFKRAALACLSRPEAS
YLVEKCDRGSIFTAVMNAAAAELELHPALGQAYIVPRGGQAVLQVGYKGFIALASRAG
LAVEADVIYAGDRFSIRKGTNPDVSVEPELDPAKRGEWVAVYVITHYASGAKTLTFMTR
AEVEAIRNRYSDAYKRGGAGAKTWNESPEEMAKKTCIRRASKLWPISVPGGGDDDGGE
VIEADPAPVPAPRMRDVTPGGGLDRLAASL

WP_063601171.1 RecT [Clostridium coskatii]（配列番号４３４）

【化３４８】

SDKKMVVLNESHTMLNKLLETKQEALPKDFNKARFLQNCMTVLQDTKGIEQCQPITVA
RTMLKGAFLGLDFFNKECYAIPYKDNLQFQTDYKGEIKLAKKYSFNPIKDIYAKIVRQG
DDFQEAIINGQQTINFTPVPFNNGEIIGAFAVCLFQDGSMLYETMAKQEIENTRKNFSKAP
NSPAWTKTPGEMYKKTVLRRLCKLIELDFDSVECKKVYNETSDFEFENQQHEVSNFDK
KDIDEDKIVEADVEVQDDNENNVPEDGE

WP_118206945.1 RecT [Bacteroides stercoris]（配列番号４３５）

【化３４９】

STITTIPQLKSMLANDNVKARFKEILGKKAPGFISSIVAVANSNTLLQKAEPQSIMNAAVV
AATLDLPINPNLGFAYVVPYGNQAQFQMGWRGFVQLAMRSGQYKTINVNEIYEGEIKK
SNRFTGEYEFGERASDKIVGYMAYFSLINGFEKFLYMSKEDCEKHGRKFSQTYKRGTGI
WSTDFDSMAKKTVLKMLLSKFGILSIEMQRAQTFDQAIIKDNLAETDIDEAEVSYNDNP
DNEEARRNAMKEALQEAEVVDENTGELFNTETK

WP_099840029.1 RecT [Clostridium combesii]（配列番号４３６）

【化３５０】

ANTKAIVLQETANNLNTLLKAKVKALPKGFNETRFLQNCMTVLQDTRNIEKCNSVSVA
RTMLKGAFLGLDFFSKECYAIPYNDYKTGKCHLEFQTDYKGERKLMKQYSVRPIKDIYA
KVVREGDKFEEHEKGIPTINFRPKPFSNEKHGVFAVVLFEDGGLLYETMSVEDVEKIKVG
FAKRDKEGNYSKAWTATPEEMYKKTVIRRLRKSVELEFDSVEQQKTYEEASEFDVKRD
EEVKEEASPFENVDFEEAEEGNTIEAKQE

ＷＰ＿０６９６８６５１２．１　ＲｅｃＴ　［Ｏｃｅａｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ．Ｅ９］（配列番号４３７）

【化３５１】

ATNDSLKNQLSSKQGNQNTPSGYTIKQLMGAESVKKRFEEMLDSKASQFMASVINLVN
GDTNLQKCDQMSVVSSAMVAATLDLPIDRNLGYAWVIPYGNQATFQLGYKGYIQLALR
SGQYRNINVIEVYEGELQSFNRLTEEIELDFEKRTSDKVIGYTGFFELINGFRKTVYWSKA
EIEKHKNKFSKSGFGWKNDWDAMAKKTVVRNMLNKWGILSIDMQKAYVEETKDPSEP
NGEVIDLNLTEDELTAAQEQFSDENANE

ＲＭＤ５０７４５．１　［Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ　Ｐａｒｃｕｂａｃｔｅｒｉａ細菌］（配列番号４３８）

【化３５２】

TEYKRPQQPEQTKMLSAKLNQAGAPNKVSSFDVQLRDWFKKHSRKMQTLAGSKEEAN
KIITSLIFVAQRNPKLMTCTMESIGECLMQSAQLKLYPGPLQECAYVPFGNRATFMPQYQ
GLCKLAYNSGVVRSIATEVVYANDLFEFELGTNAYLRHVPTLSDNRGERIAAWCVVKT
THGEVIIVKPISFIEGIRKRSPAGNKKDSPWNTSDDDYDAMARKTVLKQALKTIPKSSDL
AAAIQVDNAVESGSVDNVVTHIEPVTDPTPEETKE

ＷＰ＿０６１４１３９５８．１　ＲｅｃＴ　［Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．　ＤＤ０１］（配列番号４３９）

【化３５３】

ANLTPTQTVLKSDAAKRKFEEVLGKKTNGFVGSLLSLVGSTNLKNVDSNSVMTAAMK
AATLDLPIEPSLGFAYVIPYGREAQFQIGYKGLIQLAIRSGQVTKLNAGPVYENQFIKYDS
LFEELEIDFSMPQGVEIAGYFASMELANGFRKIIYWDKEKVTAHGKRFSKSFNRSSSPWQ
TDFDAMATKTVLKAMLSTYAPLSTEMQQAIVADNESATPKDATPVTDDLVLEAVEDSK
QIEENEIINDQVASENYQEPQGEPEVLDLEL

ＷＰ＿１４７１２９６２８．１　ＲｅｃＴ　［Ｎｏｃａｒｄｉａ　ｎｉｎａｅ］（配列番号４４０）

【化３５４】

AESISKEVARQANPLAVVAKYQNELGKSMPAAIRGDVGRWMMVAEMAVRKNPKLLSI
VQADQGASLMRALIECARLGHEPGTKYFYLVPRGNQISGEEGYHGIIKRVLNSGHYQKV
LARTVFERDEYSFDPLTDQLPTHVPASGERGKPVSAYAFALHWDGTPSTVAEASPERIA
AAKAKSYGTDRKDSPWQSVTGVMYRKTAIRELEPYVHTSAEPQPRQDNAGSRGAVMD
PSTYDDAEPLDADVLDITADQIAEHDGEGAL

ＷＰ＿０７４８４６７４０．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｃａｄａｖｅｒｉｓ］（配列番号４４１）

【化３５５】

ATNSSLKNQLSKKENVTIGNTMQGLLNNPKMKKRFEEILDKKAPQYMSSILNLYNGDTS
LQKCEPMSVLSSSMIAATMDLPVDKNLGYAWIVPYKNKAQFQMGYKGYIQLALRTGQ
YKHINAIEIHEGELVNWNPLTEELEIDFTKKESDKIIGYAGYFELLNGFKKSTYWTKTQIE
NHRKKFSKSDYGWNKDFDAMAIKTVIRNMLSKWGILSIEMQNAYTADENIIKDSFIDDS
ENVSANIEDLVEADYTVNQDSLESKEEFEGTPLE

ＷＰ＿０３８２４６２１９．１　ＲｅｃＴ　［Ｖｉｒｇｉｂａｃｉｌｌｕｓ］（複数種）

（配列番号４４２）
【化３５６】
ATNDSVKNQIANKNQGSNQVNPNNLGLKQLLSTPTMRKKFDEVLDKKAPQFMSSLLNL
YSNDSYLQKAEPMSVVTSALVAATLDLPIDKNLGYAWIVPYGGKAQFQLGYKGYIQLA
LRTGQYRNINVIEVYEGELKSFNRLTEEMELDFEQKQSDKVIGYTGYFELINGFRKTVY
WSKEEIEKHKKRFSKSDFGWKKDWDAMAKKTVIRNMLNKWGILSIDMQKGIVEDNKD
PIEKANEFDEQDIIEADFSEVNDDQEIDFSDAQ

ＷＰ＿１０６０６４２８４．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｌｉｑｕｏｒｉｓ］（配列番号４４３）
【化３５７】
TTASELKNQLATRKETGVGSAGNTVKGLLESPAIKKRFEEVLKQRAPQYMSSIVNLVNG
DANLKKCDQMSVIASCMVAATLDLPVDKNLGYAWVVPYGNKAQFQLGYKGYVQLAL
RTGQYKSINVIEIHEGELIEWNPLTEELRIDFEKKKSDAIIGYAGYFELINGFRKSTYWTKE
QITKHKNKFSKSDFGWKKDFDAMAKKTVLRNMLSKWGILSIEMQNAYTADQETIKSEV
LETGNIKENVEYVEADFDVDFEGTPFEEGVTNE

ＷＰ＿０２８５６２２８０．１　ＲｅｃＴ　［Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｉｎｉｈｕｍｉ］（配列番号４４４）
【化３５８】
ADANKLLVINEKLIKLIESKQDAMPKSFNKTRFIQNCMAVLQDTDEIDKCDATSVARTLL
KGAFLGLDFMNKECYPIIYGGKCTFQTDYKGEIKLAQKYSVRPVLNIYAELVREGDFFL
KEVKDGQRTIQHKPPEGFNDGKVIGAFAIVLYKDGGMDCESMSVAEIETTRKNYSKQA
NGPSWTKSPGEMQKKTVLRRLCKTIQLDFDTIEAKEAFEDGGDFDFKQDPKPQQQSPFD
KNATVVDAEYEEVEEEDQSESAT

ＷＰ＿０６８６７２３０６．１　ＲｅｃＴ　［Ｏｃｅａｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ．Ｃａｓｔｅｌｓａｒｄｏ］（配列番号４４５）
【化３５９】
ATNSTLKNQISNKKQGNNQVGKTQGTTMKQLLASPAVMNRFEEVLGKRANQFTASILG
LYNSEKMLQKAEPMSVISSAMIAATLDLPVDKNLGYAWIVPYGGKAQFQMGYKGYIQL
ALRTGQYRNINVIEVYEGELKKWDRLTEEIELDFESRTSDKVIGYTGYFELINGFRKTVY
WSKEDVEKHKKRFSKSDFGWKNDWDAMARKTVIRNMLNKWGILSIDMQKGMVEDSK
DPVEVNEEFSSDVIDADYEVVGENEQQDFTVEENA

ＷＰ＿０６７５９２７９２．１　ＲｅｃＴ　［Ｎｏｃａｒｄｉａ　ｔｅｒｐｅｎｉｃａ］（配列番号４４６）
【化３６０】
SSIAAAAESAEVTPASIINKYRDDIATVLPPKLRERIDRWIRLAIGAVNSNPELISRVRADQ
GASMMQALMKCAALGHEPGSGLFHLVPKGSRIEGWEDYKGILQRIDRSGVYARTVIGV
VYANDEYSYDQNVDERPRHVRATGDRGEPISSYAYAVYPSGAITTVAEATPEQIASSKS
KARGADNAASPWRAPGAPMHRKVAVRLLEKHVATSAEDRREPISRSAANDVVIDATA
DYYQEP

ＷＰ＿０７９７０８１１３．１　ＲｅｃＴ　［Ｐａｒａｌｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｙｕｋｙｕｅｎｓｉｓ］（配列番号４４７）
【化３６１】
ATNDTLKNQISNKKNNQVAEGKQGTTMKGLLNSPAVMKRFEEVLGKRANQFTASILSL
YNNEKTLQKSEPMSVISSAMIAATLDLPIDKNLGYAWIVPYGNKAQFQLGYKGYIQLAL
RTGQYRNINVIEVYEGELVKWNRLTEELELDFEQKKSDKVIGYTGYFELINGFRKTVYW
SKADIEKHKQKFSKSNFGWSNDWDAMAKKTVIRNMLNKWGILSIDMQKAYSTDEIEQE
QESNDFIDGEWAEVSEDDITEAMNEV

50

ＯＬＡ２０４６２．１　ＢＨＷ１７＿０９１１５　［Ｄｏｒｅａ　ｓｐ．　４２＿８］（配列番号４４８）

【化３６２】

AVNNSLAKRDQSMKLSVYLQNDAVKKQINQVVGGKNGTRFISSIVSAVQSTPALQECTS
PSIVNAALLGEALNLSPSPQLGQFYMVPFDNRKKGCKEAQFQLGYKGYIQLAERSGYYK
KLNVLAIKEGELIRYDPLDEEIEVELIDDDVIREETPAMGYYAMFEYENGFCIQQKWRSE
DFGTFRAGQNSGKGSLEVFFFLVQRF

ＷＰ＿０５８９０６８０５．１　ＲｅｃＴ　［Ｌａｃｔｉｐｌａｎｔｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｌａｎｔａｒｕｍ］（配列番号４４９）

【化３６３】

SNELAHMPMKQLVKQDAIQQMLSRTLADKASQFSTSLINLVNGNQSLAKVDQMSVIQS
AMVAATLNLPIDQNLGYMWLVPYKGRATPQIGYKGYIQLAQRTGQYLAMNAIAIHSGE
LKGWNPLTEDFQFDPMGRTSDEVIGYVGYFKLTNGFEKTVFWTKASMEEHRMSFSKMS
GGKTPQGVWASNYDAMAIKTVLRNMLSKWGPMSIEMEQALANDETAPQTPLNVEAEE
SASETTDNMLDKFRQQQGEVNTSDQEHNTEDQGDPRDQS

ＲＺＴ６６７７４．１　ＲｅｃＴ　［Ｌｅｕｃｏｂａｃｔｅｒ　ｌｕｔｉ］（配列番号４５０）

【化３６４】

SDLSQAAVAVKKSKTVEDYLTEYEPQFQRALGKSMDAAKFSQDALTAIKQTPQLGQAD
LQTLFGSLFLAAQLKLPVGGPLAQFHLTPRKRGDKLEVLPIIGFGGYVQLIMNTGLYSKV
GAFLIYEKDYFDEGANSERGEFYDFKKSRGDRGPVVGVIAYVKLKGFDESQYVFLDAD
TIRSRHRPRYWEKTPWGSDEGEMFKKTGVRVLQKLLPKSVEAAPLALAADADQATVR
KVDGIEDLTIQHDVVDAEVVPDGVPV

ＷＰ＿０８７９１６０４１．１　ＲｅｃＴ　［Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｄｏｎｇｈａｅｎｓｉｓ］（配列番号４５１）

【化３６５】

SNTQLATIHNNLERLIDSKRDAMPSSFNKTRFLQNCMTVLQDTYGIEKADPVSIARTMLK
GAFLGLDFFNKECYAIIYGGKVEFMTDYKGEVKLAKKYSIKRIKDIYAKVVRAGDEFEE
TIEGGNQSINFKPLPFNDGEVLGAFAVVVYEDGSMNYDTMSVKEIESIKENFSKKSKDTG
QFSKAWVVTTSEMYRKTVLRRLCKNIELDFDTIEAKQAFEDGGDFEFNKDKKPAQESPL
NPKSTVIDGEFTAVGEGAADGTE

ＷＰ＿００９４１１４８０．１　ＲｅｃＴ　［Ｃａｐｎｏｃｙｔｏｐｈａｇａ　ｓｐ．　ｏｒａｌ　ｔａｘｏｎ　３２４］（配列番号４５２）

【化３６６】

ETQVLQKQSLANFLNKSDKFLEQNLGAKKSEFVSNLLALSDSNKELSQCEPADLMKCA
MNATALNLPLNKNLGYAYVIPYFDGKTNRTIPQFQMGYKGFVQLAIRSGQYKTINTCEI
REGEIKRNKVTGHIDFLGENPSGAVIGYLAYIELLNGFQQSLFMTIEEVQAHARKYSKIY
AKTNRGLWKDEFDLMAKKTVLKLLLNRYGVLSVEMQKAIEKDQADNEGNYIDNPQGR
YIQDAEVIEQNEPTENAQPVQPVTSEEPNKVDFKDV

ＷＰ＿１１６２３２８０２．１　ＲｅｃＴ　［Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ．　ＶＭＦＮ－Ｄ１］（配列番号４５３）

【化３６７】

AKALLENKLQERAAGASTPSTQGTSLKALLNSPAIKKRFDELLDKRSAQYMTSIVNLYN
SDAMLQKAEPMSVISSCIVAATLDLPVDKNLGYAWIVPYSGKAQFQLGYKGYIQLALRT
GQYKAINVIEVYEGELVKWNPLTEALELDFEKRKSDAVIGYAGYFELINGFRKSVYWTR
EQIESHRKKFSKSDFGWKKDYDAMAKKTHRNMLSKWGILSIEMQDAYSKEIEAIPPLNN
ENEEDPPIDLTPEDYRVGDEPQDGKEQGEMNFE

ＷＰ＿１２３８４９１５８．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｈｉｔｉｎｏｐｈａｇａ　ｌｕｔｅａ］（配列番号４５４）

【化３６８】

SNVNAPAAPVKSKIEVLKDIMNAPSVQEQFQNALRENSGVFVASVIDLFNSDTYLQNCE
PKQVVMECLKAATLKLPINKNLGFAYVVPYKSNGKQIPQFQIGYKGYIQLAMRTGQYRI
INADKVYEGEYRTKNKLTGEFDLSGTATSETVVGYFAHIEMLNGFAKTLYMTKEKVAA
HAKKYSKSFGKETSPWHTEFDAMALKTVLRNLLSHYGYLSVEMMGAMNADIESDQVG
SEVSQTINDKANKQEMTFDDAEVVDDDEKEQNPI

ＷＰ＿０７８４１０２６０．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｒｉｅｓｔｉａ　ａｂｙｓｓａｌｉｓ］（配列番号４５５）

【化３６９】

ATNQSLKNQLQSRQSAGTPAQQSNSLKALLSSPTVKKRFEEVLDKRSAQFMTSIVNLYN
SEKMLQKCEPMSVISSAMVAATLDLPVDKNLGYAWIVPYKNTASFQLGYKGYIQLALR
TSQYRFINVTPVHEGELMKWNPLTEEIEIDFDARQSDVIIGYAAYFELLNGFRKTVYWTK
NQVEKHRKKFAKSDFGWKNDYDAMAMKTVLKAMLSKWGILSIEMQKAYSEDEEPREL
KDITEEAQEVDYIEAEVIDVPAEEKASAFDQENFHIE

ＡＡＴ９００２８．１ファージ組換えタンパク質　［Ｌｅｉｆｓｏｎｉａ　ｘｙｌｉ　ｓｕｂｓｐ．　ｘｙｌｉ　ｓｔｒ．　ＣＴＣＢ０７］（配列番号４５６）

【化３７０】

AVKKNPTIEDYLIKYEPEFQRALGASMDAAKFAQDALTAIKQNPKIGHSDPRSLFGALFL
AAQLKLPVGGPLAQFHLTTRTVKGNLTVVPIVGYGGYVQLIMNTGLYSRVSAFLIHAGD
YFVTGANSERGEFYDFRRADSDRGEVKGVIAYAKVKGHNESSWVYIDAETMRAKIRP
KYWESTPWADDAGEMFKKTGIRVLQKYLPKSVESLNVALAASADQAIVRKVDGVPDL
DIQHDRDTETVAVPEQPVSVPQPGDET

ＷＰ＿０８００２２４５５．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｔｈｅｒｍｏｂｕｔｙｒｉｃｕｍ］（配列番号４５７）

【化３７１】

QSTGDIVFPQNYNYSSNALKSAQLILAETVDRNKVPVLQSCSKPSICNALLDMVIQGLSPA
KKQCYFVPYGGKLQLMKSYLGNIAATKRLKGVKDVFANVIYEGDVFEYKLNLNTGLIEI
EKHEQKFENISKKILGAYAVVVRENQNNYVEVMNIEQIKNAWNQGAAKGNSQAHKNF
AEEMAKKTVINRACKRFVNTSDDSDTLIESINRTNEYKEEDIIETTKSEVGEEIKENANTE
NLGLEDTEVVEAEVIENIEFEGDK

ＷＰ＿０８１７５９６３９．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｊｅｄｄａｈｅｎｓｅ］（配列番号４５８）

【化３７２】

LGERTPQFISSIVSLVNADANLQRAFYDAPVTVIQSALKVATFNLPIDPNLGYAYIVPFNN
TVKNPDGSIRKRIEASFIMGYKGMNQLALRTGVYKTINVVDVREGELKSYNRLTEDIEL
DFVEDDEEREKLPIIGWVGYYRLINGTEKTIYMTRKQIETHEKKNHKGQYMGKGWRED
FDSMAMETVFRRLIGKWCLMSIDYQRANPGTLAAADALAHGQFDDEDPLPDAVPLQAE
AQEVNPETGEVQS

ＷＰ＿０８９２８１２９９．１　ＲｅｃＴ　［Ａｎａｅｒｏｖｉｒｇｕｌａ　ｍｕｌｔｉｖｏｒａｎｓ］（配列番号４５９）

【化３７３】

DAKHLTVVHQNLNTLLKAKADALPKGFNQTRFLQNCMTVLQDTKDIESVEPKSVARTM
LKGAFLGLDFFNKECYAIVYNKKAGNSWIKTLEFQTDYKGEIKLAKKYSINTIKDIYAKL
VREGDEFEEGVKDGKQVINFKPKPFNNNKILGAFAVAYYENGSMIYDTMSVEEIESVKK
AYAKADKEGKYSKAWIESTGEMYKKTVLRRLCKLIELDFDTIEQKQAFDEGSGMEFKQ
EGKTDKPKSSLEAEFVEAEYEEVEESETSEVVEE

ＲＤＩ６５７０６．１ファージＲｅｃＴファミリーリコンビナーゼ［Ｎｏｃａｒｄｉａ ｐｓｅｕｄｏｂｒａｓｉｌｉｅｎｓｉｓ］（配列番号４６０）

【化３７４】

SSIANAANASELTPASIVNRYRDDIAAVLPPKLQARIDRWLRLAIGAVNSNADLVDRVR
ADQGASMMQTLMKCAALGHEPGSGLFHLVPKGPRIEGWEDYKGVLQRIDRSGVYARV
VVEVVIIANDDYAYDPNLDDRPQIIKRAAADRGEPVSAYAYAVYPNGAVTAVAEATPE
LIAASKAKARGADNASSPWRAPGAPMHRKVAIRQLEKFVATSAEDMREVAVRNAAPD
VEDAPADYYQEP

ＷＰ＿０７６１７０６１０．１ ＲｅｃＴ［Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｈｉｚｏｓｐｈａｅｒａｅ］（配列番号４６１）

【化３７５】

SSKLVEINSKLDSFLDAQHKAMPKGFNKTRFLQNSMSVLRDIEGLEQCDPKSVALVMLK
GAFLGLDFFNKECYPVVYAGKVEFQTDYKGEVKLVKKYSTKPVREIYAKLVRQGDDFS
EEIVAGSQTINFKPLPFNNGEIVGAFAVVNYVDGTMQYDTMSTEEIEKIKVNFSRKSKKT
NEYSKAWVVTPGEMYKKTVLRRLCKTIDLDFDTIEQAQAFEDAADMDFNQDSKPQQQS
PLNPMVIDVEYEEVKEEQADAAEQE

ＷＰ＿１０６８３３６１７．１ ＲｅｃＴ［Ｂｒｅｖｉｂａｃｉｌｌｕｓ ｐｏｒｔｅｒｉ］（配列番号４６２）

【化３７６】

ADQNKLVVIYNNLEKLLDSKREAMPTSFNKTRFLQNCMTVLQETKDIELCNPTTVART
MLKGAFLGLDFFNKECYAVVYKGSVEFQTDYKGEVKLAKKYSTKPVREVYAKLVREG
DEFAEEINSGNQTINFRPKPFNNEEILGAFAVVNYMDGTMAYDIMSKEEIEKIKENFSRKS
KQTGEYSKAWVVTPGEMYKKTVLRRLCKNIDLDFDTIEQRQAFEDAGDVDFNQEVKPA
QQSPLNSTVIEAEFEEVSEEQTNAAEQE

ＲＤＥ１９３４３．１ ＲｅｃＴ［Ｐａｒａｇｅｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｔｈｅｒｍｏｇｌｕｃｏｓｉｄａｓｉｕｓ］（配列番号４６３）

【化３７７】

AKQADLKNKLANKNSTNPTAYLKNLVYAPTVQQKFKEVLKEKAAHFLTSLISLVDSSPD
LQKCNPMTIIASAMKAATLELPIDKNLGYAWIVPYKNVATFQIGYKGYIQLALRTGLYR
SINVIEVYEGELRKWNRLTEELDIDEGARKSDHVIGYAGYFELTNGFIKRVYWSKEDIER
HRKKFAKSDFGWENNYDAMAKKTVLRNMLSKWGILSIDMQRAYVNDIDDPEQTKEVI
DVEWSEIIEEANVANSPEQQEIVTEQ

ＷＰ＿１３８６００９０１．１ ＲｅｃＴ［Ｐｓｅｕｄｏａｌｔｅｒｏｍｏｎａｓ］（ｍｕｌｔｉｓｐｅｃｉｅｓ）（配列番号４６４）

【化３７８】

SLSLQEYQNLLYGKLTACKGQFDACLSENGYKLDFNTELNYVYQIVMSGLNVEYSFPYT
PVESVITSFLKAAKIGLSLCPTEQLCFLKTEYSESSGQYVTQLGLGYKGILKLAYRSGKV
KQINANVFYEKDNFQYNGVNSKVTHTITVLSKAMRGQLAGGYCQTELIDGSFKTTVMP
PEEILAIEEQGKAMGNEAWLSVHVDQMREKTLIKRHWKTLCPCIYRDSVMNDPMLFDD
QDCQHSSNQQAYEEQFESAYSREAY

ＷＰ＿０８２２０９６００．１ ＲｅｃＴ［Ｐｅｐｔｏｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃａｃｅａｅ細菌 ＶＡ２］（配列番号４６５）

【化３７９】
QPFLVQRYPHLDVVLNDQVHVLKSFFFQNHIILYLYKYIECLQIFHKPLLKGDRGKVIGY
YAVYHLEPNGYNFVFMTYDEVKNHGKKYSKNFEGGIWEKEFDSMAKKTVIKKLLKYA
PLSIEMQKAVTFDESVKGSIDNDMLLVESIEDVEEIQLDTNI

ＷＰ＿０２６６２７３０３．１　ＲｅｃＴ　［Ｄｙｓｇｏｎｏｍｏｎａｓ　ｃａｐｎｏｃｙｔｏｐｈａｇｏｉｄｅｓ］（配列番号４６６）
【化３８０】
STQQVQQQTKPLSLANFLNAPSTANFLKETLAEKKSEFVSNLIALCDADPKLAQCDPAQ
LMKCAMNATSLNLPLNKNLGYAYVIAYKGVPSFQIGYKGLIQLAIRTGQYKFINATEIRE
GEIRHNKITGEVIFNGEKPDAPIVGYMSYLELVNGFTASLYMTEEQIEQHALRFSQTYKN
DKQYRSSTSKWSDPLARPTMCKKTVLKLLLGTYGLMTTEFAKALDSDSDDEVSTSGHR
FEEAEIVQQGEPNEEQSDEPKRMEI

ＷＰ＿１０９５２３７３３．１　ＲｅｃＴ　［Ｎｏｃａｒｄｉａ　ａｕｒｅａ］（配列番号４６７）
【化３８１】
SESISAAADAQKVTPRIVLDRHRDAFAQVLPPTINLDRWLRLAESAINASAGLLDIFRRD
RGASALKALMKCAQLGHEPGSGLFHLVPKGQAIEGWEDYKGILQRILRSALYAKVVVA
PVYANDEYAFDVNVDERPRHKQAAGDRGEPVRAYAYAVHRDGSTSTIAEATPAMIAG
AKAKGHKTDASTSPWQNPRAPMHQKVAVRELERFVSTSAVDLRVTGDVTDLIIEEP

ＧＡＥ０９５８５．１　［Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ．　ＪＣＭ　１０９１４］（配列番号４６８）
【化３８２】
TMDYVTKIQDALDRELDAKHDALPSGFKKTRFSENCRAYVKDYKDLQKYDAEEVASV
LFKGAVLGLDFLAKECHVITEGSALRFQTDYKGEMTLVKKYSVRPILDIYAKNVREGDD
FREEISGGKPLIHFNPRAFNNSKITGSFAVALFTDGGMVYETMPAEEIESIREHYGKNPGS
DTWEKSQGEMYKRTVLRRLCKTIEIDFDAEQSLAYEAGSSFEFDREQQPKKRSPFNPPEV
EESEVLSNDGITETQ

ＲＲＧ０８８３３．１　ＲｅｃＴ　［Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ．］（配列番号４６９）
【化３８３】
NSLSGALNSRNQAGSPTSMIKNLMRSDSIKNRFDEVMGAKAPQFMASITNLVNSNQDLQ
HVDAMSVVASAMVAATLDLPIDPNLGYMYIVPYRGQAQPQMGYKGYIQLALRTGQYK
HINALPVYDDEVKSWNPLTEELEYESSGTSHDNQTPAGYVGYFQLINGFEKTTYWTYDQ
INSHRQKFSKMSSKTDPTGVWKSNFDAMALKTVLRNLISKWGIMSIEMQQAFVKDERP
QEFDHETGEIQDVQEVEAEEENVAPETQGSTDKKEE

ＧＥＡ３０８４９．１　ＣＤＩＯＬ＿１７７２０　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｄｉｏｌｉｓ］（配列番号４７０）
【化３８４】
ATNSSLKNQLIEKEQSTVNVQETIFKNLINSDEIKSKFTEVLKDKAFEYINSIINLVKEIPVP
NALGASDSHQSADLGSLLIECEPRSIIDACMIAASLDLSIDKNLEYVWIIPYKKKSNFQLG
YKGYIQLLLRTGEYKAINVIEVYEGQLKSWNPLTEEFDIDVSAKKSDAVIGYAGYFEMV
NGFRKYVVYWSKDNMDAFRNNSFKGDPRWNNDYKAMAKRTVMRNMLSKWGRLSAE
MQRAYLEDINTDKFINGN

ＷＰ＿０７７８６７２１３．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｓａｃｃｈａｒｏｂｕｔｙｌｉｃｕｍ］（配列番号４７１）

【化３８５】

ATNSSLKNQLIEKEQTTVNVQETMFKNLINSDDVKSKFTEVLKDKAIQYINSIINLVNSDK
DLIECEPKSIIDACMSAVSLDLSVDKNLEYVEIIPYKKKANFQLGYRGYIQLLLRTGEYKS
VNIIEVYEGQLKSWNQLAEEFDIDFTYKKSDAVIGYAGYFEMLNGFRKSVYWSKENMD
ALRENSFKSDTRWNNDYKAMAKRAVIRNMISKWGSLSIEMEKAYCEDLNTDKFVNGN

ＷＰ＿１３２３０５２１６．１　ＲｅｃＴ　［Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ．　ＢＫ０３３］（配列番号４７２）

【化３８６】

AANTQLITIHNNLEKLIEAKKDAMPQGFNKTRFIQNCMTVLQDTYGIEKCEPTTVARTLL
KGAFLGLDFFNKECYAIPYGASMNFQTDYKGERKLAKKYSVRKVKDIYAKLVRAGDVF
EENITDGQQTIQFAPVPFNNGDIVGAFAVVLFIIDGGMLYETMSIAEMEIIIKENYSKKSK
DTGKFSKAWEVSTGEMYKKTVLRRLCKNIELDFDTIEQARAFEDAADVDFNKKTAPQQ
TSPLNVVEAEYEVVNDGSATEAQSE

ＲＰＩ７８７９４．１　ＥＨＭ４５＿０５２４５　［Ｄｅｓｕｌｆｏｂａｃｔｅｒａｃｅａｅ細菌］（配列番号４７３）

【化３８７】

ATPNTPTTTDAGDFLKKSEKSLKNYAVRKYDFTSFLKSAMIAINDNTTLSECLRTEAGK
KSLFNAMRYAATTGLSLNPQEGKAALIGYKNKAGEMVLNYQIMKNGLIDLALSSGKVE
FVTADLVRANDEFSIKKSASGDDYSFSPAIRDRGEVIGFVAALKLKGSATYVKWMSTEE
VAEFRDKYSSMYKNRPDASPWTHSFNGMGIKTVMKALLRSVSISPDVDAAVKSDDYIE
AEFTVHGTTADDAVTQLQTPSKPVKAEEGQGELL

ＷＰ＿０５１６２４０４７．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ａｋａｇｉｉ］（配列番号４７４）

【化３８８】

ATSESLKNQLVNKETRPPKDPFKALVYSAGIKKRFEDMLDKQANGFITSLLNLKQDKLK
SCDDFTVLGSALKAAALKLPIDPNLGFAWIIPFKNHGKLEAQFQIGYKGFIQMAQRSGQY
KKLNVTEIYEGQLKSFNPLTEEIVLDLDNIKSDLRKINKRYLIVMRMNLLALHLRKISKG

ＷＰ＿０８１７３５３２５．１　ＲｅｃＴ　［Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｇｏｒｉｌｌａｅ］（配列番号４７５）

【化３８９】

LEAKHDALPSGFNAVRFVQNCKAYLPEVRNFERFNPDEIALQFLKGAILGLDFLAKECH
VITEGSAARFQTDYKGEMKLAMKHSVRPLLNIYAKNVREGDVFRESVVEGRPVVSFDP
LPFNNSKIIGSFAVAQFNDGGMDYESMSSTEIESIRTHYGKNPGSDTWEKSQGEMYKRT
ALRRLCKTIEIDFDAEQRLAFDAGSSFEFNREPRPQQQSPLNLESEVLTDEVEQG

ＷＰ＿０８４５０５０５７．１　ＲｅｃＴ　［Ａｃｅｔｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｄｅｈａｌｏｇｅｎａｎｓ］（配列番号４７６）

【化３９０】

CLRSWTRSFSNSVPLKIRFRLLYTAFLSQGSPLSSVNTTQSADKGSPIFFYAMFKTKDGG
YGFEVMSVEDVRAHAKKYSQSFSSAYSPWSKNFEEMAKKTVLKKALKYAPLKSDFVR
GIVVDETIKREISEDMYAAPSIEIEYEVDEDGVIQDEPTSNELTEAEK

ＡＧＦ９３１３４．１　ＲｅｃＴタンパク質　［非培養生物］（配列番号４７７）

【化３９１】
SNELQNIKPEVFGEVEDKLGSLADNNGIDLPENYSARNALKQAYLKLQSKDEPVFDKYK
DETIYNALLDTLTQGLNPGKDQVYYIGYGNHLTAQKSYFGNIALAKRMAGVQEVSSNVI
LEGDEVDISIERGQQVIESHDRNFDSMDGQVKGAYAVISFEDERKDKYEIMTLKELKQA
WAQGKSFGGNGKSPHHKFTKEMAKKTVINRALKPLIKASDDSGLIKEKPKLEKLKDGQ
QERTEGEKIEEVDVDKEEVVEVDYDV

ＷＰ＿０７６０７９８４９．１　ＲｅｃＴ　［Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ．　ＦＳＬ　Ｒ７－０３３３］（配列番号４７８）

【化３９２】
TVAIELQVQETLDRILDSKHDALPSDFNKKRFSENCKAYVADEKDLHKYSPEEIAANLFK
GAVLGLDFLAKECHLISGGVELKFQTDYKGEMKLTKKYSVRPLLDVYAKNVREGDEFR
EEVIEGRPVIHFAPLPFNASSIIGSFAVALFQDGGMVYESIPAGEIEEIRKNYGKSLGDAW
DKSQGEMYKRTVLRRLCKTIETDFDAEQRLIYDAGGAFEFTKQPARSRQQSPFNPPEESE
VTQDDRVAETDQG

ＷＰ＿１１９８００３４６．１　ＲｅｃＴ　［Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐ．　１０１１ＭＡＲ３Ｃ５］（配列番号４７９）

【化３９３】
ATEQIISSLEALLEAKHDALPSGFNPTRFVQNCIAYLPEIRNWDRFNAEDLAIQFFKGAVL
GLDFLAKECHIIAEGSGVRFQTDYKGEMKLAMKHSVRPLLTIYAKNVREGICIEEAVIE
GRPVINFNPLPFNNSSISGSFAVAQYTDGGMVYETMSAEEIEAVRTNYGKNPGSDTWDK
SKGEMYKRTVLRRLCKTIEIDFDAEQRLAFEAGSEFDFSKQPRPQQRSPFEEKEVGPDEV
EQG

ＷＰ＿０２５７０６２３３．１　ＲｅｃＴ　［Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｇｒａｍｉｎｉｓ］（配列番号４８０）

【化３９４】
TVAIETQVQETLDRILDSKHDALPSDFKKKRFSENCKVYVAEEKDLHKYTIDDIVANLFK
GAVLGLDFLAKECHLITGGVDLKFQTDYKGEMKLTKKYSVRPMLDVYAKNVREGDIFR
EQIIEGRPAIHFDPLPFNASKIIGSFAIALFQDGGMVYESIPAGEIEEIRKNYGKSLGDAWE
KSQGEMYKRTVLRRLCKTIETDFDAEQRLIYEMGGAFEFTKQPTRSRQQSPFNPPEESEV
IQNDRAAETDQG

ＯＩＯ７６３７４．１　ＡＵＪ８８＿０６８６５　［Ｇａｌｌｉｏｎｅｌｌａｃｅａｅ細菌ＣＧ１＿０２＿５６＿９９７］（配列番号４８１）

【化３９５】
GRKEVERIRDGSRGYQAAKKYKKESTWDTDFVAMGLKTAIRRICKFLPKSPELATALA
MDEQAGRQNLNLDDVINGSYTPVVDKDTGEIVDVADGGKTGNSNAATSTKLEKLEKIV
AALRDANSVEALDEIYIRAEGDLDDANLEIAMREYRKCKDAISNSLI

ＷＰ＿１３１５３５５３６．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｅｄｏｂａｃｔｅｒ　ｎｏｔｏｔｈｅｎｉａｅ］（配列番号４８２）

【化３９６】
STEQSQQQTAARVPAKFQEGTVDSILKRVSDFQNTGELVLPANYIPENAVRAAWLMLM
ETTDRNDKPAIEVCTKESIANAFLEMVTKGLSVVKKQCYFVVYGNKLSLEDSYIGKIAIA
KREAGVKEVNAVTIYEGDIFKYENDIETGRKRILEHKQELKNINPDKIVGA

ＷＰ＿０２８１１３３５２．１　ＲｅｃＴ　［Ｆｅｒｒｉｍｏｎａｓ　ｋｙｏｎａｎｅｎｓｉｓ］（配列番号４８３）

【化３９７】

NQMINEPDFVTALKDSRETYIDLTQNGGFNLNYGLEAGWAHQQIEASRYQNLDLTCSEP
GSIMQAFCEAARLGLSFDPRKKHIYLMGQKDVQSGRTITILYVGYKGMIALACRTGFMI
GGHADLVFEEDTFTYRSGTQLPVHEHDGRPNHERGRLKCGYVVAHQPGGMVKTLLVP
KEVLLEAASNGLNAGGSNNTWCGPYMEMMYQKTCWRYAFNAWYSELEAVGMTQAQ
LESATTAVSYQ

ＷＰ＿１００９１６００３．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｓｅｕｄｏａｌｔｅｒｏｍｏｎａｓ　ｓｐｏｎｇｉａｅ］（配列番号４８４）

【化３９８】

NKFQHLQTELSSQLLSTKERFNELNNKNNLKVNFEEEYNFFYHLVTSSFYNINGIATCTF
SSLKEAFLNIAKYGLSINPKLNLCYIRTEQSCAQANVNIAVYDFGYKGLLKLITRTGKVKI
VTADVFYENDNFEFRGTREPVKHSTKTLSAAARGAMAGGYCSSELVAGGVVTTIMTPE
ELREIESICQSTGNEAWNSVFIDELRRKTLIKRHWKTLMQVIEEQNLSVPIEETYQCDFAN
GGY

ＷＰ＿１２５７１１７４７．１　ＲｅｃＴ　［Ｃｏｍｐａｎｉｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｋｅｄｏｎｇｅｎｓｉｓ］（配列番号４８５）

【化３９９】

MKDLARIPVKELVRSDTIKSKFNDVLGKRAPQFISSIVNIVNSNQDLKNVDQTSVISSALV
AASLDLPINQSFGYMYLVPYSGKAQPQMGYKGYIQLAQRSGQYKRLNAISVSKEKVPD
KMVIFIPDYRMEEAETQIDMYQDHIEDVKAGRVEPTRCGKCDYCKSTAKLGKIVSMDD
LID

ＷＰ＿００２８４５６８２．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｅｐｔｏｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ａｎａｅｒｏｂｉｕｓ］（配列番号４８６）

【化４００】

SNQVTESKKGYVAEKNITDSALNAINKYMNDGVLHLPKTYSVENAMKSAYLTLSQAKD
KNGKSVLESCTKESIYQSLLDMAVQGLTPAKNQCYFIPYGSKLTMSRSYLGTIAVTKSA
VPEVKDVKGYAIYDKDVFETEFDYNTGCIKIKKFERNFDSIDTNSIKGAFALIIGEHGVLH
TEVMNMAQIRNAWSMGATNGKSKAHNQFTDQMAIRTVINRACKFYINTSDDTSVLFAD
SYANSDEDTSSEREVEIVDENVREKK

ＷＰ＿１１５４０７１８５．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ　ｍｏｒｈｕａｅ］（配列番号４８７）

【化４０１】

QTAQVKLSVPHQQVYQDNFNYLSSQVVGHLVDLNEEIGYLNQIVFNSLSTASPLDVAAP
WSVYGLLLNVCRLGLSLNPEKKLAYVMPSWSETGEIIMKLYPGYRGEIAIASNFNVIKN
ANAVLVYENDHFRIQAATGEIEHFVTSLSIDPRVRGACSGGYCRSVLMDNTIQISYLSIEE
MNAIAQNQIEANMGNTPWNSIWRTEMNRVALYRRAAKDWRQLIKATPEIQSALSDTEY

ＷＰ＿０８１９５５８７３．１　ＲｅｃＴ　［Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ　ｔｒｏｇｏｎｔｕｍ］（配列番号４８８）

【化４０２】

SNITTIQRKNEALALLENKEIQERLCALCGNEASKDKFKASLLNIALDSNLSACSMQSIVK
ASLDIAGLKLSLNKNLGKAYIVPRKVKIGNDYITEARIDIGYKGWLELAKRSKLSVKAHS
VFDCDDFVYSVDGVDEYMKLTPNFELRQEHDSAWVKEHLKGIVVGIKDLKSGDSEVKF
VSKGTLLKIMQKNDSVKNGKYSAYTDWLHEMLLAKAIKSCLSKTAMSEDTFYLIISNNK
LFI

ＷＰ＿０６４６６４３００．１　ＲｅｃＴ　［Ｐｓｅｕｄｏａｌｔｅｒｏｍｏｎａｓ　ｓｐ．　ＭＱＳ００５］（配列番号４８９）

【化４０３】

SISQQDYENLLYSKLYECESQYQAYLAEHNEKLNFNAELNYMYKAVMSGVGIEGGFPY
TPLESIVESFLKAAKLGLSLDPSEQFCFLRSQYDHSTGLYHTELGLGYKGVLHLAYRSGK
VKQIVSNVFYNKDNFQFNGPNSKVTHTMTVLSTSARGNLAGGYCQTELVDGSFIVTVM
PPEEILAIEEQGKSVGNPAWLSAHVNQMREKTLILRHWKTLYPAIYSSSLLDSAQIFDDE
CEEFPFSSPSQGFSESQTIGSY

ＷＰ＿０６９４５５４９６．１　ＲｅｃＴ　［Ｓｈｅｗａｎｅｌｌａ　ｘｉａｍｅｎｅｎｓｉｓ］（配列番号４９０）

【化４０４】

QTAQVKLSVPHQQVFQDNFNYLSSQIVGHQVDLNEEIGYLNQIVFNSLATTSPLDVAAS
WSVYRLLLNVCRLGLSLDPEKKLAYVIPSLSETGEKIMKLYPGYRGEIAIASNANVLKNA
NAVLVYENDHFRIQAATGEIEHFVTSLSIDPRVRGACSGGYCRSVLMDGSVLMSYLSIEE
MDSIAQHQIEANMGNTPWNSIWRTEMNRVALYRRAAKDWRQLIKATPEMQSSLLDTEF

ＲＴＬ０４６１８．１　ＥＫＫ５８＿０９９２５　［Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ　Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔｉａｅ細菌］（配列番号４９１）

【化４０５】

CHVLNFQTDYKGEIKLAHKYSVRKIIDIYAKVVRDGDVLEIRVENGSQIVNFNPKVFNDG
KIIGAFAVVKFVDGSLLYETMSKSEIDHTRVTFSKMPNGMAWKDSEGEMCRKTVLRRIC
KLIDLHFDSVEQEQAWNDGSDADLTKNEPVKPEIQNPFPTKAVEAVIVTEEEKLRKQLK
DKDPTLQDWQIDALVREHKEANQ

実施例１８

【０３６９】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系によって例示されるように、遺伝子編集は、ヒトの健康および疾患の機構を調べるための強力なツールとなっている。Ｃａｓ９編集は、オンターゲット部位およびオフターゲット部位でＤＮＡ損傷を引き起こし、エラーを起こしやすい内因性ＤＮＡ修復機構に依存し得る。これらの特徴は、望ましくない突然変異および安全性の懸念につながることが多く、出願人が長い配列を変更すると悪化する可能性がある。哺乳動物ゲノムＤＮＡがｄＣａｓ９　ＤＮＡ巻き戻しおよびＲ－ループ形成時に一時的にアクセス可能になるという以前の研究に基づいて、出願人は、一本鎖アニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）が、ｄＣａｓ９－ガイドＲＮＡ複合体にカップリングされた場合に遺伝子編集のためのＤＮＡ鎖交換を刺激し得ると仮定した。したがって、出願人は、長い配列をノックインするために触媒的に不活性であるｄＣａｓ９を使用して、切断を伴わない遺伝子編集ツールを開発した。出願人のデータは、このｄＣａｓ９に基づくエディタが、標的遺伝子座において非常に低い編集誤差、最小限の検出可能なオフターゲット効果、およびＣａｓ９エディタよりも高い全体的精度を有することを実証した。一方、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタは、Ｃａｓ９エディタと同等の効率を有し、ヒト細胞株および幹細胞にわたって堅牢な性能を有していた。このｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタは、キロ塩基スケールまでの可変長の配列の挿入に有効であった。出願人がＤＮＡ修復酵素を化学的に阻害した実験では、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ編集は、内因性哺乳動物修復経路からの顕著な独立性を実証した。困難な細胞型のためのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタの簡便なウイルス送達のために、出願人は、将来の用途のために単一のＡＡＶベクターに適合するようにそのサイズを最小化するために短縮化およびアプタマー操作を行った。全体として、このツールは、哺乳動物細胞におけるより安全なゲノム操作に向けた機会を開く。

【０３７０】

ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９遺伝子編集の最初の実証以来、ゲノム機能の研究、生物学的プロセスのモデリング、および遺伝子治療のための遺伝子編集技術の改善および拡大に多大な努力が払われてきた。塩基編集およびプライム編集などの新世代の遺伝子編集ツールは

、遺伝子編集の効率および忠実度を実質的に改善し、比較的短い配列を変更するのに強力である。ほとんどの遺伝子編集ツールは、ゲノムＤＮＡを切断して、標的編集を容易にする一本鎖ニック（ＳＳＮ）または二本鎖切断（ＤＳＢ）を誘導することによって機能する。これらのＤＮＡ修飾は、しばしば、非相同末端連結（ＮＨＥＪ）（１２）などのエラーを起こしやすい内因性経路によって修復される。このプロセスは、しばしば望ましくない突然変異およびオフターゲット効果をもたらし、毒性をもたらし、安全性の懸念を引き起こす可能性がある。そのような編集エラーおよびオフターゲット効果は、長いゲノム配列（＞＝１００ｂｐ）を操作する場合、ますます、時には法外に深刻になるであろう。これらの望ましくない効果は、遺伝子編集の、大規模なゲノムノックインまたはインビボ遺伝子編集の操作への適用を制限する。プライム編集および双プライム編集として公知のものを伴うＷＯ２０２０／１９１２４１、ＷＯ２０２０／１９１１５３、ＷＯ２０２０／１９１２４５、ＷＯ２０２０／１９１２４３、ＷＯ２０２０／１９１２３３、ＷＯ２０２０／１９１２４６、ＷＯ２０２０／１９１２４９、ＷＯ２０２０／１９１２３９、ＷＯ２０２０／１９１２３４、ＷＯ２０２０／１９１２４２、ＷＯ２０２０／１９１２４８、ＷＯ２０２０１９１１７１およびＷＯ２０２１／２２６５５８が言及される。ＷＯ２０２０／１９１２４１、ＷＯ２０２０／１９１１５３、ＷＯ２０２０／１９１２４５、ＷＯ２０２０／１９１２４３、ＷＯ２０２０／１９１２３３、ＷＯ２０２０／１９１２４６、ＷＯ２０２０／１９１２４９、ＷＯ２０２０／１９１２３９、ＷＯ２０２０／１９１２３４、ＷＯ２０２０／１９１２４２、ＷＯ２０２０／１９１２４８、ＷＯ２０２０１９１１７１およびＷＯ２０２１／２２６５５８のそれぞれが、参考として本明細書に援用される。ＷＯ２０２０／１９１２４１、ＷＯ２０２０／１９１１５３、ＷＯ２０２０／１９１２４５、ＷＯ２０２０／１９１２４３、ＷＯ２０２０／１９１２３３、ＷＯ２０２０／１９１２４６、ＷＯ２０２０／１９１２４９、ＷＯ２０２０／１９１２３９、ＷＯ２０２０／１９１２３４、ＷＯ２０２０／１９１２４２、ＷＯ２０２０／１９１２４８、ＷＯ２０２０１９１１７１およびＷＯ２０２１／２２６５５８のＲＴが本発明の実施に使用できる。ＷＯ２０２０／１９１２４１、ＷＯ２０２０／１９１１５３、ＷＯ２０２０／１９１２４５、ＷＯ２０２０／１９１２４３、ＷＯ２０２０／１９１２３３、ＷＯ２０２０／１９１２４６、ＷＯ２０２０／１９１２４９、ＷＯ２０２０／１９１２３９、ＷＯ２０２０／１９１２３４、ＷＯ２０２０／１９１２４２、ＷＯ２０２０／１９１２４８、ＷＯ２０２０１９１１７１およびＷＯ２０２１／２２６５５８のリンカーまたは機能的なリンクの方法が本発明の実施に使用できる。

【０３７１】

相同組換え修復（ＨＤＲ）またはマイクロホモロジー媒介末端連結（ＭＭＥＪ）などの長い配列の編集のための利用可能なＣＲＩＳＰＲに基づく方法は、Ｃａｓ９切断に依存しており、ゲノム内でのランダムなインデル形成を引き起こすことが多い。化学的エンハンサー、エンハンスメントドメインの融合、および改変されたドナーＤＮＡなどの最近の多くの努力は、精密な長い配列の編集を強化している。ニッケルに基づくＨＤＲは、編集エラーを低減することが示されているが、効率を低下させる可能性がある。したがって、長い配列の変更のための効率的で安全なＣＲＩＳＰＲ編集ツールが依然として必要とされている。

【０３７２】

バクテリオファージは、アクセス可能な複製ゲノムＤＮＡを利用して正確な組換えを行う酵素を進化させた。出願人は、微生物組換えのための重要な酵素、すなわち一本鎖アニーリングタンパク質（ＳＳＡＰ）が哺乳動物細胞における遺伝子編集に有用であり得、それはＤＮＡを明示的に切断せず、Ｃａｓ９編集に必要とされたエラーを起こしやすい経路に依存しないと推論した。この仮説およびゲノム組換えを刺激する能力を示す出願人の以前の研究によって動機付けられ、出願人は、不活性化Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９、または触媒的に不活性のＣａｓ９）および微生物ＳＳＡＰを使用して遺伝子編集ツールを開発した。このｄＣａｓ９エディタは、ゲノムＤＮＡ切断を必要とせずに、ドナーＤＮＡと共に供給されたときにノックイン編集のためにＳＳＡＰを使用する。出願人はそれをｄＣａｓ９－

ＳＳＡＰエディタ（ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ）と命名した。

【０３７３】

ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを最適化するために、出願人は、ＲｅｃＴホモログに注目してＳＳＡＰのメタゲノム検索を行い、ＥｃＲｅｃＴをヒトゲノムノックインのための最も効率的なものとして同定した。検証のために、出願人は一連のゲノム操作および化学的撹乱実験を行った。出願人のデータは、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰが野生型Ｃａｓ９参照に匹敵するノックイン効率を有し、効率がＣａｓ９ニッカーゼエディタよりも有意に高いことを示した。ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰは、キロ塩基スケールの配列編集のために、複数のゲノム標的および細胞株にわたって選択なしで最大１２％のノックイン効率を達成した。さらに重要なことに、出願人のデータは、この新しいツールがほぼ０のオンターゲットエラーおよびオフターゲットエラーを生成することを示した。１ｋｂ配列ノックインについてのアッセイでは、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰは全ての細胞にわたって０．３％未満の編集エラーを有し、一方Ｃａｓ９エディタは、同様の収率を有したが、さらに１０％～１６％の不正確に編集された細胞を有した。試験した遺伝子座にわたって、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰは９０％～９９．６％の編集精度を有し、一方Ｃａｓ９エディタの精度は１０％～３８％の範囲であった（図３９Ｆ）。

【０３７４】

さらに、出願人は、いくつかのＤＮＡ修復酵素を阻害し、細胞周期同期化を行うことによってｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ編集の機構を調査した。これらの実験では、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰは、Ｃａｓ９編集とは対照的に、内因性ＤＮＡ修復経路への依存性が少ないことを示した。出願人の細胞周期アッセイの結果は、ｄＣａｓ９エディタの仮説的機構を支持した；これらは、ｄＣａｓ９の既知の生物物理学的、生化学的特性と一致する。

【０３７５】

最後に、将来の用途のためのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰの送達を助けるために、出願人は、構造的にガイドされた短縮化を使用してその分子設計を最適化し、最小化されたｄＳａＣａｓ９－ｍＳＳＡＰを得て、サイズの５０％超の縮小を達成し、同様のレベルの効率を維持する。この最小限のｄＣａｓ９エディタは、形質移入が困難な細胞型またはインビボ用途に潜在的に有用なアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）などのウイルスベクターを使用した便利な送達を可能にする。全体として、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタは、効率的で正確なノックインゲノム操作が可能である。さらなる改善の余地があるため、哺乳動物細胞のための切断のない遺伝子編集ツールとしての潜在的な研究および治療価値を有する。

【０３７６】

ｄＣａｓ９ノックイン遺伝子編集のためのファージＳＳＡＰの使用。長い配列のノックインが可能なほとんどのＣＲＩＳＰＲに基づくエディタは、競合する、エラーを起こしやすいＮＨＥＪ経路を引き起こす可能性があるＳＳＮまたはＤＳＢを必要とし、その結果、効率および精度が変化する。対照的に、バクテリオファージは、配列相同性、例えばラムダＲｅｄを介して宿主細菌のゲノムに組み込まれるようにＤＮＡ修飾酵素を進化させた。そのような正確なファージ組み込みは、主要な相同性指向ステップに依存する：ゲノムＤＮＡとドナーＤＮＡとの間の組換えは、ＳＳＡＰ、例えばラムダＢｅｔまたはその機能的ホモログであるＲｅｃＴによって刺激される。以前の研究から、出願人は、ファージＳＳＡＰが、ヒト細胞におけるＡＴＰ依存性ＲＡＤ５１タンパク質とは対照的に、その異常なＡＴＰ非依存性活性のためにＤＮＡ切断に依存しない可能性があると推論した。一本鎖および二本鎖ＤＮＡに対するファージＳＳＡＰの高い親和性は、複数のＳＳＡＰがＲＮＡガイドｄＣａｓ９を介してゲノム標的に動員される場合、ドナー鋳型への付着を可能にし得る。次いで、標的ＤＮＡ鎖がｄＣａｓ９媒介ＤＮＡ巻き戻しおよびＲ－ループ形成中に一時的にアクセス可能になるので、切断なしでゲノム－ドナーＤＮＡ交換を促進することができる。

【０３７７】

この仮説に基づいて、出願人は触媒的に不活性であるＣａｓ９（ｄＣａｓ９）にＳＳＡＰを動員する系を設計した（図３８Ａ）。ｄＣａｓ９タンパク質は、ＤＮＡを切断するこ

とができないが、標的部位を巻き戻し、Ｒ－ループを形成する能力を保持し、ＳＳＡＰ刺激相同組換えのために非標的鎖を推定上アクセス可能にする。これを試験するために、出願人は、３つの主要なタイプの微生物ＳＳＡＰ：ラムダＢｅｔタンパク質（ラムダｂｅｔ）；大腸菌ＲａｃプロファージＲｅｃＴ（Ｒａｃ　ＲｅｃＴ）およびファージＴ７　ｇｐ２．５（Ｔ７　ｇｐ２．５）を操作し、評価した。出願人は、ＲＮＡアプタマーＭＳ２ステムループ（図３８Ａ、図３８Ｃ）を介して、これらのＳＳＡＰをＳ．ｐｙｏｇｅｎｅｓのＣａｓ９の不活性化バージョン（ｄＳｐＣａｓ９、以下ｄＣａｓ９として簡略化される）に動員した。このＭＳ２－アプタマーをｓｇＲＮＡ足場に挿入し、候補ＳＳＡＰを、ＭＳ２アプタマーに特異的に結合するＮ末端ＭＳ２コートタンパク質（ＭＣＰ）に融合し、それにより、複数のＳＳＡＰがｄＣａｓ９－ガイドＲＮＡと複合体を形成することを可能にした。ヒト細胞におけるそれらの遺伝子編集活性を測定するために、出願人は、ハウスキーピング遺伝子、例えばＤＹＮＬＴ１、ＨＳＰ９０ＡＡ１、ＡＣＴＢ（図３８Ｂ、左）へのＦＰのインフレーム挿入を可能にする相同アーム（ＨＡ）に隣接する蛍光タンパク質（ＦＰ）カセットをコードする８００ｂｐ導入遺伝子を有するノックインドナーを作製した。正確なノックインの際に、出願人は、ＦＰ発現細胞のパーセンテージを測定して遺伝子編集効率を定量した（図３８Ｂ～図３８Ｄ）。出願人の初期試験は、ＲｅｃＴがヒト細胞において他のＳＳＡＰと比較してより高いノックイン編集活性を有することを同定したが、ｄＣａｓ９単独または非標的対照ではバックグラウンドを超える編集は観察されなかった（図３８Ｃ、図３８Ｄ）。出願人は、ゲル電気泳動およびシーケンシングを使用してこのノックイン編集を検証した（図４４）。これは、ＲＮＡアプタマーを介してＳＳＡＰをｄＣａｓ９にカップリングすることがノックイン遺伝子編集を可能にするという証拠を提供した。

【０３７８】

哺乳動物遺伝子編集ツールとしてのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰの開発。出願人は、哺乳動物の遺伝子編集のための最良のＳＳＡＰを同定するためにメタゲノムマイニングを行った。出願人は、ＲｅｃＴホモログに注目し、系統発生分析によって進化的多様性を最大化しようと努めた。出願人は、ＲｅｃＴホモログについてＮＣＢＩ非冗長配列データベースを体系的に検索し、２，０７１個の初期候補を同定した。次いで、出願人は系統樹を構築し、高い配列相同性を有するタンパク質を除外し、進化分岐をサブサンプリングし、１６の高度に多様なＳＳＡＰ候補を得た（図４４）。

【０３７９】

出願人は、ノックインスクリーニングによってＳＳＡＰ候補を調べ、３つのゲノム遺伝子座：ＨＳＰ９０ＡＡ１、ＤＹＮＬＴ１、およびＡＣＴＢにわたるそれらの編集効率を評価した（図３８Ｅ）。全ての候補の中で、ＥｃＲｅｃＴは、ｄＣａｓ９編集について最も高い効率を示す－ヒト細胞において最大約６％の効率でキロ塩基カセットのゲノムノックインを達成する。これは、ＳＳＡＰを有しないｄＣａｓ９対照よりも有意に高く、ドナーなしの対照に匹敵し、ｄＣａｓ９単独ではゲノムノックインを行うことができないことを示唆した（図３８Ｅ）。ドナーＤＮＡのバックグラウンド挿入の可能性を測定するために、出願人は、ゲノム標的を認識しないガイドＲＮＡを使用する非標的対照を含めたところ、ドナーなしの陰性対照と同等の活性が観察された（図３８Ｅ）。出願人はまた、非標的対照でＳＳＡＰを試験し、ＳＳＡＰを単独で発現させるだけではノックインに十分ではないことを確認した（図３８Ｅ）。最後に、出願人は、異なるドナーＤＮＡ設計で新しいエディタを試験した（図３８Ｆ）。出願人の結果は、ＳＳＡＰ媒介編集が、ＭＭＥＪドナーよりもＨＤＲを使用する場合により効率的であり、より長い相同アームが一般に編集効率をより高くすることを示唆した（図３８Ｆ）。これは、ＭＭＥＪがｄＣａｓ９編集において欠けているＤＮＡ切断に依存しているという以前の報告と一致している。まとめると、提案されたｄＣａｓ９エディタは、ＥｃＲｅｃＴを上位ＳＳＡＰとして、ヒト細胞における効率的なノックイン編集を可能にした。以下では、出願人は、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰと呼ばれるこの上位設計に焦点を合わせる。

【０３８０】

ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ遺伝子編集の精度の特性評価。ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを開発する動機は、ＳＳＡＰの助けを借りて潜在的により安全な切断のないｄＣａｓ９編集を行うことである。したがって、出願人は、標的配列が約１ｋｂ長である場合のノックイン編集についてのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰの精度を実験的に評価した。出願人は、Ｃａｓ９参照と比較して、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰのオンターゲットエラー、オフターゲット挿入、細胞適合性効果、および編集収率を測定した。

【０３８１】

オンターゲットエラー分析。２つのタイプのオンターゲットエラーがある。（１）その発生がノックインが不成功であることを意味するオンターゲットインデル形成；（２）ノックインエラー、これは、ノックインが起こるが不完全であり、ジャンクションインデルが発生することを意味する。

【０３８２】

（１）を評価するために、出願人はディープシーケンシングを使用して、ｄＣａｓ９エディタのオンターゲットのインデル形成を測定した。出願人は、鋳型混入を回避するために、最初のプライマーがドナーＤＮＡの外側に結合するネステッドＰＣＲ設計を使用した（図３９Ａ、図４６）。オンターゲット部位のディープシーケンシングは、Ｃａｓ９エディタについて観察された高レベルのインデル形成とは対照的に、ｄＣａｓ９エディタのオンターゲットエラーのレベルが陰性対照と同程度に低いことを示した（図３９Ａ）。

【０３８３】

（２）を評価するために、出願人は、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰのノックインエラーをベンチマークし、ジャンクションインデルを測定した。出願人は、編集された細胞をクローン単離し、次いで、混入を回避するために同様の２段階ネステッドＰＣＲ設計を使用してノックインゲノム遺伝子座を増幅し（図３９Ｂ、４６）、出願人は、サンガーシーケンシングによって編集されたゲノム対立遺伝子を評価した。ロングリードのサンガーシーケンシングにより、ノックインジャンクション全体を徹底的に調べることができた。出願人の結果は、Ｃａｓ９を使用する場合、ＭＭＥＪドナーはＨＤＲドナーよりも効率的であるが、それらはまた、有意により高いパーセンテージの編集エラーをもたらすことを示した（図３９Ｂ）。より重要なことには、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰは、ノックインエラーのないクローンのパーセンテージに関してＣａｓ９－ＨＤＲおよびＣａｓ９－ＭＭＥＪを上回った（図３９Ｂ、図４７～図４８）。１つの遺伝子座において、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰは１００％のノックイン成功を達成した（アッセイ感度の限界内、方法を参照のこと）。

【０３８４】

オフターゲットエラー分析。出願人は、ゲノムワイド導入遺伝子挿入アッセイを介してｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ編集のオフターゲットノックインエラーを評価した（図３９Ｃ～図３９Ｅ、図４９）。手短に言えば、出願人は、高分子量ゲノムＤＮＡを単離し、引き続いて断片化およびＵＭＩアダプター連結を行い、次いで、ゲノム内の挿入部位の偏りのない同定のために導入遺伝子特異的プライマーを使用した（図３９Ｃ）。Ｃａｓ９ゲノムワイドオフターゲット研究から改変された以前に検証された分析パイプラインを通して（方法）、出願人は、高存在量の導入遺伝子挿入部位を表すリードの濃縮ピークを同定することができた（図３９Ｄ）。この分析のために、出願人はまた、全ての群が同じシーケンシングデプス／カバレッジを有することを確実にするためにダウンサンプリングを行った。全アライメントされたリードの＞１％を有する挿入部位を考慮すると、出願人の結果により、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰはオフターゲット挿入部位を検出しなかったが、Ｃａｓ９参照はかなりの数のオフターゲットエラー部位をもたらしたことが確認された（図３９Ｅ）。特に、全てのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ試料において、Ｃａｓ９エディタとは対照的に、少なくとも１つのＵＭＩがアライメントされている全ての部位を出願人が考慮すると、オフターゲット部位は有意に少なかった（図４９）。この結果は、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰが、長い配列のノックインで顕著であるオフターゲット問題に対処するのに役立ち得ることを示唆している。

【０３８５】

細胞適合性効果および編集収率分析。出願人はまた、Ｃａｓ９／ｄＣａｓ９に基づく編集を経た細胞の適合性を比較した。出願人は２つの標的部位を実験し、データは、ｄＣａｓ９編集が一般にＣａｓ９編集よりも高い細胞適合性をもたらすことを示唆している（図３９Ｆ、図３９Ｇ）、編集後の生細胞の正規化されたパーセンテージによって定義される）。

【０３８６】

全体像について、出願人は、Ｃａｓ９参照と比較して、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰの編集収率を要約した。出願人は、正確なノックインのパーセンテージ、エラーを有するノックインのパーセンテージ、およびノックインなしのオンターゲットインデルのパーセンテージを集計し、後者２つの合計は総オンターゲットエラーである（図３９Ｈ）。出願人はまた、編集の全体的な精度率を測定し、これは成功したノックイン細胞と編集された全細胞との間の比によって定義される（図３９Ｈ）。この分析において、出願人は、Ｃａｓ９エディタが長い配列の編集について頻繁なエラーを受け、誤った編集のパーセンテージが収率よりも有意に高く、その精度率が１０％～３８％の範囲であることを観察した。ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰは、最良のＣａｓ９参照と同様のレベルのノックイン収率を有したが、最小のエラーを有し、ゲノム遺伝子座にわたって９０％～９９％の精度率を達成した。

【０３８７】

Ｃａｓ９編集によるｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ編集の効率のベンチマーク。ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰがノックイン編集に対してより高い精度を有することを確立したので、出願人はその効率および利用用途をさらに検証した。出願人は、異なる細胞株にわたってその編集効率をベンチマークした。ベンチマークのために、出願人は、３つのＨＤＲ増強ツールを含む、野生型およびニッキングに基づくＣａｓ９（ｎＣａｓ９）エディタの両方を実験した。出願人は、ヒトＨＥＫ２９３Ｔ細胞における３つのゲノム標的にわたるそれらの１ｋｂノックイン活性を調べた。この比較からの結果は、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰが、Ｃａｓ９、ｎＣａｓ９およびｎＣａｓ９－ｈＲＡＤ５１ニッカーゼエディタよりも高い効率を達成し、Ｃａｓ９－ＨＥおよびＣａｓ９－ＧＥＭ（２つの発表されたＨＤＲ増強エディタ）と同等の効率を有することを実証した（図４０Ａ）。さらに、出願人のデータは、単一ガイドｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタが効果的なノックインに十分であり、２つのガイドＲＮＡを使用した場合にわずかな改善があったことを示した（図５０Ｃ～５０Ｄ）。したがって、出願人は、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰがＣａｓ９に基づくエディタと同様のレベルの効率を有すると結論付けた。

【０３８８】

次に、出願人は、異なるドナーＤＮＡ設計を用いてｄＣａｓ９－ＳＳＡＰの編集効率を評価した（図４０Ｃ）。出願人の結果は、ＳＳＡＰ媒介編集が、ＭＭＥＪドナーよりもＨＤＲを使用する場合により効率的であり、より長いＨＡが一般により高い編集効率をもたらすことを示した。出願人は、ノックインのための配列が、デュアルＦＰノックインのために最大２ｋｂの可変長を有する場合のｄＣＡＳ９－ＳＳＡＰの編集効率を評価した（図４０Ｄ）。出願人のデータは、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰが一貫した性能を有し、試験した導入遺伝子長にわたってＣａｓ９参照と同等であり、しばしばより高い効率を有することを示した（図４０Ｄ）。

【０３８９】

最後に、出願人は、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタがゲノム標的にわたって堅牢な活性を有するかどうか、および１つのモデル細胞株を超えるより困難な場合に適用可能であるかどうかを試験した。出願人は、以前に試験された３つの遺伝子座（ＤＹＮＬＴ１、ＨＳＰ９０ＡＡ１、ＡＣＴＢ）に加えて、ハウスキーピング遺伝子から４つの追加の内因性遺伝子座（ＢＣＡＰ３１、ＨＩＳＴ１Ｈ２ＢＫ、ＣＬＴＡ、ＲＡＢ１１Ａ）を選択した（図４０Ｅ）。全てのゲノム部位にわたって、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタは、選択なしで最大１２％の効率を示し、同じドナーを使用したＣａｓ９参照に匹敵し、しばしば、よりわずかに高かった（図４０Ｅ）。

【０３９０】

さらに、出願人は、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを、特徴的な組織起源（子宮頸部由来のＨｅＬａ細胞、肝臓由来のＨｅｐＧ２細胞、および骨由来のＵ－２ＯＳ細胞）を有する３つの細胞株に適用した。出願人は、３つ全ての株においてＣａｓ９参照と同等の一貫したノックイン効率を観察した（図４２）。最後に、出願人は、ヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）においてｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタを使用して、より治療的に関連する状況で配列を操作した。出願人は、試験した３つのゲノム部位全てにわたって堅牢なノックイン編集活性を観察した（図４０Ｆ、図４０Ｇ）。注目すべきことに、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ編集は、短い約２００ｂｐのＨＡを使用し、ヒト幹細胞においてＣａｓ９参照と同等であり、しばしば、それよりも高い、選択なしのｋｂスケールの編集について最大約３％の効率を達成した（図４０Ｇ、図５２）。

【０３９１】

化学的撹乱は、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ遺伝子編集が内因性ＤＮＡ修復経路への依存性が少ないことを示唆する。ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰがＤＮＡ切断または内因性修復経路への依存なしに遺伝子編集を行うという出願人のモデルを想起されたい。ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ編集の性質をよりよく理解するために、出願人は、その機構を調べるために３つの直交する化学的撹乱を使用した（図４１）。

【０３９２】

最初に、出願人は、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ編集が、Ｃａｓ９編集のようにＤＳＢ修復経路に依存するかどうかを調べる（図４１Ａ）。Ｃａｓ９媒介ノックインでは、Ｍｒｅ１１－Ｒａｄ５０－Ｎｂｓ１（ＭＲＮ）複合体によるＤＳＢの認識は、下流ＨＤＲ修復に必要なステップである。出願人は、ＭＲＮ複合体形成、ＡＴＭ活性化、およびＭｒｅ１１エキソヌクレアーゼ活性を防止することが示されている、ＤＳＢ修復の強力な化学的阻害剤であるＭｉｒｉｎを活用した。出願人は、細胞をＭｉｒｉｎで処理し、これらの細胞に対するｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ参照およびＣａｓ９参照の編集効率を試験した。全てのゲノム標的にわたって、出願人は、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ効率がＭｉｒｉｎ処理によってほぼ影響を受けず、ビヒクル処理群と本質的に同じであったことを観察する（図４１Ｂ、Ｍｉｒｉｎ）。一方、Ｃａｓ９参照は、Ｍｉｒｉｎ処理下での編集効率の大幅な低下を示し、これは、Ｃａｓ９の編集がＤＳＢ修復に依存することを示唆している（図４１Ｂ、Ｍｉｒｉｎ）。

【０３９３】

第２に、出願人は、ＨＤＲ経路に対するｄＣａｓ９－ＳＳＡＰの依存性を調べた。出願人は、この律速段階を遮断するために、ＨＤＲ酵素ＲＡＤ５１の２つの小分子阻害剤（ＲＩ－１およびＢ０２）を使用した。出願人のデータは、これら２つの阻害剤を介してＲＡＤ５１活性を遮断すると、全てのゲノム標的でＣａｓ９編集効率が有意に低下したが、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ編集には有意な効果がなかったことを示した（図４１Ｂ、ＲＩ１およびＢ０２）。これらの２つの修復調節実験は一貫した結果をもたらした：ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰは、Ｃａｓ９参照よりも内因性ＤＮＡ修復機構に対する依存性が有意に低かった。それらは、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰが、ｄＣａｓ９－ガイドＲＮＡ複合体によって動員されたときにＳＳＡＰの活性を介して作用し、Ｃａｓ９編集とは異なることを示唆している。

【０３９４】

第３に、出願人は、細胞周期がｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタにどのように影響するかを調べた。細胞周期は、哺乳動物ゲノムのアクセスしやすさを促進することが示されている。より具体的には、ゲノム複製（Ｓ期中）は、ｄＣａｓ９がＤＮＡを巻き戻し、ＳＳＡＰ媒介組換えを可能にするための好ましい環境を提供し得る（図４１Ｃ）。この潜在的効果を試験するために、出願人は二重チミジン遮断（ＤＴＢ）を使用してＧ１／Ｓ境界で細胞を同期させた。ＤＴＢ処理は実際にｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ編集効率を低下させた（図４１Ｄ）。それにもかかわらず、出願人がＭｉｒｉｎ、ＲＩ－１またはＢ０２をＤＴＢ処置と組み合わせたとき、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰは、試験したゲノム遺伝子座にわたってＣａｓ９参照よりも高い編集効率を維持した（図４１Ｄ）。これは、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタが内因性修復経路への依存性が少ないことをさらに裏付けた。

【０３９５】
まとめると、出願人のデータは、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ編集の仮説的機構を支持した：ＲＮＡガイドｄＣａｓ９はゲノム標的に結合し、それらをＳＳＡＰにアクセス可能にするので、ＳＳＡＰはＤＮＡ切断を生じさせることなく相同組換えを促進するであろう（図３８Ａ）。このプロセスをより深く理解するには、哺乳動物ゲノムのアクセス可能性を乱すために遺伝子編集または追加のアッセイを行うので、さらなる調査、例えばｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ複合体の生物物理学的分析が必要であろう。出願人は、この結果が機会を広げ、ｄＣａｓ９編集アプローチを更に開発するための有用な洞察をもたらすことができることを望む。

【０３９６】
簡便な送達のためのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ遺伝子編集ツールの最小化。最後に、潜在的な将来の用途のためにｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタを最適化するために、出願人は、ＡＡＶなどのウイルスベクターのサイズ制限に適合する最小バージョンを開発しようとした。出願人は、その二次構造予測に基づいて１４の異なる短縮化ＥｃＲｅｃＴバリアントを設計し（図４２Ａ、図５３）、完全長ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ対照と共にそれらの遺伝子編集活性について全ての構築物を試験した。最適化結果から、出願人は、元の完全長ＲｅｃＴに基づく設計と同等の効率を有する短いＲｅｃＴバリアント（長さ約２００ａａ）を同定した（図４２Ｂ）。

【０３９７】
次に、出願人は、この短いＲｅｃＴバリアントをよりコンパクトなＳａＣａｓ９系およびより小さいＮ２２－ＢｏｘＢアプタマー設計と統合して、最小機能のｄＳａＣａｓ９－ｍＳＳＡＰエディタを構築した（図４２Ｃ）。これにより、ｄＳａＣａｓ９－ｍＳＳＡＰを単一のＡＡＶに適合させ、長い配列の編集のために４ｋｂ以上のドナーＡＡＶを使用することができた（図４２Ｃ）。出願人は、ＡＡＶ２粒子の送達を介してｄＳａＣａｓ９－ｍＳＳＡＰエディタを試験し、それがＨＥＫ２９３Ｔ細胞において完全長バージョンに匹敵する効率を有することを確認した（図４２Ｄ）。この設計は、さらなるインビボ検証が必要であるが、このｄＣａｓ９ノックインエディタの送達のための便利な選択肢を提供し得る。

【０３９８】
全体として、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタは、ＣＲＩＳＰＲゲノム標的化のＲＮＡガイドプログラム可能性をファージ酵素ＲｅｃＴのＳＳＡＰ活性と調和させる。それは、最小限のＤＮＡ損傷での長い配列の編集を可能にし、大きな疾患原因バリアントを含む現在難治性の疾患のいくつかに対処するための、選択方法が制限されているインビボで治療用遺伝子を送達するための、または遺伝子編集中の望ましくない改変を最小限に抑えるための、研究および治療の可能性を提供する。ＤＮＡ切断後の内因性修復経路に依存する他の長い配列の編集方法と比較して、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰおよびそのミニバージョンは、非切断ｄＣａｓ９を介して相同性媒介遺伝子編集を促進する。この効率的で低エラーの技術は、既存のＣＲＩＳＰＲ編集ツールに対する新規かつ補完的なアプローチを提供する。

【０３９９】
プラスミド構築。ヒトコドン最適化ＤＮＡ断片をＧｅｎｅｓｃｒｉｐｔ，ＧｅｎｅｗｉｚおよびＩＤＴ　ＤＮＡから注文した。組換え酵素をコードする断片を、Ｑ５（登録商標）Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　２Ｘ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ）を使用して骨格にＧｉｂｓｏｎアセンブルした（ａｄｄｇｅｎｅプラスミド＃６１４２３）。これらのＳＳＡＰのアミノ酸配列は、表１０に見出すことができる。全てのｓｇＲＮＡを、Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅクローニングを使用して骨格（ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰおよびｄＳａＣａｓ９－ＳＳＡＰプラスミド）に挿入した。ｇＲＮＡ骨格としてＢｂｓＩ部位（ｄＳｐＣａｓ９）およびＢｓａＩ部位（ｄＳａＣａｓ９）を有するｄＣａｓ９－ＳＳＡＰプラスミドを配列検証した（ＥｔｏｎおよびＧｅｎｅｗｉｚ）。この研究で使用されたｓｇＲＮＡ配列は、表８に見出すことができる。全てのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰプラスミドは、オープンアクセスのためにＡｄｄｇｅｎｅに寄託される。

【０４００】
細胞培養。ヒト胎児腎臓（ＨＥＫ）２９３Ｔ、Ｈｅｌａ、ＨｅｐＧ２およびＵ２ＯＳ細胞を、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ，ＢｅｎｃｈＭａｒｋ）、１００Ｕ／ｍＬペニシリンおよび１００μｇ／ｍＬストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を含むダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ，Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中、３７℃、５％　ＣＯ２で維持した。ＨＥＫ　２９３Ｔ、Ｈｅｌａ、ＨｅｐＧ２およびＵ２ＯＳ細胞は、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から入手した。細胞株の同一性は、短いタンデムリピート（ＳＴＲ）アッセイによって定期的に認証され、ｑＰＣＲアッセイを使用してマイコプラズマの存在について日常的に試験される。

【０４０１】
ｈＥＳ－Ｈ９細胞を、ｍＴｅＳＲ１培地（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）中、３７℃、５％　ＣＯ２で維持した。使用の１２時間前に、培養プレートをマトリゲル（Ｃｏｒｎｉｎｇ）で予めコーティングした。１０μＭ　Ｒｈｏキナーゼ阻害剤Ｙ２７６３２（Ｓｉｇｍａ）を各継代後の最初の２４時間にわたり添加した。培養培地を２４時間ごとに交換した。

【０４０２】
形質移入。ＨＥＫ２９３Ｔ、Ｈｅｌａ、ＨｅｐＧ２およびＵ２ＯＳ細胞を、形質移入の１２～２４時間前に３０，０００細胞／ウェルの密度で９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）に播種し、ウェルあたり２５０ｎｇの総ＤＮＡを形質移入した。製造業者の指示に従って、細胞が約７０％コンフルエンスになったら、細胞にリポフェクタミン３０００（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を形質移入した。簡単に記載すると、出願人は、ウェルあたり１０ｕｌのＯｐｔｉ－ＭＥＭと混合した、２５０ｎｇの総ＤＮＡ、０．４ｕｌのＬｉｐ３０００試薬を使用した。２５０ｎｇのＤＮＡのために、出願人は、１６０ｎｇのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰガイドＲＮＡプラスミド（二重ｓｇＲＮＡｄ設計のために、等量の２つのガイドＲＮＡプラスミド、例えば、それぞれ８０ｎｇを使用する）、６０ｎｇのｐＭＣＰ－ＲｅｃＴまたはＧＦＰコントロールプラスミド（ａｄｄｇｅｎｅ＃６４５３９）および３０ｎｇのＰＣＲ鋳型ＤＮＡ（ＰＣＲプライマーは表９に見出すことができ、鋳型配列は補足配列に見出すことができる）を使用した。３日後、細胞をＦＡＣＳを用いて分析した。

【０４０３】
エレクトロポレーション。ｈＥＳ－Ｈ９形質移入のために、Ｐ３　Ｐｒｉｍａｒｙ　Ｃｅｌｌ　４Ｄ－ＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒＴＭ　Ｘ　Ｋｉｔ　Ｓ（Ｌｏｎｚａ）を製造業者のプロトコルに従って使用した。簡単に記載すると、ｈＥＳ－Ｈ９細胞をＡｃｃｕｔａｓｅ（Ｉｎｎｏｖａｔｉｖｅ　Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を用いて再懸濁し、ＰＢＳで２回洗浄した後、エレクトロポレーションを行った。各反応について、ＤＣ１００　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　Ｐｒｏｇｒａｍを使用して、２０ｕｌエレクトロポレーション緩衝液中で混合した４μｇの総ＤＮＡで３００，０００個の細胞をヌクレオフェクションした。４ｕｇのＤＮＡのために、出願人は、２．６ｕｇのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰガイドＲＮＡプラスミド（二重ｓｇＲＮＡｄ設計のために、等量の２つのガイドＲＮＡプラスミド、例えば、それぞれ１．３ｕｇを使用する）、１ｕｇのｐＭＣＰ－ＲｅｃＴまたはＧＦＰコントロールプラスミドおよび０．４ｕｇのＰＣＲ鋳型ＤＮＡ（ＰＣＲプライマーは表９に見出すことができ、鋳型配列は補足配列に見出すことができる）を使用した。エレクトロポレーション後、細胞を、１０ｕＭのＹ２７６３２を添加した１ｍＬのｍＴｅＳＲ１培地を含む１２ウェルプレートに播種した。培養培地を２４時間ごとに交換した。４日後、細胞をＦＡＣＳを用いて分析した。

【０４０４】
蛍光活性化細胞分析（ＦＡＣＳ）。ｍＫａｔｅノックイン効率をＣｙｔｏＦＬＥＸフローサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ；Ｓｔａｎｆｏｒｄ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　ＦＡＣＳ　Ｃｏｒｅ）で分析した。形質移入の７２時間後またはエレクトロポレ

ーションの９６時間後、細胞をＰＢＳで２回洗浄し、ＴｒｙｐＬＥ Ｅｘｐｒｅｓｓ Ｅｎｚｙｍｅ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で解離させた。次いで、細胞懸濁液を９６ウェルＵ底プレート（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に移し、３００ｇで５分間遠心分離した。上清を除去した後、ペレット化した細胞をＰＢＳ中４％ ＦＢＳ ５０μｌで再懸濁し、調製後３０分以内に細胞を分析した。

【０４０５】

ノックインジャンクションのサンガーシーケンシングおよびＮＧＳ。プラスミドＤＮＡおよびＨＤＲ鋳型を形質移入したＨＥＫ２９３Ｔ細胞を形質移入の７２時間後に回収した。製造業者のプロトコルに従って、ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ ＤＮＡ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｂｉｏｓｅａｒｃｈ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、これらの細胞のゲノムＤＮＡを抽出した。標的ゲノム領域を、ＨＤＲ鋳型の相同アームの外側の特異的プライマーを使用して増幅した。サンガーシーケンシングまたはＮＧＳ分析に使用したプライマーは、表９に見出すことができる。ＰＣＲ産物をＭｏｎａｒｃｈ ＰＣＲ＆ＤＮＡ Ｃｌｅａｎｕｐ Ｋｉｔ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ）で精製した。１００ｎｇの精製産物を、標的特異的プライマーを用いたサンガーシーケンシングに送った（ＥｔｏｎＢｉｏまたはＧｅｎｅｗｉｚ）。

【０４０６】

ＨＲおよび細胞周期阻害剤による処理。全ての阻害剤は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈから注文した。異なる阻害剤アッセイのために、細胞を、Ｍｉｒｉｎ（Ｓｉｇｍａ、Ｍ９９４８－５ＭＧ、２５ｕＭ）、Ｂ０２（Ｓｉｇｍａ、ＳＭＬ０３６４、１０ｕＭ）、）またはＲＩ－１（Ｓｉｇｍａ、５５３５１４－１０ＭＧ－Ｍ、１ｕＭ）で１６時間前処理した。細胞周期試験のために、細胞をチミジン（Ｓｉｇｍａ、Ｔ９２５０－１Ｇ、２ｍＭ）で１８時間前処理し、次いでチミジンを除去し、チミジンを含まない正常なＤ１０を使用して細胞を９時間培養し、２回目のチミジンを添加してさらに１８時間、２ｍＭの最終濃度にした。阻害剤およびチミジンの後、製造業者の指示に従ってリポフェクタミン３０００を使用して細胞をｄＣａｓ９－ＳＳＡＰで形質移入した。３日後、細胞をＣｙｔｏＦＬＥＸフローサイトメーターで分析し、上記のようにシーケンシング検証のためにゲノムＤＮＡも採取した。

【０４０７】

次世代シーケンシングライブラリーの調製。形質移入の７２時間後、ＱｕｉｃｋＥｘｔｒａｃｔ ＤＮＡ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｂｉｏｓｅａｒｃｈ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いてゲノムＤＮＡを抽出した。２００ｎｇの総ＤＮＡをＮＧＳライブラリー調製のために使用した。１回目のＰＣＲ反応のために特異的プライマー（表９）を使用して、目的の遺伝子を増幅した。Ｉｌｌｕｍｉｎａアダプターおよびインデックスバーコードを、表９に列挙したプライマーを用いて２回目のＰＣＲで断片に付加した。２回目のＰＣＲ産物を、Ｍｏｎａｒｃｈ ＤＮＡ Ｇｅｌ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂ）を使用して２％ Ｅ－ゲルでのゲル電気泳動によって精製した。精製産物をＱｕｂｉｔ ｄｓＤＮＡ ＨＳ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）で定量し、ペアエンドＰＥ３００キットを使用してＩｌｌｕｍｉｎａ ＭｉＳｅｑシステムでシーケンシングした。全てのシーケンシングデータはＮＣＢＩ ＳＲＡアーカイブに寄託される。

【０４０８】

ＴＯＰＯクローニング実験。合計２５０ｎｇのゲノムＤＮＡをＴＯＰＯクローニング実験に使用した。ノックイン事象を、Ｐｈｕｓｉｏｎ Ｆｌａｓｈ Ｈｉｇｈ－Ｆｉｄｅｌｉｔｙ ＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｆ－５４８Ｌ）を使用して、ＤＹＮＬＴ１またはＨＳＰ９０ＡＡ１遺伝子座（表９）を標的とする特異的ＴＡコロニープライマーを使用して増幅した。ゲル抽出キット（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ、Ｔ１０２０Ｌ）を製造者の説明書に従って使用して、標的化ＰＣＲ産物を精製する。ａ－テールを、Ｔａｑポリメラーゼ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ、Ｍ０２７３Ｓ）を使用して、７２Ｃで３０分間インキュベートすることに

よってＰＣＲ産物に添加する。ＴＯＰＯクローニング反応および形質転換を製造者の説明書に従って設定する（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｋ４５７５０１）。Ｍ１３Ｆ（５’－ＧＴＡＡＡＡＣＧＡＣＧＧＣＣＡＧ－３’）およびＭ１３Ｒ（５’－ＣＡＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣ－３’）プライマーを使用して、ＲＣＡ／コロニーシーケンシングのためにコロニープレートを送る。配列結果を、ＳｎａｐＧｅｎｅソフトウェアを使用して分析した。

【０４０９】

ハイスループットシーケンシングデータ分析。シーケンシングされたアンプリコンを参照および予想ＨＤＲアンプリコンにアライメントすることによって、ＣＲＩＳＰＰＲｅｓｓｏ２を使用して編集結果を決定するために、処理された（逆多重化、トリミング、およびマージされた）リードを分析した。多様な編集結果をより良好に捕捉するために、予想される切断部位周囲の１０ｂｐまで定量ウィンドウを拡張させたが、シーケンシングエラーの包含を回避するために置換を無視した。予想されるアンプリコンとのミスマッチを含有しないリードのみをＨＤＲ定量のために検討し、予想されるアンプリコンと部分的に一致したインデルを含有するリードを、全般的な報告されたインデル頻度で含めた。計算作業は、ＳｔａｎｆｏｒｄのＤｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　ＧｅｎｅｔｉｃｓのＧｅｎｅｔｉｃｓ　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　Ｓｅｒｖｉｃｅ　Ｃｅｎｔｅｒ（ＧＢＳＣ）によってホストされたＳＣＧクラスタによって支援された。データ分析用にカスタマイズされた全てのスクリプトは、Ｃｏｎｇ　Ｌａｂの下でＧｉｔｈｕｂに寄託され、ダウンロード可能である。

【０４１０】

挿入部位マッピングおよび分析。出願人は、以前に開発され（ＧＩＳ－ｓｅｑ）、出願人の以前の研究における同様のプロトコルに従って、ｍＫａｔｅノックインのゲノム全体の偏りのないオフターゲット分析に適合させたプロセスを使用した。手短に言えば、出願人は、形質移入の３日後にＨＥＫ２９３Ｔ細胞を回収する。ゲノムＤＮＡは、ＤＮＡｄｖａｎｃｅゲノムＤＮＡキット（Ａ４８７０５、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）を介して、次のステップで鋳型混入を回避するようにサイズ選択した。４００ｎｇの精製ゲノムＤＮＡを、ＮＥＢ　Ｆｒａｇｍｅｎｔａｓｅを使用して平均５００ｂｐに断片化し、アダプターとライゲーションし、製造業者の指示に従ってＮＥＢＮｅｘｔ　Ｕｌｔｒａ　ＩＩ　ＦＳ　ＤＮＡ　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｐｒｅｐキットを使用してサイズ選択した。２回のネステッドアンカーＰＣＲに続いて、標的ＤＮＡ（ノックイン配列の末端からライゲーションされたアダプター配列まで）を増幅し、ＮＥＢＮｅｘｔ　Ｕｌｔｒａ　ＩＩ　ＦＳ　ＤＮＡライブラリーＰｒｅｐキットプロトコルに従ってサイズ選択精製を行う。ライブラリーを、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｍｉｓｅｑ　Ｖ３　ＰＥ６００キットを使用してシーケンシングした。シーケンシングデータを分析して、Ｇｉｔｈｕｂ（ｇｉｔｈｕｂ．ｃｏｍ／ｃｏｎｇ－ｌａｂ）に寄託された全ての分析コードを用いてオフターゲット挿入事象を決定した。

【０４１１】

統計分析。特に明記しない限り、全ての統計分析および比較はｔ検定を使用して、Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ、ＫｒｉｅｇｅｒおよびＹｅｋｕｔｉｅｌｉの２段階ステップアップ法を使用して１％の偽発見率（ＦＤＲ）で行った。全ての実験は、特に明記しない限り、分析において十分な統計力を確保するために３連で実施した。

【０４１２】

ＳＳＡＰマイニングプロセス。最初のＳＳＡＰスクリーニングのために、出願人は、バクテリオファージラムダ、大腸菌ＲａｃプロファージおよびバクテリオファージＴ７からのファージ組換え酵素の３つの主要なファミリーを同定し、補足配列に列挙されているように一次酵素配列を抽出した。

【０４１３】

ＲｅｃＴ様ＳＳＡＰマイニングについて。ＲｅｆＳｅｑ非冗長タンパク質データベースは、２０１９年１０月２９日にＮＣＢＩからダウンロードされた。出願人は、ＲｅｃＴホ

モログについてＮＣＢＩ非冗長配列データベースを体系的に検索した。出願人の調査は２つのガイドラインに従う：１）密接に関連する候補は異なる活性を有する可能性が低い；２）真核細胞において異種で発現される場合に良好に機能する微生物酵素を予測することが困難であるので、ＲｅｃＴホモログの多様な進化的分岐をサンプリングすることが理想的であろう。２，０７１個の候補の大きなセットを同定した後、出願人は系統樹を構築し、高い配列相同性を有するタンパク質を除外した後に代表的な候補を選択した。次いで、出願人は、少なくとも１０％の配列の相違および３００ａａまでのサイズの閾値を使用して（合成が困難であり移植性が低い非常に大きなタンパク質を回避するため）、ヒットを改良し、進化的分岐をランダムにサンプリングして１６個のＳＳＡＰの最終リストを得た（図３８Ｅ、図４４）。全体として、ＳＳＡＰ候補は、その生化学的活性にとって重要であることが以前に示唆された保存領域を保持しながら、著しい進化的および配列不均一性を有する。

【０４１４】

ＲｅｃＴホモログ間の多重配列アライメントは、オンラインツール（Ｔ－Ｃｏｆｆｅｅ：ｔｃｏｆｆｅｅ．ｃｒｇ．ｃａｔ／ａｐｐｓ／ｔｃｏｆｆｅｅ／ｄｏ：ｒｅｇｕｌａｒ）を使用した。

【０４１５】

Ｃａｓ９　ＨＤＲ、Ｃａｓ９　ＭＭＥＪおよびｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを比較するドナー設計試験。図３８Ｆに示すように、出願人は、異なるドナーＤＮＡ設計で新しいエディタを試験した。出願人は、異なる相同アーム（ＨＡ）長さ設計を有する３つの主要なタイプのドナーＤＮＡを検討した。具体的には、出願人は以下を合成した：１）長いＨＡ（＞＝１００ｂｐ）を有するＨＤＲドナー（長い配列操作および導入遺伝子ノックインのための標準フォーマット）；２）典型的に短いＨＡ（５０ｂｐ以下）を有するＭＭＥＪドナー（これは、ＤＳＢ媒介ノックインの編集効率を改善することが示されている）；３）ＨＡを含まないＮＨＥＪドナー（０ｂｐ）（これは、Ｃａｓ９誘導性ＤＳＢに起因するドナー組み込みのレベルを測定するのに役立ち得る）。これらの試験からの出願人の結果は、Ｃａｓ９遺伝子編集とは異なるｄＣａｓ９－ＳＳＡＰの２つの特徴を明らかにした。

【０４１６】

第１に、ＨＡを含まないＮＨＥＪドナー（図３８Ｆの強調表示されたボックス）について、出願人は、Ｃａｓ９エディタを使用した場合にノックインカセット発現を観察したが、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタについては観察しなかった（図３８Ｆ）。これは、Ｃａｓ９媒介ＤＳＢがＮＨＥＪ媒介ドナーＤＮＡ挿入を誘導し得るという以前の報告と一致するが、非切断ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを使用した場合、この組み込みは最小限である（図３８Ｆ、ＮＨＥＪ　０ｂｐドナーを有するｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ）。

【０４１７】

第２に、ＭＭＥＪドナーを使用した場合にノックイン効率の上昇を示したＣａｓ９エディタとは対照的に、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰは、ＨＡがＨＤＲ型であるかＭＭＥＪ型であるかにかかわらず、ドナー内の連続的により長いＨＡから利益を得た（図３８Ｆ、ＨＤＲおよびＭＭＥＪドナー）。これは、ＭＭＥＪドナーを使用する場合の増強効果が標的ゲノム部位のＣａｓ９切断に依存するという仮定と一致する。

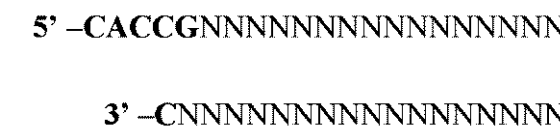
【０４１８】

さらに、この研究の焦点は長い配列の操作であるが、出願人はまた、より短い配列の編集についてｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを試験し（図４５）、ヒトＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＥＭＸ１遺伝子座への１６ｂｐ配列の正確なノックインを観察した。この実験により、本発明者らは、ディープシーケンシングを使用してＣａｓ９に基づくエディタと比較して、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを使用した場合の最小インデル形成を検証することができた（図４５Ｂ）。

【０４１９】

要約すると、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ編集は、ＨＤＲドナーを使用するときに最も効率的になり、一般に、より長い相同アームは編集効率をより高くする。

【０４２０】
ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰプラスミドを用いた段階的遺伝子編集プロトコル
Ａ．標的ゲノム遺伝子座におけるガイドＲＮＡ配列の設計
【０４２１】
このステップは、標準的なＣａｓ９実験と同じである。簡潔には、使用されるＣａｓ９酵素に基づいて、ノックインまたは編集部位の近くの標的配列（通常２０ｂｐ）をプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の隣で選択することができる。ＳｐＣａｓ９については「ＮＧＧ」を使用し、ＳａＣａｓ９については「ＮＮＧＲＲＴ」を使用する出願人は通常、ガイド配列の最初の塩基が「Ｇ」でない場合、Ｕ６／Ｐｏｌ－ＩＩＩ転写開始を促進するために、ガイド配列の先頭に追加の「Ｇ」塩基を付加する。以下に示すように、選択したガイドに基づき、ゴールデンゲートクローニングのオーバーハングを持つ２つのＤＮＡオリゴを注文することができる。
【化４０６】



Ｎはガイド配列を示す。このクローニングには標準的な脱塩オリゴで十分である。上記の２つのオリゴをアニーリングして、次のステップで挿入断片を形成する。
【０４２２】
Ｂ．各ガイドＲＮＡ標的に対する２つのＤＮＡオリゴのアニーリング。以下の反応設定により、オリゴの各ペアのリン酸化およびアニーリングを行う。
【表１４】

オリゴ1上部 (100uM)	1ul
オリゴ2底部 (100uM)	1ul
10X T4ライゲーション緩衝液(NEB)	1ul
ddH2O	6.5ul
T4 PNK (NEB)	0.5ul
合計	10ul

【０４２３】
以下のパラメータを使用するサーモサイクラーでのアニーリング：
３７Ｃ　３０分
９５Ｃ　５分間、次いで５Ｃ／分で２５Ｃまで下降
【０４２４】
Ｃ１．ｓｇＲＮＡ／ｄｓｐＣａｓ９（ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ）プラスミドへのアニール

したオリゴのＧｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ

【０４２５】

野生型Ｃａｓ９試験の場合、１つのガイドＲＮＡが必要であり、クローニングのための骨格ベクターは、ステップＢからのアニールされたオリゴと一致するＢｂｓＩクローニング部位を有する。このステップのための野生型Ｃａｓ９プラスミドは、ｐＣａｓ９－ＭＳ２－ＢＢ＿ＢｂｓＩである（プロトコルの最後のプラスミドのリストを参照）

【表１５】

品目	体積	注意
水	4.3 ul	
Cutsmart 緩衝液	0.8 ul	10x
T4リガーゼ	0.2 ul	
BbsI-HF	0.4 ul	
ATP (25mM)	0.3 ul	約最終1mM
プラスミド／ベクター	1 ul	約50ngの総プラスミド
アニーリングしたオリゴ（1：10希釈）	1 ul	10ulを100ulに希釈
合計	8 ul	

【０４２６】

このプロトコルは、最小量の酵素を使用し、必要に応じてスケールアップすることができる。ゴールデンゲート反応（氷上）を設定した後、直ちに反応をＴｈｅｒｍｏｃｙｃｌｅｒに移し、以下のパラメータを使用してゴールデンゲート反応を行う：

３７Ｃ　５分

１６Ｃ　５分

約２５サイクルのサイクル、最大５０回までの追加のサイクルを使用して効率を最大化することができる。

６５Ｃ　５分

４Ｃ　保持

【０４２７】

反応後、実験室で使用したコンピテント細胞の標準プロトコルに従って細菌形質転換を実施する。

【０４２８】

Ｃ２．ｓｇＲＮＡ／ｄｓｐＣａｓ９（ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ）プラスミドへのアニールしたオリゴのＧｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ

【０４２９】

ｄＳｐＣａｓ９を使用するｄＣａｓ９－ＳＳＡＰの場合、１つまたは２つのガイドＲＮＡを、わずかにより良好な編集効率を提供する二重ガイドＲＮＡと共に使用することができる。クローニングのための骨格ベクターは、ステップＢからのアニールされたオリゴと一致するＢｂｓＩクローニング部位を有する。このステップのためのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰプラスミドは、ｐｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ－ＭＳ２－ＢＢ＿ＢｂｓＩである（プロトコルの最後のプラスミドのリストを参照）。

【表１６】

品目	体積	注意
水	4.3 ul	最初に添加
Cutsmart 緩衝液	0.8 ul	10x
T4 リガーゼ	0.2 ul	
BbsI-HF	0.4 ul	
ATP (25mM)	0.3 ul	約最終1mM
dCas9-SSAP プラスミド／ベクター	1 ul	約50ngの総 p-dCas9-SSAP プラスミド
アニーリングしたオリゴ（1:10希釈）	1 ul	10ulを100ulに希釈
合計	8 ul	

【０４３０】
Ｇｏｌｄｅｎ　Ｇａｔｅ反応の設定および形質転換ステップは上記と同様である。
【０４３１】
Ｄ．ＨＤＲ鋳型の調製
【０４３２】
検討に用いたテンプレートの補足配列を参照し、鋳型設計の例を図３８に示す。出願人は、挿入／置換配列の各末端に少なくとも２００ｂｐの相同アーム（鋳型の編集部分）を有するｄｓＤＮＡ鋳型を使用することを推奨する。出願人は、鋳型をｐＵＣ１９などの単純なプラスミドにクローニングすることを提案し、次いで、大量のｄｓＤＮＡ鋳型を生成するために、プラスミドの制限消化または標準的なＰＣＲ（表９に列挙されるようなプライマーを使用する）を使用することができる。
【０４３３】
Ｅ．ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰプラスミドおよび鋳型ＤＮＡの送達を介して遺伝子編集を行う
【０４３４】
前のステップにより、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ編集方法の３つの構成成分：ガイドＲＮＡ／Ｃａｓ９プラスミド（ステップＡ～Ｃでクローニングされる）、鋳型ＤＮＡ（ステップＤ由来）、およびＳＳＡＰプラスミド（ｐＭＣＰ－ＲｅｃＴはＡｄｄｇｅｎｅから得ることができる）が、実験のために準備されている。インビトロでの細胞への送達のために、試薬または機器製造業者による推奨条件に従って日常的な形質移入またはエレクトロポレーションを実施し、細胞型に基づいて選択することができる。一例としてのＨＥＫ２９３Ｔ細胞について、典型的な形質移入条件を以下に記載する。
【０４３５】
１．形質移入の１日前に、３Ｅ４　ＨＥＫ２９３Ｔ／Ｈｅｌａ／ＨｅｐＧ２／Ｕ２ＯＳ細胞を９６ウェルプレートの各ウェルに播種し、翌日の形質移入時に細胞密度は約７０％になるはずである。
【０４３６】
２．形質移入試薬としてのリポフェクタミン３０００について、合計２５０ｎｇのＤＮＡ＋０．４ｕｌのＬｉｐ３０００試薬（ｅａ．）を使用し、製造業者のプロトコルのとおりに、ウェルあたり１０ｕｌのＯｐｔｉ－ＭＥＭを使用して試薬設定を行う。
【０４３７】
３．形質移入材料：
ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰガイドＲＮＡプラスミド、１６０ｎｇ（二重ｓｇＲＮＡｄ設計のために、等量の２つのガイドＲＮＡプラスミド、例えば各々８０ｎｇを使用する）；ｐＭＣＰ－ＲｅｃＴまたはＧＦＰ対照プラスミド、６０ｎｇ；

鋳型ＤＮＡ、最大３０ｎｇ。

【０４３８】

４．プラスミドを鋳型ＤＮＡと混合し、ＨＥＫ２９３Ｔ／Ｈｅｌａ／ＨｅｐＧ２／Ｕ２ＯＳ細胞についての製造者のプロトコルに従って形質移入を行う。

【０４３９】

５．形質移入の１２～２４時間後、該当する場合、新鮮な培地に切り替えることができる。

【０４４０】

６．形質移入の少なくとも３日後、細胞を回収するか、または必要に応じて下流の実験もしくは分析に進めることができる。

【表１７】

プラスミドのリスト（プラスミドIDを介してAddgeneで入手可能）	
プラスミドID	詳細な説明
SpCas9 プラスミド	
pCas9-MS2-BB_BbsI	pU6-MS2-gRNA-backbone(BbsI)-CBH-SpCas9-T2A-EBFP
pMCP-RecT	pLenti-EF1A-MCP-EXTEN-RecT-NLS
dCas9-SSAP プラスミド	
p-dCas9-SSAP-MS2-BB_BbsI	pU6-MS2-gRNA-backbone(BbsI)-CBH-dSpCas9-T2A-EBFP
pMCP-RecT	上記と同様
dsaCas9-SSAP プラスミド	
p-dSaCas9-SSAP-boxB-BB_BsaI	pU1aN22-miniRecT-p2A-dSaCas9
p-dSa-SSAP-鋳型	pU6-boxB-BB-H1-boxB-BB-Right HA-mKate-Left HA

【０４４１】

ｇＲＮＡの配列を表８に示す。ガイドＲＮＡ名のアノテーションは、ｓｐで始まるガイドはＳｐＣａｓ９ガイドＲＮＡ標的を示し、ｄｓｐで始まるガイドはｄＳｐＣａｓ９ガイドＲＮＡ標的を示す。

【表８－１】

表 8. gRNAの配列		
ガイドRNA名	ゲノム標的	ガイド配列
sp-DYNLT1	*DYNLT1*	AAGGCCATAGGCTGGACTGC (配列番号 23)
sp-HSP90AA1	*HSP90AA1*	GTAGACTAATCTCTGGCTGA (配列番号 24)
sp-ACTB	*ACTB*	CCACCGCAAATGCTTCTAGG (配列番号 492)
dsp-DYNLT1-ガイド1	*DYNLT1*	AAGGCCATAGGCTGGACTGC (配列番号 29)
dsp-DYNLT1-ガイド2	*DYNLT1*	GGCACTGACGATGCAGTACA (配列番号 30)
dsp-HSP90AA1-ガイド1	*HSP90AA1*	GTAGACTAATCTCTGGCTGA (配列番号 31)
dsp-HSP90AA1-ガイド2	*HSP90AA1*	TCGTCATCTCCTTCAAGGGG (配列番号 32)
dsp-OCT4-ガイド1	*OCT4*	ATGCATGGGAGAGCCCAGAG (配列番号 33)
dsp-OCT4-ガイド2	*OCT4*	GCCTGCCCTTCTAGGAATGG (配列番号 34)
dsp-ACTB-ガイド1	*ACTB*	CCACCGCAAATGCTTCTAGG (配列番号 492)
dsp-ACTB-ガイド2	*ACTB*	GCTTGCTGATCCACATCTGC (配列番号 493)
dSa-HSP90AA1-ガイド1	*HSP90AA1*	AGTAGACTAATCTCTGGCTG (配列番号 494)
dSa-HSP90AA1-ガイド2	*HSP90AA1*	GATGTGTCGTCATCTCCTTCA (配列番号 495)
dSa-AAVS1-ガイド1	*AAVS1*	CACAGTGGGGCCACTAGGGA (配列番号 496)
dSa-AAVS1-ガイド2	*AAVS1*	GAGCCACATTAACCGGCCCT (配列番号 497)
dSp-CLTA-ガイド1	*CLTA*	CGGATCCAGCTCAGCCATGG (配列番号 498)

【表８－２】

dSp-CLTA-ガイド2	*CLTA*	GGCGGTCCCGCGCTGGGGAA (配列番号 499)
dSp-RAB11A-ガイド	*RAB11A*	GGTAGTCGTACTCGTCGTCG (配列番号500)
dSp-HIST1H2BK-ガイド1	*HIST1H2BK*	TGGGCTTTAAGACGCTTACT (配列番号 501)
dSp-HIST1H2BK-ガイド2	*HIST1H2BK*	TAAACACGTGTTCCTAATCC (配列番号 502)
dSp-BCAP31-ガイド1	*BCAP31*	TGGACAAGAAGGAAGAGTAA (配列番号 503)
dSp-BCAP31-ガイド2	*BCAP31*	GACAGAAATCCCACAGCAGT (配列番号 504)

【０４４２】

表９はプライマー配列を提供する。

【０４４３】

ＤＮＡ鋳型生成、標的化シーケンシング、およびＮＧＳアッセイに使用されるプライマーの配列を以下に列挙する。全てのＮＧＳアダプター配列が下線付きの色で示されている。

【表９－１】

表 9. プライマー配列

プライマー名	利用用途	ゲノム標的	プライマー配列
RecT-18aa-F	短縮化	*RecT*	AATAGAGCCCCTGCTGCTGTGAAG (配列番号 505)
RecT-45aa-F	短縮化	*RecT*	GCCCTGCCTCGCCACATGA (配列番号 506)
RecT-73aa-F	短縮化	*RecT*	GATACCATGTCTTTCGTGAGCGCC (配列番号 507)
RecT-93aa-F	短縮化	*RecT*	AGTGCCCTGGGCCACGC (配列番号 508)
RecT-251aa-R	短縮化	*RecT*	AGGGTCGATGGTCAGGGGC (配列番号 509)
RecT-264aa-R	短縮化	*RecT*	AATCACAGAGTACTCGCCGGTCAG (配列番号 510)
DYNLT1-PCR-100bp-F	PCR 鋳型	*DYNLT1*	TGCCGTAAATGCTGCTCTCT (配列番号 39)

【表９－２】

DYNLT1-PCR-200bp-F	PCR鋳型	*DYNLT1*	AGACTTGCCAAGGTTCTTTGTG (配列番号 40)
DYNLT1-PCR-400bp-F	PCR鋳型	*DYNLT1*	AGTGACCTGTGTAATTATGCAGAAG (配列番号 41)
DYNLT1-PCR-100bp-R	PCR鋳型	*DYNLT1*	TGAAAGTGCCACAAAACAAAGAGA (配列番号 42)
DYNLT1-PCR-200bp-R	PCR鋳型	*DYNLT1*	AAGACAAGTGGCAACGCAG (配列番号 43)
DYNLT1-PCR-400bp-R	PCR鋳型	*DYNLT1*	CGTTTATGATACTATGCAGACTATGAAGAAC (配列番号 511)
DYNLT1-PCR-50-F	PCR鋳型	*DYNLT1*	GGAGAATAAGACCATGTACTGC (配列番号 512)
DYNLT1-PCR-50-R	PCR鋳型	*DYNLT1*	GAGGATGAACTAGAGACAAAAGG (配列番号 513)
DYNLT1-PCR-25-F	PCR鋳型	*DYNLT1*	TCAGTGCCTTCGGACTG (配列番号 514)
DYNLT1-PCR-25-R	PCR鋳型	*DYNLT1*	AAAGGCCATAGGCAGGAC (配列番号 515)
DYNLT1-PCR-10-F	PCR鋳型	*DYNLT1*	ACTGTCTATTGGAAGCGGA (配列番号 516)
DYNLT1-PCR-10-R	PCR鋳型	*DYNLT1*	GGACAGCTGGTTAGGAATTAAG (配列番号 517)
mKate-PCR-0-F	PCR鋳型	*DYNLT1*	GGAAGCGGAGCTACTAACTT (配列番号 518)
mKate-PCR-0-R	PCR鋳型	*DYNLT1*	TTAGGAATTAAGTTTGTGCCCC (配列番号 519)
HSP90AA1-PCR-100bp-F	PCR鋳型	*HSP90AA1*	ATGAAGATGACCCTACTGCTGAT (配列番号 45)
HSP90AA1-PCR-200bp-F	PCR鋳型	*HSP90AA1*	TACTGTCTTGAAAGCAGATAGAAACC (配列番号 46)
HSP90AA1-PCR-600bp-F	PCR鋳型	*HSP90AA1*	GCAGCAAAGAAACACCTGGA (配列番号 47)
HSP90AA1-PCR-100bp-R	PCR鋳型	*HSP90AA1*	GTTGTCATGCCATACAGACTTTTT (配列番号 48)

【表９－３】

HSP90AA1-PCR-200bp-R	PCR鋳型	*HSP90AA1*	AGCATTACTAGCTCTGCTTTAGTG (配列番号 49)
HSP90AA1-PCR-600bp-R	PCR鋳型	*HSP90AA1*	TCCACAAGACTGGGTCTGAG (配列番号 50)
HSP90AA1-PCR-50bp-F	PCR鋳型	*HSP90AA1*	AAATGCCACCCCTTGAAGG (配列番号 520)
HSP90AA1-PCR-50bp-R	PCR鋳型	*HSP90AA1*	ATCAGAGGAATTGTAGAGTACTGA (配列番号 521)
HSP90AA1-PCR-25bp-F	PCR鋳型	*HSP90AA1*	ACACATCACGCATGGAAGA (配列番号 522)
HSP90AA1-PCR-25bp-R	PCR鋳型	*HSP90AA1*	GGTAAGTCATCCCTCAGCC (配列番号 523)
HSP90AA1-PCR-10bp-F	PCR鋳型	*HSP90AA1*	AGAAGTAGACGGAAGCGG (配列番号 524)
HSP90AA1-PCR-10bp-F	PCR鋳型	*HSP90AA1*	AGCCACAGATTTAGGAATTAAGTTT (配列番号 525)
OCT4-PCR-F	PCR鋳型	*OCT4*	GCGACTATGCACAACGAGAGG (配列番号 51)
OCT4-PCR-R	PCR鋳型	*OCT4*	AAGTGTGTCTATCTACTGTGTCCCAG (配列番号 52)
ACTB-PCR-F	PCR鋳型	*ACTB*	TGTGGTGTGTGGGGAGCT (配列番号 526)
ACTB-PCR-R	PCR鋳型	*ACTB*	TTACACGAAAGCAATGCTATCACCTC (配列番号 527)
DYNLT1 KI PCR-F	ジャンクションPCR	*DYNLT1*	AGGAGGTCCCATCAGATGCT (配列番号 59)
HSP90AA1 KI PCR-F	ジャンクションPCR	*HSP90AA1*	GGCTGGACAGCAAACATGGA (配列番号 60)
ジャンクションPCRユニバーサル-R	ジャンクションPCR	*mKate*	TTGCTGCCGTACATGAAGCTG (配列番号 62)
EMX1-NGS-F	NGS	*EMX1*	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCAGAAGAAGGGCTCCCATCAC (配列番号 528)

【表９－４】

EMX1-NGS-R	NGS	*EMX1*	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGAGCA GCAAGCAGCACTCTG (配列番号 529)
ジャンクション NGS-5' 共通-R	ジャンクション NGS	*mKate*	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGTACA GCTTCATGTGCATGT (配列番号 530)
ジャンクション NGS-3' 共通-F	ジャンクション NGS	*mKate*	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAGGCC GACAAAGAGACA (配列番号 531)
DYNLT1-ジャンクション NGS-5'-F	ジャンクション NGS	*DYNLT1-mKate*	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGTAAAT GCTGCTCTCTTCCC (配列番号 532)
DYNLT1-ジャンクション NGS-3'-R	ジャンクション NGS	*DYNLT1-mKate*	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGTTGTG AAAGTGCCACAAAACA (配列番号 533)
HSP90AA1-ジャンクション NGS-5'-F	ジャンクション NGS	*HSP90AA1-mKate*	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCCTACTG CTGATGATACCAGTG (配列番号 534)
HSP90AA1-ジャンクション NGS-3'-R	ジャンクション NGS	*HSP90AA1-mKate*	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGTTGT CATGCCATACAGACT (配列番号 535)
ACTB-TA-F	TA colony	*ACTB*	AGTCCTGTGGCATCCACGAA (配列番号 536)
ACTB-TA-R	TA colony	*ACTB*	GGCACGAAGGCTCATCATTCAA (配列番号 537)
HSP90AA1-TA-F	TA colony	*HSP90AA1*	AGACACATGCTAACAGGATCTA (配列番号 538)
HSP90AA1-TA-R	TA colony	*HSP90AA1*	ATGCAGAATTGTCAACTACAGG (配列番号 539)
HIST1H2BK-PCR-F	PCR 鋳型	*HIST1H2BK*	AGGCCATGGGAATCATGAAC (配列番号 540)
HIST1H2BK-PCR-R	PCR 鋳型	*HIST1H2BK*	CTCACGTTAGAACGCCATTACA (配列番号 541)
BCAP31-PCR-F	PCR 鋳型	*BCAP31*	AGGCCTTTGGGTGCAGCTG (配列番号 542)
BCAP31-PCR-R	PCR 鋳型	*BCAP31*	CAGTCCACCTGCTCCACCC (配列番号 543)

【表９－５】

CLTA-PCR-F	PCR 鋳型	*CLTA*	GGGTAGCTCCTGAACCATTGT (配列番号 544)
CLTA-PCR-F	PCR 鋳型	*CLTA*	CCAGAAGCACTCAAACATGCTG (配列番号 545)
RAB11A-PCR-F	PCR 鋳型	*RAB11A*	CTGCCGGAAATGGCGCAG (配列番号 546)
RAB11A-PCR-R	PCR 鋳型	*RAB11A*	GTAGGAGACGGAACCGCACAA (配列番号 547)

【０４４４】

表１０は、この実施例で試験したＳＳＡＰの配列を示す。

【表１０－１】

表10 - SSAP 配列	
SSAP	アミノ酸配列
ラムダ bet (配列番号166)	MSTALATLAGKLAERVGMDSVDPQELITTLRQTAFKGDASDAQFIALLI VANQYGLNPWTKEIYAFPDKQNGIVPVVGVDGWSRIINENQQFDGMDF EQDNESCTCRIYRKDRNHPICVTEWMDECRREPFKTREGREITGPWQSH PKRMLRHKAMIQCARLAFGFAGIYDKDEAERIVENTAYTAERQPERDIT PVNDETMQEINTLLIALDKTWDDDLLPLCSQIFRRDIRASSELTQAEAVK ALGFLKQKAAEQKVAA
Rac RecT (配列番号167)	MTKQPPIAKADLQKTQGNRAPAAVKNSDVISFINQPSMKEQLAAALPRH MTAERMIRIATTEIRKVPALGNCDTMSFVSAIVQCSQLGLEPGSALGHAY LLPFGNKNEKSGKKNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIASLSARVVREGDEFS FEFGLDEKLIHRPGENEDAPVTHVYAVARLKDGGTQFEVMTRKQIELVR SLSKAGNNGPWVTHWEEMAKKTAIRRLFKYLPVSIEIQRAVSMDEKEPL TIDPADSSVLTGEYSVIDNSEE
T7 gp2.5 (配列番号168)	MAKKIFTSALGTAEPYAYIAKPDYGNEERGFGNPRGVYKVDLTIPNKDP RCQRMVDEIVKCHEEAYAAAVEEYEANPPAVARGKKPLKPYEGDMPFF DNGDGTTTFKFKCYASFQDKKTKETKHINLVVVDSKGKKMEDVPIIGGG SKLKVKYSLVPYKWNTAVGASVKLQLESVMLVELATFGGGEDDWADE VEENGYVASGSAKASKPRDEESWDEDDEESEEADEDGDF
CspRecT (配列番号169)	MNQIVKFTDDSGLAVQVTPDDVRRYICENATEKEVGLFLQLCQTQRLNP FVKDAYLVKYGGAPASMITSYQVFNRRACRDANYDGIKSGVVVLRDGD VVHKRGAACYKKAGEELIGGWAEVRFKDGRETAYAEVALDDYSTGKS NWAKMPGVMIEKCAKAAAWRLAFPDTFQGMYAAEEMDQAQQPEQVR AQAEQPVDLQPIRELFKPYCEHFGITPAEGMTAVCGAVGAEGMHSMTE QQARRARAWMEEEMAAPAVEAEYEVVDEGEVF

【表１０－２】

PapRecT (配列番号170)	MGTALTPLLTKFATRYEMGTTPEEVANTLKQTCFKGQVNDSQMVALLI VADQYKLNPFTKELYAFPDKNNGIVPVVGVDGWARIINENPQFDGMEFS MDQQGTECTCKIYRKDRSHAISATEYMAECKRNTQPWQSHPRRMLRHK AMIQCARLAFGFAGIYDQDEAERIVERDVTPAEQYEDVSEAICLIKDSPT MEDLQAAFSNAWKAYKTKGARDQLTAAKDQRKKELLDAPIDVEFEET GDDRAA
EcRecT (配列番号171)	MTKQPPIAKADLQKTQGNRAPAAIKNNDVISFINQPSMKEQLAAALPRH MTAERMIRIATTEIRKVPALGNCDTMSFVSAIVQCSQLGLEPGSALGHAY LLPFGNKNEKSGKKNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIASLSARVVREGDEFN FEFGLDEKLIHRPGENEDAPVTHVYAVARLKDGGTQFEVMTRKQIELVR SQSKAGNNGPWVTHWEEMAKKTAIRRLFKYLPVSIEIQRAVSMDEKEPL TIDPADSSVLTGEYSVIDNSEE
PasRecT (配列番号115)	MSNQPPIASADLQKANTGKQVANKTPEQTLVGFMNQPAMKSQLAAALP RHMTADRMIRIVTTEIRKTPALATCDQSSFIGAVVQCSQLGLEPGSALGH AYLLPFGNGRSKSGQSNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIVSLSARVVRADDE FSFEYGLDENLIHRPGENEDAPITHVYAVARLKDGGTQFEVMTVKQIEK VKAQSKASSNGPWVTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQKAVILDEK AESDVDQDNASVLSAEYSVLDGSSEE
SeRecT (配列番号131)	MTKQPPIAKADLQKTQENRAPAAIKNNDVISFINQPSMKEQLAAALPRH MTAERMIRIATTEIRKVPALGNCDTMSFVSAIVQCSQLGLEPGSALGHAY LLPFGNKNEKSGKKNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIASLSARVVREGDEFN FEFGLDEKLIHRPGENEDAPVTHVYAVARLKDGGTQFEVMTRRQIELVR SQSKAGNNGPWVTHWEEMAKKTAIRRLFKYLPVSIEIQRAVSMDEKEPL TIDPADSSVLTGEYSVIDNSEE
AcRecT (配列番号133)	MTKQPPIAKADLQKTQGNRAPAAVNDKDVLCVINSPAMKAQLAAALPR HMTAERMIRIATTEIRKVPELRNCDSTSFIGAIVQCSQLGLEPGSALGHAY LLPFGNGKAKNGKKNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIISLSARVVRECDEFS YELGLDEKLVHRPGENEDAPITHVYAVAKLKDGGVQFEVMTKKQVEK VRDTHSKAAKNAASKGASSIWDEHFEDMAKKTVIRKLFKYLPVSIEIQR AVSMDGKEVETINPDDISVIAGEYSVIDNPEE
SejRecT (配列番号135)	MNAPQKQNTRAAVKKISPQEFAEQFAAIIPQVKSVLPAHVTFEKFERVV RLAVRKNPDLLTCSPASLFMACIQAASDGLLPDGREGAIVSRWSSKKSC NEASWMPMVAGLMKLARNSGDIASISSQVVFEGEHFRVVLGDEERIEHE RDLGKTGGKIVAAYAVARLKDGSDPIREIMSWGQIEKIRNTNKKWEWG PWKAWEDEMARKTVIRRLAKRLPMSTDKEGERLRSAIERIDSLVDISAN VDAPQIAADDEFAAAAHGVEPQQIAAPDLIGRLAQMQSLEQVQDIEPQV SHAIQEADKRGDSDTANALDAALQSALSRTSTAKEEVPA

【表１０－３】

PsaRecT (配列番号137)	MPKQPPIAKADLQKTQGARTPTAVKNNNDVISFINQPSMKEQLAAALPR HMTAERMIRIATTEIRKVPALGDCDTMSFVSAIVQCSQLGLEPGGALGH AYLLPFGNRNEKSGKKNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIASLSARVVREGD DFSFEFGLEEKLVHRPGENEDAPVTHVYAVARLKDGGTQFEVMTRKQIE LVRAQSKAGNNGPWVTHWEEMAKKTAIRRLFKYLPVSIEIQRAVSMDE KETLTIDPADASVITGEYSVVENAGVEENVTA
PhRecT (配列番号139)	MGHLVSKTEQDYIKQHYAKGATDQEFEHFIGVCRARGLNPAANQIYFV KYRSKDGPAKPAFILSIDSLRLIAHRTGDYAGCSEPIFTDGGKACTVTVR RNLKSGETGNFSGMAFYDEQVQQKNGRPTSFWQSKPRTMLEKCAEAK ALRKAFPQDLGQFYIREEMPPQYDEPIQVHKPKALEEPRFSKSDLSRRKG LNRKLSALGVDPSRFDEVATFLDGTPDRELGQKLKLWLKEAGYGVNQ
PraRecT (配列番号141)	MNTDMIAMPPSPAISMLDTSKLDVMVRAAELMSQAVVMVPDHFKGKP ADCLAVVMQADQWGMNPFTVAQKTHLVSGTLGYESQLVNAVISSSKAI KGRFHYEWSDGWERLAGKVQYVKESRQRKGQQGSYQVTVAKPTWKP EDEQGLWVRCGAVLAGEKDITWGPKLYLASVLVRNSELWTTKPYQQA AYTALKDWSRLYTPAVMQGSMTGKSWSLTGRLISPR
PabRecT (配列番号117)	MSNQPPIASADLQKTQQSKQVANKTPEQTLVGFMNQPAMKSQLAAALP RHMTADRMIRIVTTEIRKTPQLAQCDQSSFIGAVVQCSQLGLEPGSALGH AYLLPFGNGRSKSGQSNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIVSLSARVVRADDE FSFEYGLDENLVHRPGENEDAPITHVYAVARLKDGGTQFEVMTVKQVE KVKAQSKASSNGPWVTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQKAVVLDE KAESDVDQDNASVLSAEYSVLESGDEATN
PadRecT (配列番号119)	MSNQPPLATADLQKTQQSNQVAKTPEQTLVGFMNQPAMKSQLAAALP RHMTADRMIRIVTTEIRKTPALAQCDQSSFIGAVVQCSQLGLEPGSALGH AYLLPFGNGRSKSGQSNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIVSLSARVVRADDE FSFEYGLDENLIHRPGDNESAPITHVYAVARLKDGGTQFEVMTAKQVEK VKAQSKASSNGPWVTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQKAVVLDEK AESDVDQDNASVLSAEYSVLESGTGE
PlsRecT (配列番号121)	MSNQPPIASADLQKTQQSKQVANKTPEQTLVGFMNQPAMKSQLAAALP RHMTADRMIRIVTTEIRKTPALATCDQSSFIGAVVQCSQLGLEPGSALGH AYLLPFGNGRSKSGQSNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIVSLSARVVRADDE FSFEYGLDENLIHRPGDNEDAPITHVYAVARLKDGGTQFEVMTAKQVEK VKAQSKASSNGPWVTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQKAVVLDEK AESDVDQDNASVLSAEYSVLEGDGGE
PrsRecT (配列番号123)	MSNPPLAQADLQKTQGTEVKEKTKDQMLVELINKPSMKAQLAAALPRH MTPDRMIRIVTTEIRKTPALATCDMQSFVGAVVQCSQLGLEPGNALGHA YLLPFGNGKSKSGQSNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIVSISARTVRQGDNF HFEYGLNENLTHVPGENEDSPITHVYAVARLKDGGVQFEVMTYNQIEK VRASSKAGQNGPWVSHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQKAVILDEK AEANIDQENATIFEGEYEEVGTDGK

【表１０－４】

PrRecT (配列番号125)	MSNPPLAQSDLQKTQGTEVKVKTKDQQLIQFINQPSMKAQLAAALPRH MTPDRMIRIVTTEIRKTPALATCDMQSFVGAVVQCSQLGLEPGNALGHA YLLPFGNGKAKSGQSNVQLIIGYRGMIDLARRSNQIISISARTVRQGDNF HFEYGLNEDLTHTPSENEDSPITHVYAVARLKDGGVQFEVMTYNQVEK VRASSKAGQNGPWVSHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQKAVVLDEK AEANVDQENATIFEGEYEEVGTDGN
ShpRecT (配列番号143)	MKAQLAAALPKHITSDRMIRIVSTEIRKTPSLANCDIQSFIGAVVQCSQLG LEPGNALGHAYLLPFGNGKSDNGKSNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIISISA RTVRQGDNFHFEYGLNENLTHIPEGNEDSPITHVYAVARLKDEGVQFEV MTYNQIEKVRDSSKAGKNGPWVTHWEEMAKKTVIRRLFKYLPVSIEMQ KAVILDEKAEANIEQDHSAIFEAEFEEVDSNGN
BaRecT (配列番号127)	MQTAQVKLSVPHQQVYQDNFNYLSSQVVGHLVDLNEEIGYLNQIVFNS LSTASPLDVAAPWSVYGLLLNVCRLGLSLNPEKKLAYVMPSWSETGEII MKLYPGYRGEIAIASNFNVIKNANAVLVYENDHFRIQAATGEIEHFVTSL SIDPRVRGACSGGYCRSVLMDNTIQISYLSIEEMNAIAQNQIEANMGNTP WNSIWRTEMNRVALYRRAAKDWRQLIKATPEIQSALSDTEY
ShsRecT (配列番号129)	MSKQLTTVNTQAVVGTFSQAELDTLKQTIAKGTTNEQFALFVQTCANSR LNPFLNHIHCIVYNGKEGATMSLQIAVEGILYLARKTDGYKGIECQLIHE NDEFKFDAKSKEVDHQIGFPRGNVIGGYAIAKREGFDDVVVLMESNEVD HMLKGRNGHMWRDWFNDMFKKHIMKRAAKLQYGIEIAEDETVSSGPS VDNIPEYKPQPRKDITPNQDVIDAPPQQPKQDDEAAKLKAARSEVSKKF KKLGIVKEDQTEYVEKHVPGFKGTLSDFIGLSQLLDLNIEAQEAQSADG DLLD

【０４４５】

鋳型ＤＮＡ配列

置換されたまたは挿入された編集配列のアノテーションは、各鋳型と共に以下に詳述される。特に明記しない限り、異なる相同アームを実施例で使用する場合、出願人は異なる相同アーム長を有する鋳型を得るために表９に列挙されたプライマーを使用した。

ＤＹＮＬＴ１　Ｐ２Ａ－ｍＫａｔｅノックインＨＤＲ鋳型配列（配列番号５４８）

左相同アーム－挿入配列－右相同アーム

（下線が引かれているのは、挿入されたｍＫａｔｅ蛍光タンパク質配列であり、先行する下線が引かれていない部分は、Ｐ２Ａペプチド配列である）

【化４０７－１】

AGTGACCTGTGTAATTATGCAGAAGAATGGAGCTGGATTACACACAGCAAGTTCCT
GCTTCTGGGACAGCTCTACTGACGGTATGATTTTCATTCATGTTTGTGAAGTTTTGT
TGTGTGAAATATATGACTGGAAGTTTCCTATCTTTGAATGCAATGCATGTTTATCAC
CTTTTAAAACATTTAATAATAGACTTGCCAAGGTTCTTTGTGTAGCATAGAGATGGG
TACTTGAATGTTGGCCTTATTGTGAGTAAAACGTCGTCCCCCAGCTTTCCCTGCCG

【化４０７－２】

TAAATGCTGCTCTCTTCCCTCCCGCAGGGAGCTGCACTGTGCGATGGGAGAATAA
GACCATGTACTGCATCGTCAGTGCCTTCGGACTGTCTATTGGAAGCGGAGCTACTA
ACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTGCCA
CCGTGAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCAC
CGTGAACAACCACCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAG
GGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGCCGTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCC
TTCGACATCCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGCAGCAAAACCTTCATCAACCACAC
CCAGGGCATCCCCGACTTCTTTAAGCAGTCCTTCCCCGAGGGCTTCACATGGGAG
AGAGTCACCACATACGAAGATGGGGGCGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCAGC
CTCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACTTCCCAT
CCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGA
CACTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAGCCGACATGGCCCTGAAGC
TCGTGGGCGGGGGCCACCTGATCTGCAACCTTAAGACCACATACAGATCCAAGAA
ACCCGCTAAGAACCTCAAGATGCCCGGCGTCTACTATGTGGACAGGAGACTGGAA
AGAATCAAGGAGGCCGACAAAGAGACATACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCTGTG
GCCAGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACTGGGGCACAAACTTAATTCCTAACCAGC
TGTCCtGCCTATGGCCTTTCTCCTTTTGTCTCTAGTTCATCCTCTAACCACCAGCCA
TGAATTCAGTGAACTCTTTTCTCATTCTCTTTGTTTTGTGGCACTTTCACAATGTAGA
GGAAAAAACCAAATGACCGCACTGTGATGTGAATGGCACCGAAGTCAGATGAGTA
TCCCTGTAGGTCACCTGCAGCCTGCGTTGCCACTTGTCTTAACTCTGAATATTTCAT
TTCAAAGGTGCTAAAATCTGAAATCTGCTAGTGTGAAACTTGCTCTACTCTCTGAAA
TGATTCAAATACACTAATTTTCCATACTTTATACTTTTGTTAGAATAAATTATTCAAAT
CTAAAGTCTGTTGTGTTCTTCATAGTCTGCATAGTATCATAAACG

ＨＳＰ９０ＡＡ１　Ｐ２Ａ－ｍＫａｔｅノックインＨＤＲ鋳型配列（配列番号５４９）
左相同アーム－挿入配列－右相同アーム
（下線が引かれているのは、挿入されたｍＫａｔｅ蛍光タンパク質配列であり、先行する下線が引かれていない部分は、Ｐ２Ａペプチド配列である）

【化４０８－１】

GCAGCAAAGAAACACCTGGAGATAAACCCTGACCATTCCATTATTGAGACCTTAAG
GCAAAAGGCAGAGGCTGATAAGAACGACAAGTCTGTGAAGGATCTGGTCATCTTG
CTTTATGAAACTGCGCTCCTGTCTTCTGGCTTCAGTCTGGAAGATCCCCAGACACA
TGCTAACAGGATCTACAGGATGATCAAACTTGGTCTGGGTAAGCCTTATACTATGT
AATGTTAAAAAGAAAATAAACACACGTGACATTGAAGAAAATGGTGAACTTTCAGTT
ATCCAAACTTGGAGCACCTTGTCCTGCTTGCTGCTTGGAGGTATTAAAGTATGTTTT
TTTTAGGGATAAGTAAGGTCTTACAAGAGCAAAGAAATGAAATTGAGACTCATATGT
CCTGTAATACTGTCTTGAAAGCAGATAGAAACCAAGAGTATTACCCTAATAGCTGG
CTTTAAGAAATCTTTGTAATATGAGGATTTTATTTTGGAAACAGGTATTGATGAAGAT
GACCCTACTGCTGATGATACCAGTGCTGCTGTAACTGAAGAAATGCCACCCCTTGA
AGGAGATGACGACACATCACGCATGGAAGAAGTAGACGGAAGCGGAGCTACTAAC
TTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTGTGAGC
GAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTGAACA
ACCACCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCC
AGACCATGAGAATCAAGGCGGTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGACAT
CCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGCAGCAAAACCTTCATCAACCACACCGAGGGC

【化４０８－２】

ATCCCCGACTTCTTTAAGCAGTCCTTCCCCGAGGGCTTCACATGGGAGAGAGTCA
CCACATACGAAGATGGGGGCGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTCCAGG
ACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACTTCCCATCCAACGG
CCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGACACTGTAC
CCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAGCCGACATGGCCCTGAAGCTCGTGGG
CGGGGGCCACCTGATCTGCAACCTTAAGACCACATACAGATCCAAGAAACCCGCT
AAGAACCTCAAGATGCCCGGCGTCTACTATGTGGACAGGAGACTGGAAAGAATCA
AGGAGGCCGACAAAGAGACATACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCTGTGGCCAGAT
ACTGCGACCTCCCTAGCAAACTGGGGCACAAACTTAATTCCTAAATCTGTGGCTGA
GGGATGACTTACCTGTTCAGTACTCTACAATTCCTCTGATAATATATTTTCAAGGAT
GTTTTTCTTTATTTTTGTTAATATTAAAAAGTCTGTATGGCATGACAACTACTTTAAG
GGGAAGATAAGATTTCTGTCTACTAAGTGATGCTGTGATACCTTAGGCACTAAAGC
AGAGCTAGTAATGCTTTTTGAGTTTCATGTTGGTTTATTTTCACAGATTGGGGTAAC
GTGCACTGTAAGACGTATGTAACATGATGTTAACTTTGTGGTCTAAAGTGTTTAGCT
GTCAAGCCGGATGCCTAAGTAGACCAAATCTTGTTATTGAAGTGTTCTGAGCTGTA
TCTTGATGTTTAGAAAAGTATTCGTTACATCTTGTAGGATCTACTTTTTGAACTTTTC
ATTCCCTGTAGTTGACAATTCTGCATGTACTAGTCCTCTAGAAATAGGTTAAACTGA
AGCAACTTGATGGAAGGATCTCTCCACAGGGCTTGTTTTCCAAAGAAAAGTATTGT
TTGGAGGAGCAAAGTTAAAAGCCTACCTAAGCATATCGTAAAGCTGTTCAAAAATA
ACTCAGACCCAGTCTTGTGGA

ＡＡＶＳ１　Ｐ２Ａ－ｍＫａｔｅノックインＨＤＲ鋳型配列（配列番号５５０）

左相同アーム－挿入配列－右相同アーム

（下線が引かれているのは、挿入されたｍＫａｔｅ蛍光タンパク質配列であり、先行する下線が引かれていない部分は、Ｐ２Ａペプチド配列である）

【化４０９－１】

GATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATGTCCTCTGA
GCGGATCCTCCCCGTGTCTGGGTCCTCTCCGGGCATCTCTCCTCCCTCACCCAAC
CCCATGCCGTCTTCACTCGCTGGGTTCCCTTTTCCTTCTCCTTCTGGGGCCTGTGC
CATCTCTCGTTTCTTAGGATGGCCTTCTCCGACGGATGTCTCCCTTGCGTCCCGCC
TCCCCTTCTTGTAGGCCTGCATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCC
CGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCATCCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCC
CGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTCATTTGGGCAGCTCCCCTA
CCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCATGGCATCTT
CCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCC
ACTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGAC
CACCTTATATTCCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTG
TCCCCTCCACCCCACAGTGGGGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGG
GCCTCGAGAGATCTGGCAGCGGAGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAA
GCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTGTGAGCGAGCTGATTAAGGA
GAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTGAACAACCACCACTTCAAG
TGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATC
AAGGCGGTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACCAGCT
TCATGTACGGCAGCAAAACCTTCATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTT
AAGCAGTCCTTCCCCGAGGGCTTCACATGGGAGAGAGTCACCACATACGAAGATG
GGGGCGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTCCAGGACGGCTGCCTCATCT

【化４０９－２】

ACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACTTCCCATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAA
GAAAACACTCGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGACACTGTACCCCGCTGACGGCGG
CCTGGAAGGCAGAGCCGACATGGCCCTGAAGCTCGTGGGCGGGGGCCACCTGAT
CTGCAACCTTAAGACCACATACAGATCCAAGAAACCCGCTAAGAACCTCAAGATGC
CCGGGCGTCTACTATGTGGACAGGAGACTGGAAAGAATCAAGGAGGCCGACAAAGA
GACATACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCTGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAG
CAAACTGGGGCACAAACTTAATTCCTAAACTAGGGACAGGATTGGTGACAGAAAAG
CCCCATCCTTAGGCCTCCTCCTTCCTAGTCTCCTGATATTGGGTCTAACCCCCACC
TCCTGTTAGGCAGATTCCTTATCTGGTGACACACCCCCATTTCCTGGAGCCATCTC
TCTCCTTGCCAGAACCTCTAAGGTTTGCTTACGATGGAGCCAGAGAGGATCCTGG
GAGGGAGAGCTTGGCAGGGGGTGGGAGGGAAGGGGGGGATGCGTGACCTGCCC
GGTTCTCAGTGGCCACCCTGCGCTACCCTCTCCCAGAACCTGAGCTGCTCTGACG
CGGCTGTCTGGTGCGTTTCACTGATCCTGGTGCTGCAGCTTCCTTACACTTCCCAA
GAGGAGAAGCAGTTTGGAAAAACAAAATCAGAATAAGTTGGTCCTGAGTTCTAACT
TTGGCTCTTCACCTTTCTAGTCCCCAATTTATATTGTTCCTCCGTGCGTCAGTTTTA
CCTGTGAGATAAGGCCAGTAGCCAGCCCCGTCCTGGCAGGGCTGTGGTGAGGAG
GGGGGTGTCCGTGTGGAAAACTCCCTTTGTGAGAATGGTGCGTCCTAGGTGTTCA
CCAGGTCGTGGCCGCCTCTACTCCCTTTCTCTTTCTCCATCCTTCTTTCCTTAAAGA
GTCCCCAGTGCTATCTGGGACATATTCCTCCGCCCAGAGCAGGGTCCCGCTTCCC
TAAGGCCCTGCTCTGGGCTTCTGGGTTTGAGTCCTTGGC

ＯＣＴ４　Ｐ２Ａ－ｍＫａｔｅノックインＨＤＲ鋳型配列（配列番号５５１）
左相同アーム－挿入配列－右相同アーム
（下線が引かれているのは、挿入されたｍＫａｔｅ蛍光タンパク質配列であり、先行する下線が引かれていない部分は、Ｐ２Ａペプチド配列である）

【化４１０－１】

GCGACTATGCACAACGAGAGGATTTTGAGGCTGCTGGGTCTCCTTTCTCAGGGGG
ACCAGTGTCCTTTCCTCTGCCCCCAGGGCCCCATTTTGGTACCCCAGGCTATGGG
AGCCCTCACTTCACTGCACTGTACTCCTCGGTCCCTTTCCCTGAGGGGGAAGCCTT
TCCCCCTGTCTCCGTCACCACTCTGGGCTCTCCCATGCATTCAAATGGAAGCCGGA
GCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGAC
CTGCCACCATGGTGAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACAT
CGAGGGCACCGTGAACAACCACCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAA
GCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGCGGTCGAGGGCGGCCCTCT
CCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGCAGCAAAACCTTCA
TCAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTTAAGCAGTCCTTCCCCGAGGGCTT
CACATGGGAGAGAGTCACCACATACGAAGATGGGGGCGTGCTGACCGCTACCCA
GGACACCAGCCTCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTG
AACTTCCCATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCT
CCACCGAGACACTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAGCCGACATGG
CCCTGAAGCTCGTGGGCGGGGGCCACCTGATCTGCAACCTTAAGACCACATACAG
ATCCAAGAAACCCGCTAAGAACCTCAAGATGCCCGGCGTCTACTATGTGGACAGG
AGACTGGAAAGAATCAAGGAGGCCGACAAAGAGACATACGTCGAGCAGCACGAG
GTGGCTGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACTGGGGCACAAACTTAATT
CCTAATGACTAGGAATGGGGGACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGGGAAAGAAAAC
CTGGAGTTTGTGCCAGGGTTTTTGGGATTAAGTTCTTCATTCACTAAGGAAGGAATT

【化４１０－２】

GGGAACACAAAGGGTGGGGGCAGGGGAGTTTGGGGCAACTGGTTGGAGGGAAG
GTGAAGTTCAATGATGCTCTTGATTTTAATCCCACATCATGTATCACTTTTTTCTTAA
ATAAAGAAGCCTGGGACACAGTAGATAGACACACTT

ＡＣＴＢ　Ｐ２Ａ－ｍＫａｔｅノックインＨＤＲ鋳型配列（配列番号５５２）
左相同アーム－挿入配列－右相同アーム
（下線が引かれているのは、挿入されたｍＫａｔｅ蛍光タンパク質配列であり、先行する下線が引かれていない部分は、Ｐ２Ａペプチド配列である）

【化４１１】

TGTGGTGTGTGGGGAGCTGTCACATCCAGGGTCCTCACTGCCTGTCCCCTTCCCT
CCTCAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCCGTGTGGATCGGCGGCTCCA
TCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTATGA
CGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAGTGTTTCGGAAGCGGAGCTACTAAC
TTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTGTGAGC
GAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTGAACA
ACCACCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCC
AGACCATGAGAATCAAGGCGGTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGACAT
CCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGCAGCAAAACCTTCATCAACCACACCCAGGGC
ATCCCCGACTTCTTTAAGCAGTCCTTCCCCGAGGGCTTCACATGGGAGAGAGTCA
CCACATACGAAGATGGGGGCGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTCCAGG
ACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACTTCCCATCCAACGG
CCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGACACTGTAC
CCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAGCCGACATGGCCCTGAAGCTCGTGGG
CGGGGGCCACCTGATCTGCAACCTTAAGACCACATACAGATCCAAGAAACCCGCT
AAGAACCTCAAGATGCCCGGCGTCTACTATGTGGACAGGAGACTGGAAAGAATCA
AGGAGGCCGACAAAGAGACATACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCTGTGGCCAGAT
ACTGCGACCTCCCTAGCAAACTGGGGCACAAACTTAATTCCTAATAGGCGGACTAT
GACTTAGTTGCGTTACACCCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCGCAGAAAACAAGAT
GAGATTGGCATGGCTTTATTTGTTTTTTTTGTTTTGTTTTGGTTTTTTTTTTTTTTTG
GCTTGACTCAGGATTTAAAAACTGGAACGGTGAAGGTGACAGCAGTCGGTTGGAG
CGAGCATCCCCCAAAGTTCACAATGTGGCCGAGGACTTTGATTGCACATTGTTGTT
TTTTTAATAGTCATTCCAAATATGAGATGCGTTGTTACAGGAAGTCCCTTGCCATCC
TAAAAGCCACCCCACTTCTCTCTAAGGAGAATGGCCCAGTCCTCTCCCAAGTCCAC
ACAGGGGAGGTGATAGCATTGCTTTCGTGTAA

ＥＭＸ１　ＨＤＲ鋳型配列（配列番号５５３）
左相同アーム－挿入／置換配列－右相同アーム
（下線が引かれているのは、挿入されたＢｓｒＧＩ制限部位、例えば、ＴＧＴＡＣＡである）

【化４１２－１】

CATTCTGCCTCTCTGTATGGAAAAGAGCATGGGGCTGGCCCGTGGGGTGGTGTCC
ACTTTAGGCCCTGTGGGAGATCATGGGAACCCACGCAGTGGGTCATAGGCTCTCT
CATTTACTACTCACATCCACTCTGTGAAGAAGCGATTATGATCTCTCCTCTAGAAAC
TCGTAGAGTCCCATGTCTGCCGGCTTCCAGAGCCTGCACTCCTCCACCTTGGCTT
GGCTTTGCTGGGGCTAGAGGAGCTAGGATGCACAGCAGGCTCTGTGACCCTTTGTT
TGAGAGGAACAGGAAAACCACCCTTCTCTCTGGCCCACTGTGTCCTCTTCCTGCCC

【化４１２－２】

TGCCATCCCCTTCTGTGAATGTTAGACCCATGGGAGCAGCTGGTCAGAGGGGACC
CCGGCCTGGGGCCCCTAACCCTATGTAGCCTCAGTCTTCCCATCAGGCTCTCAGC
TCAGCCTGAGTGTTGAGGCCCCAGTGGCTGCTCTGGGGGCCTCCTGAGTTTCTCA
TCTGTGCCCCTCCCTCCCTGGCCCAGGTGAAGGTGTGGTTCCAGAACCCGAGGAC
AAAGTACAAACGGCAGAAGCTGGAGGAGGAAGGGCCTGAGTCCGAGCAGAAGAA
GAAGGGCTCCCATCACATCAACCGGTGGCGCATTGCCACGAAGCAGGCCAATGG
GGAGGACATCGATGTCACCTCCAATGACTCGGATGTACACGGTCTGCAACCACAA
ACCCACGAGGGCAGAGTGCTGCTTGCTGCTGGCCAGGCCCCTGCGTGGGCCCAA
GCTGGACTCTGGCCACTCCCTGGCCAGGCTTTGGGGAGGCCTGGAGTCATGGCC
CCACAGGGCTTGAAGCCCGGGGCCGCCATTGACAGAGGGACAAGCAATGGGCTG
GCTGAGGCCTGGGACCACTTGGCCTTCTCCTCGGAGAGCCTGCCTGCCTGGGCG
GGCCCGCCCGCCACCGCAGCCTCCCAGCTGCTCTCCGTGTCTCCAATCTCCCTTT
TGTTTTGATGCATTTCTGTTTTAATTTATTTTCCAGGCACCACTGTAGTTTAGTGATC
CCCAGTGTCCCCCTTCCCTATGGGAATAATAAAAGTCTCTCTCTTAATGACACGGG
CATCCAGCTCCAGCCCCAGAGCCTGGGGTGGTAGATTCCGGCTCTGAGGGCCAG
TGGGGGCTGGTAGAGCAAACGCGTTCAGGGCCTGGGAGCCTGGGGTGGGGTACT
GGTGGAGGGGGTCAAGGGTAATTCATTAACTCCTCTCTTTTGTTGGGGGACCCTG
GTCTCTACCTCCAGCTCCACAGCAGGAGAAACAGGCTAGACATAGGGAAGGGCCA
TCCTGTATCTTGAGGGAGGACAGGCCCAGGTCTTTCTTAACGTATTGAGAGGTGG
GAATCAGGCCCAGGTAGTTCAATGGG

ＤＹＮＬＴ１　ｍＫａｔｅ－Ｔ２Ａ－ＥＧＦＰ　ＨＤＲ鋳型　（配列番号５５４）
左相同アーム－ｍＫａｔｅ－Ｔ２Ａリンカー－ＥＧＦＰ－右相同アーム
（下線が引かれているのは、挿入されたｍＫａｔｅ／ＥＧＦＰ蛍光タンパク質配列であり、下線が引かれていないＰ２Ａペプチド配列に連結されている）

【化４１３－１】

TGCCGTAAATGCTGCTCTCTTCCCTCCCGCAGGGAGCTGCACTGTGCGATGGGAG
AATAAGACCATGTACTGCATCGTCAGTGCCTTCGGACTGTCTATTGGAAGCGGAGC
TACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT
GCCACCATGGTGAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGG
AGGGCACCGTGAACAACCACCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGC
CCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGCGGTCGAGGGCGGCCCTCTCC
CCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGCAGCAAAACCTTCATC
AACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTTAAGCAGTCCTTCCCCGAGGGCTTCA
CATGGGAGAGAGTCACCACATACGAAGATGGCGGCGTGCTCACCGCTACCCAGG
ACACCAGCCTCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAA
CTTCCCATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCTCC
ACCGAGACACTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAGCCGACATGGCC
CTGAAGCTCGTGGGCGGGGGCCACCTGATCTGCAACCTTAAGACCACATACAGAT
CCAAGAAACCCGCTAAGAACCTCAAGATGCCCGGCGTCTACTATGTGGACAGGAG
ACTGGAAAGAATCAAGGAGGCCGACAAAGAGACATACGTCGAGCAGCACGAGGT
GGCTGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACTGGGGCACAAACTTAATTCC
GCTAGCGGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAG
GAGAATCCTGGCCCAGGTGGTTCTGCCGGTGGCTCCGGTTCTGGCTCCAGCGGT
GGCAGCTCTGGTGCGTCCGGCACGGGTACTGCGGGTGGCACTGGCAGCGGTTCC
GGTACTGGCTCTGGCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCC

50

【化４１３－２】

ATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGC
GAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACC
ACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGC
GTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGT
CCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACG
GCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACC
GCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACA
AGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAA
GAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTG
CAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTG
CTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACG
AGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCT
CGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGACCAGCTGTCCtGCCTATGGCCTTTCTCCTTT
TGTCTCTAGTTCATCCTCTAACCACCAGCCATGAATTCAGTGAACTCTTTTCTCATT
CTCTTTGTTTTGTGGCACTTTCACAATGTAGAGGAAAAAACCAAATGACCGCACTGT
GATGTGAATGGCACCGAAGTCAGATGAGTATCCCTGTAGGTCACCTGCAGCCTGC
GTTGCCACTTGTCTT

ＨＳＰ９０ＡＡ１　ｍＫａｔｅ－Ｔ２Ａ－ＥＧＦＰ　ＨＤＲ鋳型　（配列番号５５５）
左相同アーム－ｍＫａｔｅ－Ｔ２Ａリンカー－ＥＧＦＰ－右相同アーム
（下線が引かれているのは、挿入されたｍＫａｔｅ／ＥＧＦＰ蛍光タンパク質配列であり、下線が引かれていないＰ２Ａペプチド配列に連結されている）

【化４１４－１】

TACTGTCTTGAAAGCAGATAGAAACCAAGAGTATTACCCTAATAGCTGGCTTTAAGA
AATCTTTGTAATATGAGGATTTTATTTTGGAAACAGGTATTGATGAAGATGACCCTA
CTGCTGATGATACCAGTGCTGCTGTAACTGAAGAAATGCCCACCCCTTGAAGGAGAT
GACGACACATCACGCATGGAAGAAGTAGACGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCC
TGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTGCCACCATGGTGA
GCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTGAA
CAACCACCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCAC
CCAGACCATGAGAATCAAGGCGGTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGA
CATCCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGCAGCAAAACCTTCATCAACCACACCCAGG
GCATCCCCGACTTCTTTAAGCAGTCCTTCCCCGAGGGCTTCACATGGGAGAGAGT
CACCACATACGAAGATGGGGGCGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTCCA
GGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACTTCCCATCCAAC
GGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGACACTG
TACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAGCCGACATGGCCCTGAAGCTCGTG
GGCGGGGGCCACCTGATCTGCAACCTTAAGACCACATACAGATCCAAGAAACCCG
CTAAGAACCTCAAGATGCCCGGCGTCTACTATGTGGACAGGAGACTGGAAAGAAT
CAAGCAGCCCGACAAAGAGACATACGTCGAGCAGCACCAGGTGGCTGTGGCCAG
ATACTGCGACCTCCCTAGCAAACTGGGGCACAAACTTAATTCCGCTAGCGGCAGT
GGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGC
CCAGGTGGTTCTGCCGGTGGCTCCGGTTCTGGCTCCAGCGGTGGCAGCTCTGGT
GCGTCCGGCACGGGTACTGCGGGTGGCACTGGCAGCGGTTCCGGTACTGGCTCT
GGCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAG
CTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGC

【化４１４－２】

GATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGC
CCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAG
CCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA
GGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC
GCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG
GCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTA
CAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTG
AACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACT
ACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACT
ACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
GGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCT
GTACAAGTGAATCTGTGGCTGAGGGATGACTTACCTGTTCAGTACTCTACAATTCC
TCTGATAATATATTTTCAAGGATGTTTTTCTTTATTTTTGTTAATATTAAAAAGTCTGT
ATGGCATGACAACTACTTTAAGGGGAAGATAAGATTTCTGTCTACTAAGTGATGCT
GTGATACCTTAGGCACTAAAGCAGAGCTAGTAATGCT

ＨＩＳＴ１Ｈ２ＢＫ　Ｐ２Ａ－ｍＫａｔｅノックインＨＤＲ鋳型配列（配列番号５５６）
左相同アーム－挿入配列－右相同アーム
（下線が引かれているのは、挿入されたｍＫａｔｅ蛍光タンパク質配列であり、先行する下線が引かれていない部分は、Ｐ２Ａペプチド配列である）

【化４１５－１】

ACGGCCATGGGAATCATGAACTCCTTCGTCAACGACATCTTCGAACGCATCGCGGG
TGAGGCTTCCCGCCTGGCGCATTACAACAAGCGCTCGACCATCACCTCCAGGGAG
ATCCAGACGGCCGTGCCGCCTGCTGCTGCCCCGGGGAGTTGGCCAAGCACGCCGTG
TCCGAGGGCACCAAGGCCGTCACCAAGTACACCAGCGCTAAGAGATCTGGAAGC
GGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCT
GGACCTATGGTGAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGG
AGGGCACCGTGAACAACCACCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGC
CCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGCGGTCGAGGGCGGCCCTCTCC
CCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGCAGCAAAACCTTCATC
AACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTTAAGCAGTCCTTCCCCGAGGGCTTCA
CATGGGAGAGAGTCACCACATACGAAGATGGGGGCGTGCTGACCGCTACCCAGG
ACACCAGCCTCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAA
CTTCCCATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCTCC
ACCGAGACACTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAGCCGACATGGCC
CTGAAGCTCGTGGGCGGGGGCCACCTGATCTGCAACCTTAAGACCACATACAGAT
CCAAGAAACCCGCTAAGAACCTCAAGATGCCCGGCGTCTACTATGTGGACAGGAG
ACTGGAAAGAATCAAGGAGGCCGACAAAGAGACATACGTCGAGCAGCACGAGGT
GGCTGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACTGGGGCACAAACTTAATTCC
TAATAAACTTGGAAAGTAAGCGTCTTAAAGCCCAACCCCAAAGGCTCTTTTAAGAG
CCACTTAAATTATCGATATTAGAGCTGTAAACACGTGTTCCTAATCCAGGCTTAAAT
TCGGGCGATCTTTTTAAAGGGATTATCATGATCTTATCACACTGAGTAATGCATGCA
GTGCTTGTAATCGAGTCTGGCTAAGGAGAAGCCACATACACTTTGTTAGTACTGAG
TGAGGAATATGGCGCCTAAAAAATTAGGGATGTGCAGGAAACTTGTGTTAACAGAA

【化４１５－２】

AGTGCTTCCTGGCTCTTGGCGCGAAAATGGATACTTCCGTTGTGTCGAGTGCTGTG
ACTTCCTGTTAGAACTTGTTGAAAGCCTATTGTGTCACGTGTACTTTCCACCATGTA
ATGGCGTTCTAACGTGAG

ＢＣＡＰ３１　Ｐ２Ａ－ｍＫａｔｅノックインＨＤＲ鋳型配列（配列番号５５７）

左相同アーム－挿入配列－右相同アーム
（下線が引かれているのは、挿入されたｍＫａｔｅ蛍光タンパク質配列であり、先行する下線が引かれていない部分は、Ｐ２Ａペプチド配列である）
【化４１６】

AGGCCTTTCGGTGCAGCTGGGGAGGGGGCCCCTTGTTCACTTGAATAGCTGTTGT
TAGGAGAGAGGGGAACCGAGGTGGACCTCTGGGGCATGGGGCTGGAGGTGGCA
GGGGAGGAGTGGACCCGGCCAACCTACTGCTGTGGGATTTCTGTCCCTTTCCAGG
CTGCAGTAGATGGTCCCATGGACAAGAAGGAAGAGAGATCTGGAACCGGAGCTAC
TAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATG
GTGAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCG
TGAACAACCACCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGG
CACCCAGACCATGAGAATCAAGGCGGTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTC
GACATCCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGCAGCAAAACCTTCATCAACCACACCCA
GGGCATCCCCGACTTCTTTAAGCAGTCCTTCCCCGAGGGCTTCACATGGGAGAGA
GTCACCACATACGAAGATGGGGGCGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTC
CAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACTTCCCATCCA
ACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGACAC
TGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAGCCGACATGGCCCTGAAGCTCG
TGGGCGGGGGCCACCTGATCTGCAACCTTAAGACCACATACAGATCCAAGAAACC
CGCTAAGAACCTCAAGATGCCCGGCGTCTACTATGTGGACAGGAGACTGGAAAGA
ATCAAGGAGGCCGACAAAGAGACATACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCTGTGGCC
AGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACTGGGGCACAAACTTAATTCCTAATAAGGGCC
TCCTTCCTCCCCTGCCTGCAGCTGGCTTCCACCTGGCACGTGCCTGCTGCTTCCT
GAGAGCCCGGCCTCTCCCTCCAGTACTTCTGTTTGTGCCCTTCTGCTTCCCCCATT
CCCTTCCACAGCTCATAGCTCGTCATCTCGGCCCTTGTCCACACTCTCCAAGCACA
TTACAGGGGACCTGATTGCTACACGTTCAGAATGCGTTTGCTGTCATCCTGCTTGG
CCTGGCCAGGCCTGGCACAGCCTTGGCTTCCACGCCTGAGCGTGGAGAGCACGA
GTTAGTTGTAGTCCGGCTTGCGGTGGGGCTGACTTCCTGTTGGTTTGAGCCCCTTT
TTGTTTTGCCCTCTGGGTGTTTTCTTTGGTCCCGCAGGAGGGTGGGTGGAGCAGG
TGGACTG

ＣＬＴＡ　Ｐ２Ａ－ｍＫａｔｅノックインＨＤＲ鋳型配列（配列番号５４８）
左相同アーム－挿入配列－右相同アーム
（下線が引かれているのは、挿入されたｍＫａｔｅ蛍光タンパク質配列であり、先行する下線が引かれていない部分は、Ｐ２Ａペプチド配列である）

【化４１７】

GCGTAGCTCCTGAACCATTGTTGTCCTCTGATTGGTTGTTCCCTTTTCGGCTCTGC
AACACCGCCTAGACCGACCGGATACACGGGTAGGGCTTCCGCTTTACCCGTCTCC
CTCCTGGCGCTTGTCCTCCTCTCCCAGTCGGCACCACAGCGGTGGCTGCCGGGC
GTGGTGTCGGTGGGTCGGTTGGTTTTTGTCTCACCGTTGGTGTCCGTGCCGTTCA
GTTGCCCGCCCATATGATGGTGACCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAG
CTGTACATGGAGGGCACCGTGAACAACCACCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCG
AAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGCGGTCGAGGGCG
GCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGCAGCAAA
ACCTTCATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTTAAGCAGTCCTTCCCCGA
GGGCTTCACATGGGAGAGAGTCACCACATACGAAGATGGGGGCGTGCTGACCGC
TACCCAGGACACCAGCCTCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGA
GGGGTGAACTTCCCATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGG
AGGCCTCCACCGAGACACTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAGCCG
ACATGGCCCTGAAGCTCGTGGGCGGGGGCCACCTGATCTGCAACCTTAAGACCAC
ATACAGATCCAAGAAACCCGCTAAGAACCTCAAGATGCCCGGCGTCTACTATGTG
GACAGGAGACTGGAAAGAATCAAGGAGGCCGACAAAGAGACATACGTCGAGCAG
CACGAGGTGGCTGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACTGGGGCACAAAC
TTAATTCCAGATCTGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGG
AGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGCTGAGCTGGATCCGTTCGGCGCCCC
TGCCGGCGCCCCTGGCGGTCCCGCGCTGGGGAACGGAGTGGCCGGCGCCGGCG
AAGAAGACCCGGCTGCGGCCTTCTTGGCGCAGCAAGAGAGCGAGATTGCGGGCA
TCGAGAACGACGAGGCCTTCGCCATCCTGGACGGCGGCGCCCCCGGGCCCCAG
CCGCACGGCGAGCCGCCGGGGGGTCCGGGTGAGAGTGCGGGCGCGTTTGGGGC
GAGAGGACTTGTCTGGAAACTCGGTCCACAGTGGGTCCGAGAGCTTCTGTGTGAC
TCGTGCTCCTTGCTGAATTAGGAGGTTAGGGAGCAGTGCAAACAGGAAACGAGAC
CCTGGCCCGGTCTTTCAGAAACCTAGGCTCGAGAAGCCTGTTCGGTTCTCAGCAT
GTTTGAGTGCTTCTGG

ＲＡＢ１１Ａ　Ｐ２Ａ－ｍＫａｔｅノックインＨＤＲ鋳型配列（配列番号５５９）
左相同アーム－挿入配列－右相同アーム
（下線が引かれているのは、挿入されたｍＫａｔｅ蛍光タンパク質配列であり、先行する下線が引かれていない部分は、Ｐ２Ａペプチド配列である）

【化４１８－１】

CTGCCGGAAATGGCGCAGCGGCAGGGAGGGGCTCTTCACCCAGTCCGGCAGTTG
AAGCTCGGCGCTCGGGTTACCCCTGCAGCGACGCCCCCTGGTCCCACAGATACC
ACTGCTGCTCCCGCCCTTTCGCTCCTCGGCCGCGCAATGGGCGTGAGCGAGCTG
ATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTGAACAACCACC
ACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCA
TGAGAATCAAGGCGGTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGC
TACCAGCTTCATGTACGGCAGCAAAACCTTCATCAACCACACCCAGGGCATCCCC
GACTTCTTTAAGCAGTCCTTCCCCGAGGGCTTCACATGGGAGAGAGTCACCACATA
CGAAGATGGGGGCGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTCCAGGACGGCTG
CCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACTTCCCATCCAACGGCCCTGTG
ATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGACACTGTACCCCGCTG

【化４１８－２】

ACGGCCGCCTGGAAGGCAGAGCCCACATGGCCCTGAAGCTCGTGGCCGGGGGC
CACCTGATCTGCAACCTTAAGACCACATACAGATCCAAGAAACCCGCTAAGAACCT
CAAGATGCCCGGCGTCTACTATGTGGACAGGAGACTGCAAAGAATCAAGGAGGCC
GACAAAGAGACATACGTCGAGCAGCACGAGGTCGCTGTGGCCAGATACTGCGAC
CTCCCTAGCAAACTGGGGCACAAACTTAATTCCACACGTGACGACGAGTACGACTA
CCTCTTTAAAGGTGAGGCCATGGGCTCTCGCACTCTACACAGTCCTCGTTCGGGG
ACCCGGGCCACTCCCGGTGGACCCTCGTGCCGGCCACCCCTGCACTGATATAGG
CCTCCCTCAGCCCTTCCTTTTTGTGCGGTTCCGTCTCCTAC

【０４４６】

実施例１８

ロバストなノックイン編集のためのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰ効率の最適化。本出願人らは、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタを更に最適化し、より大きなパネルのゲノム標的にわたってその活性を試験した。出願人らは、まず、投与量を調整することが編集効率を改善し得るかどうかを調べた（図５４Ａ、図５５Ａ）。実際、本出願人らがＳＳＡＰをコードするプラスミドの量を滴定したところ、本出願人らは、全ての標的にわたってより高い編集効率を観察した（図５４Ａ）。この相関は、ノックイン編集がＳＳＡＰによって駆動されたことを更に裏付けた。対照的に、ドナー量の増加による、ノックイン効率に対する影響は無視できるものであり（図５５Ａ）、ドナー投与量がこの設定におけるボトルネックではなかったことを示唆した。投与量の最適化に加えて、本出願人らは、ドナー相同アーム（ＨＡ）の長さを延長し、ＨＡの更なる延長が、以前の結果と一致して、ノックイン効率の改善に役立つことを観察した（図５５Ｂ、５５Ｃ）。

【０４４７】

これらの最適化されたパラメータを使用して、本出願人らは、７つの内因性遺伝子座（ＤＹＮＬＴ１、ＨＳＰ９０ＡＡ１、ＡＣＴＢ　ＢＣＡＰ３１、ＨＩＳＴ１Ｈ２ＢＫ、ＣＬＴＡ、ＲＡＢ１１Ａ）におけるｄＣａｓ９－ＳＳＡＰのノックイン効率を測定した（図５４Ｂ）。注目すべきことに、本出願人らは、ノックインタグが内因性タンパク質のＮ末端に直接融合として挿入された２つの遺伝子座（ＣＬＴＡ、ＲＡＢ１１Ａ）を含めて、２Ａ－ペプチド設計を補完した。全ての標的にわたって、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰは、選択なしで最大約２０％までの効率を示し、これは、Ｃａｓ９参照と同等であり、時には中程度に高い効率を示した（図５４Ｂ）。

【０４４８】

長期間にわたるｄＣａｓ９－ＳＳＡＰによって媒介される編集の安定性を確実にするために、出願人らは次に、ノックイン導入遺伝子発現の耐久性を調べた。本出願人らは、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰおよびドナーＤＮＡのトランスフェクション後３日目にｍＫａｔｅ＋細胞を選別し、次いで、導入遺伝子が異なるゲノム遺伝子座で３日間のウィンドウを超えてその発現を維持しているかどうかを調べた（図５４Ｃ）。正確なオンターゲット編集（図３９）を示す本出願人の配列決定結果と一致して、本出願人らは、ノックインカセット発現がｄＣａｓ９－ＳＳＡＰの送達後５日目、７日目、１０日目に安定であることを観察した（図５４Ｃ、図５７）。ノックイン細胞集団は、対照と比較して明確で安定した導入遺伝子発現を有する（図５７Ｃ）。したがって、これは、哺乳動物細胞における安定なノックイン編集のためのｄＣａｓ９－ＳＳＡＰの有用性を裏付けた。

【０４４９】

最後に、出願人らは、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタが内因性遺伝子座に多様なペイロードを挿入する能力を機能的に検証しようとした（図５６Ａ）。簡潔には、出願人らは、内因性遺伝子（図５６Ｂ、左）との融合タンパク質として、選択可能なペイロード（ピューロマイシンおよびブラストサイジン耐性カセット）を有するノックインドナーを構築した。出願人らは、ウエスタンブロットを用いてｄＣａｓ９－ＳＳＡＰおよびＣａｓ９参照からのノックイン結果を調べた。免疫ブロッティングにより、標的（ＨＳＰ９０ＡＡ１、

ＡＣＴＢ）およびペイロード（図５６Ｂ）にわたってｄＣａｓ９－ＳＳＡＰを使用して、予測されるノックイン融合タンパク質の存在および正しいサイズが確認された。更に、出願人らは、機能アッセイを使用して、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰおよびＣａｓ９方法の相対的なノックイン効率を定量化した（図５６ｃ、図５７Ｃ～図５７Ｅ）。本出願人らは、短いＨＡドナーを使用して耐性カセットを内因性遺伝子座に挿入し、ピューロマイシンを適用してノックイン細胞を選択した。コロニー形成アッセイにより、ｄＣａｓ９－ＳＳＡＰエディタがこのタンパク質機能読み出しを使用して信頼できる性能を有することが確認された（図５６Ｃ）。

【０４５０】

実施例１９

Ｃａｓ９を含むＳＳＡＰ＋逆転写酵素

【０４５１】

ＳＳＡＰと逆転写酵素およびＣａｓ９とを組み合わせた系について編集効率を試験した。

【０４５２】

ＳＳＡＰ－ＲＴ（プライム編集）－実験１　ＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＳＳＡＰ－ＲＴの試験

【０４５３】

４８ウェルプレートＨＥＫ２９３Ｔ細胞、細胞密度は６０％であった。

【０４５４】

リポフェクタミン２０００については、１０８６ｎｇのＤＮＡ＋１ｕｌのＬｉｐ２０００を、ウェルあたり３０ｕｌのｏｐｔｉ－ＭＥＭ中で混合する。

【０４５５】

Ｃａｓ９ｎ－ＲＴ　６００ｎｇ＋ＲＮＡ鋳型／ドナーを含むｇＲＮＡ　２００ｎｇ＋ＭＳ２アプタマーを含む第２のｇＲＮＡ　６６ｎｇ＋ＳＳＡＰ　２００ｎｇ

【０４５６】

試験した系の成分：

【０４５７】

Ｃａｓ９－ＲＴ：ｐＡ１３１、Ｃａｓ９（Ｈ８４０Ａ）＋ＲＴ：逆転写酵素（ＲＴ）に融合したＣａｓ９ニッカーゼを発現する

【０４５８】

ＲＮＡ鋳型／ドナーを有するガイドＲＮＡ：

【０４５９】

ｐＡ１３２：非標的化対照

【０４６０】

ｐＡ１３２＿ＨＥＫ３＿ＣＴＴ＿ｉｎｓ（ヒトゲノム中のＨＥＫ３ゲノム部位に３ｂｐ配列であるＣＴＴを挿入するためにＲＮＡ鋳型／ドナーに融合したガイドＲＮＡを駆動するＵ６）

【０４６１】

ｐＡ１３２＿ＲＮＦ２＿ＧＴＡ＿ｉｎｓ（ヒトゲノム中のＲＮＦ２ゲノム部位にＧＴＡ、３ｂｐ配列を挿入するためにＲＮＡ鋳型／ドナーに融合したガイドＲＮＡを駆動するＵ６）

【０４６２】

ＳＳＡＰを動員するためのＭＳ２アプタマーを有する第２のガイドＲＮＡ：

【０４６３】

ｐＡ７３（ＭＳ２アプタマーを含まない非標的化対照）

【０４６４】

ｐＣＫ０３２＿ＨＥＫ３＿＋９０（上記の鋳型／ドナーを有するガイドＲＮＡに対して＋９０位に位置する２０ｂｐガイドを有するＨＥＫ３ガイドＲＮＡを駆動するＵ６プロモータ、このガイドＲＮＡ足場はＳＳＡＰを動員するためのＭＳ２アプタマーを有する）

【０４６５】
ｐＣＫ０３２＿ＲＮＦ２＿＋４１（上記の鋳型／ドナーを有するガイドＲＮＡに対して＋４１位に位置する２０ｂｐガイドを有するＲＮＦ２ガイドＲＮＡを駆動するＵ６プロモータ、このガイドＲＮＡ足場はＳＳＡＰを動員するためのＭＳ２アプタマーを有する）
【０４６６】
ＳＳＡＰタンパク質：
【０４６７】
ｐＣＫ９０４＿ＭＣＰ＿ＧＦＰ：対照としてＧＦＰタンパク質へのＭＣＰ融合物を発現するｐＥＦ１Ａ－ＭＣＰ－ＸＴＥＮリンカー－ＧＦＰ－ＳＶ４０ＮＬＳ
【０４６８】
ｐＣＫ９０４：ＳＳＡＰ　ＲｅｃＴとのＭＣＰ融合物を発現するｐＥＦ１　Ａ－ＭＣＰ－ＸＴＥＮリンカー－ＲｅｃＴ－ＳＶ　４０ＮＬＳ
【０４６９】
ＳＳＡＰによるプライム編集は、ＨＥＫ３遺伝子座で最も高い編集効率（図８５、上部）およびＲＦＮ２遺伝子座で最も高い編集効率（図８５、下部）をもたらした。
【０４７０】
実施例２０
ＨＥＫ２９３Ｔ細胞における異なる長さのゲノム編集のためのＳＳＡＰ－ＲＴ
【０４７１】
Ｃａｓ９を含むＳＳＡＰ＋逆転写酵素
【０４７２】
４８ウェルプレートＨＥＫ２９３Ｔ細胞、細胞密度は６０％であった。
【０４７３】
リポフェクタミン２０００については、１０８６ｎｇのＤＮＡ＋１ｕｌのＬｉｐ２０００を、ウェルあたり３０ｕｌのｏｐｔｉ－ＭＥＭ中で混合する。
【０４７４】
Ｃａｓ９ｎ－ＲＴ　６００ｎｇ＋ＲＮＡ鋳型／ドナーを含むｇＲＮＡ　２００ｎｇ＋ＭＳ２アプタマーを含む第２のｇＲＮＡ　６６ｎｇ＋ＳＳＡＰ　２００ｎｇ
【０４７５】
試験した系の成分：
【０４７６】
Ｃａｓ９－ＲＴ：
【０４７７】
ｐＡ１３１、Ｃａｓ９（Ｈ８４０Ａ）＋ＲＴ：逆転写酵素（ＲＴ）に融合したＣａｓ９ニッカーゼを発現する
【０４７８】
ＲＮＡ鋳型／ドナーを有するガイドＲＮＡ：
【０４７９】
ｐＡ１３２：非標的化対照
【０４８０】
ｐＡ１３２＿ＨＥＫ３＿１２＿ｉｎｓ（ヒトゲノム中のＨＥＫ３ゲノム部位に１２ｂｐ配列を挿入するためにＲＮＡ鋳型／ドナーに融合したガイドＲＮＡを駆動するＵ６）
【０４８１】
ｐＡ１３２＿ＨＥＫ３＿３６＿ｉｎｓ（ヒトゲノム中のＨＥＫ３ゲノム部位に３６ｂｐ配列を挿入するためにＲＮＡ鋳型／ドナーに融合したガイドＲＮＡを駆動するＵ６）
【０４８２】
ｐＡ１３２＿ＨＥＫ３＿１０８＿ｉｎｓ（ヒトゲノム中のＨＥＫ３ゲノム部位に１０８ｂｐ配列を挿入するためにＲＮＡ鋳型／ドナーに融合したガイドＲＮＡを駆動するＵ６）
【０４８３】
ｐＡ１３２＿ＲＮＦ２＿１２＿ｉｎｓ（ヒトゲノム中のＲＮＦ２ゲノム部位に１２ｂｐ

配列を挿入するためにＲＮＡ鋳型／ドナーに融合したガイドＲＮＡを駆動するＵ６）
【０４８４】
ｐＡ１３２＿ＲＮＦ２＿３６＿ｉｎｓ（ヒトゲノム中のＲＮＦ２ゲノム部位に３６ｂｐ配列を挿入するためにＲＮＡ鋳型／ドナーに融合したガイドＲＮＡを駆動するＵ６）
【０４８５】
ｐＡ１３２＿ＲＮＦ２＿１０８＿ｉｎｓ（ヒトゲノム中のＲＮＦ２ゲノム部位に１０８ｂｐ配列を挿入するためにＲＮＡ鋳型／ドナーに融合したガイドＲＮＡを駆動するＵ６）
【０４８６】
ＳＳＡＰを動員するためのＭＳ２アプタマーを有する第２のガイドＲＮＡ：
【０４８７】
ｐＣＫ０３２＿　ＨＥＫ３＿－１７（上記の鋳型／ドナーを有するガイドＲＮＡに対して－１７位に位置する２０ｂｐガイドを有するＨＥＫ３ガイドＲＮＡを駆動するＵ６プロモータ、このガイドＲＮＡ足場はＳＳＡＰを動員するためのＭＳ２アプタマーを有する）
【０４８８】
ｐＣＫ０３２＿　ＨＥＫ３＿－９（上記の鋳型／ドナーを有するガイドＲＮＡに対して－９位に位置する２０ｂｐガイドを有するＨＥＫ３ガイドＲＮＡを駆動するＵ６プロモータ、このガイドＲＮＡ足場はＳＳＡＰを動員するためのＭＳ２アプタマーを有する）
【０４８９】
ｐＣＫ０３２＿ＲＮＦ２＿＋５（上記の鋳型／ドナーを有するガイドＲＮＡに対して＋５位に位置する２０ｂｐガイドを有するＲＮＦ２ガイドＲＮＡを駆動するＵ６プロモータ、このガイドＲＮＡ足場はＳＳＡＰを動員するためのＭＳ２アプタマーを有する）
【０４９０】
ｐＣＫ０３２＿ＲＮＦ２＿－１９（上記の鋳型／ドナーを有するガイドＲＮＡに対して－１９位に位置する２０ｂｐガイドを有するＲＮＦ２ガイドＲＮＡを駆動するＵ６プロモータ、このガイドＲＮＡ足場はＳＳＡＰを動員するためのＭＳ２アプタマーを有する）
【０４９１】
ＳＳＡＰタンパク質：
【０４９２】
ｐＣＫ９０４＿ＭＣＰ＿ＧＦＰ：対照としてＧＦＰタンパク質へのＭＣＰ融合物を発現するｐＥＦ１Ａ－ＭＣＰ－ＸＴＥＮリンカー－ＧＦＰ－ＳＶ４０ＮＬＳ
【０４９３】
ｐＣＫ９０４：ＳＳＡＰ　ＲｅｃＴとのＭＣＰ融合物を発現するｐＥＦ１　Ａ－ＭＣＰ－ＸＴＥＮリンカー－ＲｅｃＴ－ＳＶ　４０ＮＬＳ
【０４９４】
ＳＳＡＰによるプライム編集は、ＨＥＫ３遺伝子座で最も高い編集効率（図８６、上部）およびＲＦＮ２遺伝子座で最も高い編集効率（図８６、下部）をもたらした。編集効率の改善は、ＲＮＡ鋳型／ドナーを使用してより長い配列を編集するいくつかの場合において、より顕著であった（３６ｎｔ挿入、１０８ｎｔ挿入）。

【表１１－１】

表11：SSAP－RTリコンビニアリングのための配列

名称	注記	配列
Cas9n-RT融合	配列番号604	MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWA VITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGET AEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDS FFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIY HLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDL NPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNF KSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADL FLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGA SQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFD NGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFR IPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKG ASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNEL TKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKII KDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGK TILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ GDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRH KPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGS QILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDI NRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSD NVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAER GGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKY DENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYH HAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVR KMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKK TEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFD SPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSF EKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRM LASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPED NEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKV LSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDT TIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDS GGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSTLNIEDEY

【表１１－２】

		RLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQ APLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGI LVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVE DIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHP TSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNE ALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQG TRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEG QRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFI PGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALL TAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRR PVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLT MGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALL LDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEA HGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAA VTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKK LNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKD EILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQ AARKAAITETPDTSTLLIENSSPSGGSKRTADGSEFEPKK KRKV*
SSAP-RT融合(C-末端RT)	MCP-リンカー-RecT-リンカー-RT(配列番号605)	MASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGVAEWISSN SRSQAYKVTCSVRQSSAQKRKYTIKVEVPKVATQTVGG VELPVAAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLL KDGNPIPSAIAANSGIYSASGGSSGGSSGSETPGTSESAT PESSGGSSGGSGGSMTKQPPIAKADLQKTQGNRAPAAV KNSDVISFINQPSMKEQLAAALPRHMTAERMIRIATTEIR KVPALGNCDTMSFVSAIVQCSQLGLEPGSALGHAYLLP FGNKNEKSGKKNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIASLSARV VREGDEFSFEFGLDEKLIHRPGENEDAPVTHVYAVARL KDGGTQFEVMTRKQIELVRSLSKAGNNGPWVTHWEEM AKKTAIRRLFKYLPVSIEIQRAVSMDEKEPLTIDPADSSV LTGEYSVIDNSEESGGSSGGSSGGSSGSETPGTSESATPE SSGGSSGGSSTLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFP QAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQ EARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTN DYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQW YTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLT WTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYV DDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQI CQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPR QLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNW GPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQ GYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLR MVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPP DRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLP LPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYT DGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQR

10

20

30

40

50

【表１１－３】

		AELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIY RRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGH QKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSS PSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV
SSAP-RT融合(N-末端RT)	MCP-リンカー-RT-リンカー-RecT (配列番号606)	MASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGVAEWISSN SRSQAYKVTCSVRQSSAQKRKYTIKVEVPKVATQTVGG VELPVAAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLL KDGNPIPSAIAANSGIYSASGGSSGGSSGSETPGTSESAT PESSGGSSGGSGGSTLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTW LSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQY PMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKK PGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPS HQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGIS GQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASA KKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPT PKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGT LFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFV DEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGW PPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALV KQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPA TLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHT WYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTS AQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIH GEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIH CPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLI ENSSPSGGSKRTADGSEFEPKKKRKVSGGSSGSETPGTS ESATPESSGGSSGGSSMTKQPPIAKADLQKTQGNRAPA AVKNSDVISFINQPSMKEQLAAALPRHMTAERMIRIATT EIRKVPALGNCDTMSFVSAIVQCSQLGLEPGSALGHAYL LPFGNKNEKSGKKNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIASLSA RVVREGDEFSFEFGLDEKLIHRPGENEDAPVTHVYAVA RLKDGGTQFEVMTRKQIELVRSLSKAGNNGPWVTHWE EMAKKTAIRRLFKYLPVSIEIQRAVSMDEKEPLTIDPADS SVLTGEYSVIDNSEESGGSPKKKRKV
pA19-MS2-dg-36L-Venus_New_Y66-センス	36bpリンカーによって足場に連結された、TLR遺伝子座を編集するための融合RNA鋳型／ドナー（センス配向）を有するMS2含有dgRNAa、TLR遺伝子座を標的とする15bp dgRNAガイドで始まる	gctgatctgcaccacgtttAagagctaggccAACATGAGGATCACCCA TGTCTGCAGggcctagcaagttTaaataaggctagtccgttatcaacttggccA ACATGAGGATCACCCATGTCTGCAGggccaagtggcaccgagt cggtgcAAAAACAGAAAagcgctAAAAACACCACACAACC ACACCCCAAAAACACCACAgtgagcaagggcgaggagctgttcacc ggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagc gtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagctgatc tgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgggctacg gcctgcagtgcttcgcccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtcc

【表１１－４】

	(配列番号607)	gccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaact acaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgag ctgaagggcatcgacttcaaggaggacg
pA19-MS2-dg-36L-Venus_New_Y66-アンチセンス	36bpリンカーによって足場に連結された、TLR遺伝子座を編集するための融合RNA鋳型／ドナー（アンチセンス配向）を有するMS2含有dgRNAa、TLR遺伝子座を標的とする15bp dgRNAガイドで始まる (配列番号608)	gctgatctgcaccacgtttAagagctaggccAACATGAGGATCACCCA TGTCTGCAGggcctagcaagttTaaataaggctagtccgttatcaacttggccA ACATGAGGATCACCCATGTCTGCAGggccaagtggcaccgagt cggtgcAAAAAACAGAAAagcgctAAAAACACCACACAACC ACACCCCAAAAACACCACAcgtcctccttgaagtcgatgcccttcagc tcgatgcggttcaccagggtgtcgccctcgaacttcacctcggcgcgggtcttgtagttg ccgtcgtccttgaagaagatggtgcgctcctggacgtagccttcgggcatggcggactt gaagaagtcgtgctgcttcatgtggtcggggtagcgggcgaagcactgcaggccgtag cccagggtggtcacgagggtgggccagggcacgggcagcttgccggtggtgcagat cagcttcagggtcagcttgccgtaggtggcatcgccctcgccctcgccggacacgctg aacttgtggccgtttacgtcgccgtccagctcgaccaggatgggcaccaccccggtgaa cagctcctcgcccttgctcac
pA132_HEK3_CTT_ins	pA132__HEK3__CTT__ins、3bp挿入のためのRNA鋳型／ドナーを有するHEK3を標的とするpegRNA、そして20bpガイドが、HEK3を標的とする5’末端に結合している (配列番号609)	ggcccagactgagcacgtgagttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagt ccgttatcaacttgaaaaagtgggaccgagtcggtcctctgccatcaaagcgtgctcagt ctg
pA132_HEK3_12_ins	ヒトゲノム中のHEK3ゲノム部位に12bp配列を挿入するためにRNA鋳型／ドナーに融合したガイドRNA (配列番号610)	GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTG AAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTGGAGGAAGCAGG GCTTCCTTTCCTCTGCCATCACACCTGCACTCCCGTGC TCAGTCTg

【表１１－５】

pA132_HEK3_36_ins	ヒトゲノム中のHEK3ゲノム部位に36bp配列を挿入するためにRNA鋳型／ドナーに融合したガイドRNA（配列番号611）	GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTG AAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTGGAGGAAGCAGG GCTTCCTTTCCTCTGCCATCACCCGTCTCCTGGGGAG ATGGTTTCCACCTGCACTCCCGTGCTCAGTCTg
pA132_HEK3_108_ins	ヒトゲノム中のHEK3ゲノム部位に108bp配列を挿入するためにRNA鋳型／ドナーに融合したガイドRNA（配列番号612）	GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAA TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTG AAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTGGAGGAAGCAGG GCTTCCTTTCCTCTGCCATCAAAATTTCTTTCCATCTT CAAGCATCCCGGTGTAGTGCACCACGCAGGTCTGGCC GCGCTTGGGGAAGGTGCGCCCGTCTCCTGGGGAGAT GGTTTCCACCTGCACTCCCGTGCTCAGTCTg
pA132_RNF2_GTA_ins	pA132__RNF2__GTA__ins、3bp挿入のためのRNA鋳型／ドナーを有するRNF2を標的とするpegRNA、そして20bpガイドが、RNF2を標的とする5’末端に結合している（配列番号613）	GTCATCTTAGTCATTACCTGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGA AAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCAACGAACACCTCAG TACGTAATGACTAAGATg
pA132_RNF2_12_ins	ヒトゲノム中のRNF2ゲノム部位に12bp配列を挿入するためにRNA鋳型／ドナーに融合したガイドRNA（配列番号614）	GTCATCTTAGTCATTACCTGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGA AAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCACTCAGTTTATATGA GTTACAACGAACACCTCAGCACCTGCACTCCGTAATG ACTAAGATg

【表１１－６】

pA132_RNF2_36_ins	ヒトゲノム中のRNF2ゲノム部位に36bp配列を挿入するためにRNA鋳型／ドナーに融合したガイドRNA（配列番号615）	GTCATCTTAGTCATTACCTGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGA AAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCACTCAGTTTATATGA GTTACAACGAACACCTCAGCCCGTCTCCTGGGGAGAT GGTTTCCACCTGCACTCCGTAATGACTAAGATg
pA132_RNF2_108_ins	ヒトゲノム中のRNF2ゲノム部位に108bp配列を挿入するためにRNA鋳型／ドナーに融合したガイドRNA（配列番号616）	GTCATCTTAGTCATTACCTGGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGA AAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCACTCAGTTTATATGA GTTACAACGAACACCTCAGAAATTTCTTTCCATCTTC AAGCATCCCGGTGTAGTGCACCACGCAGGTCTGGCC GCGCTTGGGGAAGGTGCGCCCGTCTCCTGGGGAGAT GGTTTCCACCTGCACTCCGTAATGACTAAGATg
pCK032-p18-U6-sgRNA-MS2-MS2-polyT	足場を有するガイドRNAは、RT__SSAP実験で使用されるSSAPを動員するためのMS2アプタマーを有し、ここでは、ガイドを含まない足場配列のみを示す（配列番号617）	gtttAagagctaggccAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAGg gcctagcAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTT GAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGCGCACATGAGG ATCACCCATGTGC
pCK904_MCP_GFP	対照としてのGFPタンパク質とのMCP融合物	MASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGVAEWISSN SRSQAYKVTCSVRQSSAQKRKYTIKVEVPKVATQTVGG VELPVAAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLL KDGNPIPSAIAANSGIYSASGGSSGGSSGSETPGTSESAT

【表１１－７】

	(配列番号618)	PESSGGSSGGSGGSMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVN GHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLV TTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIF FKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNIL GHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGS VQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNE KRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYKSGGSPKKKRKV
pCK904_pMPH-MCP-XTEN-RecT-SV40 NLS	SSAP RecTとのMCP融合物 (配列番号619)	MASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGVAEWISSN SRSQAYKVTCSVRQSSAQKRKYTIKVEVPKVATQTVGG VELPVAAWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLL KDGNPIPSAIAANSGIYSASGGSSGGSSGSETPGTSESAT PESSGGSSGGSGGSMTKQPPIAKADLQKTQGNRAPAAV KNSDVISFINQPSMKEQLAAALPRHMTAERMIRIATTEIR KVPALGNCDTMSFVSAIVQCSQLGLEPGSALGHAYLLP FGNKNEKSGKKNVQLIIGYRGMIDLARRSGQIASLSARV VREGDEFSFEFGLDEKLIHRPGENEDAPVTHVYAVARL KDGGTQFEVMTRKQIELVRSLSKAGNNGPWVTHWEEM AKKTAIRRLFKYLPVSIEIQRAVSMDEKEPLTIDPADSSV LTGEYSVIDNSEESGGSPKKKRKV
Cas9-レトロンRT1	Cas9－レトロンRT融合タンパク質設計1 (配列番号620)	MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLDIGTNSVGWAVIT DEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEA TRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFH RLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPD NSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAA KNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLT LLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEE FYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSI PHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYY VGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASA QSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQ LKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKD KDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLF DDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILD FLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDS LHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPE NIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVP SEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGL SELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN

【表１１－８】

		DKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAH DAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPL IETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPT VAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLA SAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLS AYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTI DRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSG GSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSRIYSLIDSQT LMTKGFASEVMRSPEPPKKWDIAKKKGGMRTIYHPSSK VKLIQYWLMNNVFSKLPMHNAAYAFVKNRSIKSNALL HAESKNKYYVKIDLKDFFPSIKFTDFEYAFTRYRDRIEFT TEYDKELLQLIKTICFISDSTLPIGFPTSPLIANFVARELDE KLTQKLNAIDKLNATYTRYADDIIVSTNMKGASKLILDC FKRTMKEIGPDFKINIKKFKICSASGGSIVVTGLKVCHDF HITLHRSMKDKIRLHLSLLSKGILKDEDHNKLSGYIAYA KDIDPIIFYTKLNRKYFQEIKWIQNLIINKVESGGSKRTA DGSEFEPKKKRKV
Cas9-レトロンRT2	Cas9－レトロンRT融合タンパク質設計2（配列番号621）	MAPKKKRKVGIHGVPAADKKYSIGLDIGTNSVGWAVIT DEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEA TRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFH RLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPD NSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAA KNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLT LLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEE FYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSI PHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYY VGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASA QSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTK VKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQ LKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKD KDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLF DDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILD FLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDS LHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPE NIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVP SEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGL SELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDEN

【表１１－９】

		DKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAH DAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPL IETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPT VAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEK NPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLA SAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLS AYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTI DRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSA SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSGGSKSAEY LNTFRLRNLGLPVMNNLHDMSKATRISVETLRLLIYTA DFRYRIYTVEKKGPEKRMRTIYQPSRELKALQGWVLRN ILDKLSSSPFSIGFEKHQSILNNATPHIGANFILNIDLEDFF PSLTANKVFGVFHSLGYNRLISSVLTKICCYKNLLPQGA PSSPKLANLICSKLDYRIQGYAGSRGLIYTRYADDLTLS AQSMKKVVKARDFLFSIIPSEGLVINSKKTCISGPRSQRK VTGLVISQEKVGIGREKYKEIRAKIHHIFCGKSSEIEHVR GWLSFILSVDSKSHRRLITYISKLEKKYGKNPLNKAKTK RPAATKKAGQAKKKK
レトロン-gRNA-MS2-18L-Venus_TLR	レトロン－gRNA－MS2－18L－Venus__TLR、SSAPを動員するためのMS2足場、それに続くリンカー、18bp－リンカーをコードする挿入されたRNA鋳型／ドナーを有するレトロンmsr／msd領域、編集TLR遺伝子座のためのmVenus－RNA－鋳型、18bp－リンカーを有し、一定の合成レトロン配列で終了する （配列番号622）	gtttAagagctaggccAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAGg gcctagcAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTT GAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGCGCACATGAGG ATCACCCATGTGCAAACAAACATGCGCACCCTTAGCG AGAGGTTTATCATTAAGGTCAACCTCTGGATGTTGTT TCGGCATCCTGCATTGAATCTGAGTTACTGTCTGTTTc CCTagcgctAAAAACACCACACAACCAcgtcctccttgaagtcgatg cccttcagctcgatgcggttcaccagggtgtcgccctcgaacttcacctcggcgcgggt cttgtagttgccgtcgtccttgaagaagatggtgcgctcctggacgtagccttcgggcat ggcggacttgaagaagtcgtgctgcttcatgtggtcggggtagcgggcgaagcactgc aggccgtagcccagggtggtcacgagggtgggccagggcacgggcagcttgccggt ggtgcagatcagcttcagggtcagcttgccgtaggtggcatcgccctcgccctcgccgg acacgctgaacttgtggccgtttacgtcgccgtccagctcgaccaggatgggcaccacc ccggtgaacagctcctcgcccttgctcacCACCCCAAAAACACCACA AGGGAACCCGTTTCTTCTGACGTAAGGGTGCGCA

実施例２１

【０４９５】

ｍＫａｔｅノックインアッセイを使用した内因性ゲノム標的（ＡＣＴＢ、ＨＳＰ９０ＡＡ１）に対するアレイ化ＳＳＡＰライブラリースクリーニング。

【０４９６】

ＳＳＡＰをコードするプラスミドを精製し、定量した。

【０４９７】

陰性対照（遺伝子編集を促進することが予想されないＦｌａｇ＿ＨＡをコードする同じプラスミド）を含めて、プラスミドをコードする各ＳＳＡＰを２連で試験した。形質移入は９６ウェルプレート中で行われ、形質移入効率は５０％であると推定された。

【０４９８】

ノックイン鋳型：

１．ＨＳＰ９０ＡＡ１：ｇＣＫ２４０＋２４１、ｔｍ　６６．１Ｃ、ｍＫａｔｅ／ｐＣＫ１４５１／ｐＣＫ１４５２（ＰＣＲ鋳型として）

２．ＡＣＴＢ：ｇＣＫ１１５＋１１６、ｔｍ　６３．６Ｃ、ｍＫａｔｅ／ｐＣＫ１４５３／ｐＣＫ１４５４（ＰＣＲ鋳型ＬＧとして）

【０４９９】
形質移入の３日後、ｍＫａｔｅ陽性細胞および細胞生存率を、陽性対照（元のＲｅｃＴＳＳＡＰ）および陰性対照（Ｆｌａｇ－ＨＡ対照タンパク質）と共に全てのレプリケートにわたって定量した。ｍＫａｔｅ＋細胞の頻度が高いほど、候補ＳＳＡＰがより活性である（例えば、キロ塩基スケールの導入遺伝子の正確なノックイン編集を媒介する能力がより高い）ことを示す。同時に、哺乳動物細胞に対するＳＳＡＰの適応効果の定量化を助けるために、フローサイトメトリーによる生細胞数によって細胞生存率を測定した。
【０５００】
図８８は、ＡＣＴＢ標的およびＨＳＰ９０ＡＡ１標的についての、陰性対照に対する倍率またはｍＫａｔｅノックインのパーセントとしての編集効率および細胞生存率を示す、ＳＳＡＰアレイスクリーニングの結果を示す。図８９は、ＡＣＴＢでの編集効率と比較した、ＨＳＰ９０ＡＡでの正規化（８９Ａ）および絶対的（８９Ｂ）編集効率を示す。図８９Ｃは、ＨＳＰ９０ＡＡ１ノックインのＳＳＡＰ使用をＡＣＴＢノックインと比較した細胞生存率を示す。図９０は、全ての標的についての正規化（９０Ａ）および絶対的（９０Ｂ）細胞生存率および編集効率を比較するプロット、ならびに各ＳＳＡＰ候補についてＡＣＴＢおよびＨＳＰ９０での正規化（Ｃ）または絶対的（Ｄ）編集効率を示す棒グラフを提供する。
【０５０１】
いくつかの上位標的の関連タンパク質および配列アライメントを示すアライメントおよび系統樹を図９１、９２および９３に示す。アライメントは、予測された３Ｄ構造の領域と一致する特定の保存された領域およびモチーフを示す（例えば、図３６、図３７、図４４、図５３）。少なくとも３つの領域が高度に保存されている。（１）Ｎ末端部分は、セリン／チロシンリコンビナーゼモチーフに似たＳ／Ｎ／Ｙ－Ｒ／Ｋ－Ｆ／Ｌ／Ｉリッチ領域を有する；（２）中間部は、Ｍ－Ｒ／Ｋ－Ｒ／Ｋ－リッチ領域を有する；（３）Ｃ末端部分は、トランスポザーゼ様モチーフに類似するＤ／Ｅ－Ｄ／Ｅ－Ｆ／Ｙ領域を含む。いくつかの候補ＳＳＡＰは、これらの領域のうちの１またはそれを超えるものを有し得る。これはまた、ＳＳＡＰの予測される３Ｄ構造およびＳＳＡＰと高荷電アミノ酸を介して相同性に基づく組換えを促進するＤＮＡとの相互作用と一致する。
【０５０２】
最高スコアのＳＳＡＰタンパク質を表１２に示す。表は、２つの標的（ＨＳＰ９０およびＡＣＴＢ）の正規化平均としての編集効率、絶対的編集効率、および細胞生存率を示す。ＳＳＡＰタンパク質は、Ｕｎｉｐａｒｃ寄託番号および配列番号によって同定される。アライメント番号は、図９１、９２および９３のＳＳＡＰに対応する。

【表１２－１】

表12 - 上位スコアのSSAPタンパク質

SSAP_ID	SSAP_タンパク質_id uniparc	SSAP aa 配列番号	SSAP長	編集効率（正規化、平均、2つの標的）	編集効率（絶対的、平均、2つの標的）	細胞生存率（平均、2つの標的）	アライメント番号
SSAP_4	UPI0000030D3E	166	260	5.570396093	13.8	1.192302514	
SSAP_6	UPI000009B019	175	260	4.879114721	12.075	1.281594986	
SSAP_10	UPI000019AB49	179	260	5.750036812	14.25	1.236640684	2
SSAP_12	UPI00005F0A78	181	260	4.26258344	10.5525	1.291292719	
SSAP_15	UPI00015968D7	184	247	5.476976375	13.55	1.226370883	
SSAP_16	UPI00015C01AE	185	260	8.460844704	20.95	1.14576164	1
SSAP_20	UPI0001CE597A	189	267	5.982113642	14.85	1.173569699	
SSAP_29	UPI00025CAD2E	198	260	5.204384264	12.9225	1.130604022	
SSAP_36	UPI0002E4C0BF	205	242	6.38315582	15.8	0.94183346	3
SSAP_67	UPI000865F43D	236	264	4.616392216	11.4625	1.087954602	
SSAP_152	WP_147540090.1	321	261	6.57396273	16.25	1.158741271	4
SSAP_158	WP_051264703.1	327	272	5.439714833	13.45	0.994538899	
SSAP_172	WP_145458209.1	341	265	4.239056723	10.4925	0.904622423	
SSAP_173	WP_117787252.1	342	265	4.673521809	11.55	0.878738037	
SSAP_184	WP_060905391.1	353	218	5.689215831	14.075	0.736074079	5
SSAP_190	EIC09117.1	359	268	5.259951409	13.025	1.044246213	9
SSAP_191	WP_136046271.1	360	272	4.749640064	11.75	1.128706938	
SSAP_192	WP_136309287.1	361	272	5.371858742	13.3	1.071092146	
SSAP_193	WP_110990907.1	362	256	5.034165276	12.465	1.146734355	
SSAP_194	WP_109196224.1	363	270	4.924086254	12.175	1.138604798	
SSAP_197	PAV10712.1	366	247	5.661014037	14.025	1.020528991	6
SSAP_198	WP_147981944.1	367	250	5.524340663	13.65	0.444354117	

【表１２－２】

SSAP_199	BAQ93806.1	368	266	4.601904797	11.4025	0.518628486	
SSAP_210	WP_123127078.1	379	265	6.483753804	16.05	0.407958768	8
SSAP_211	WP_093587584.1	380	272	5.516630673	13.65	0.356287241	
SSAP_220	WP_116200709.1	389	268	4.598610157	11.375	0.915229877	
SSAP_221	WP_020135111.1	390	270	4.586503223	11.35	0.977166931	
SSAP_235	WP_148001988.1	404	264	4.251235234	10.53	0.884712362	
SSAP_262	ERL63827.1	431	260	3.675765273	9.1025	1.121804954	
SSAP_288	WP_080022455.1	457	261	3.8322433	9.4725	0.683553486	
SSAP_305	WP_051624047.1	424	179	4.612455417	11.425	0.557802727	7
SSAP_309	WP_076079849.1	478	252	3.991676483	9.885	0.922352431	
SSAP_229	WP_073846185.1	398	269	3.971178545	9.8525	0.877647599	
SSAP_陽性対照_325	EcRecT	171	269	3.807178675	9.4225	0.865096117	EcRecT

参考文献

1. D. Carroll, Genome engineering with targetable nucleases. Annu. Rev. Biochem. 83, 409-439 (2014).
2. A. Pickar-Oliver, C. A. Gersbach, The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 20, 490-507 (2019).
3. R. Barrangou, J. A. Doudna, Applications of CRISPR technologies in research and beyond. Nat. Biotechnol. 34, 933-941 (2016).

4. P. D. Hsu, E. S. Lander, F. Zhang, Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell. 157, 1262-1278 (2014).
5. J. A. Doudna, E. Charpentier, The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science. 346, 1258096 (2014).
6. J. D. Sander, J. K. Joung, CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nat. Biotechnol. 32, 347-355 (2014).
7. T. Gaj, C. A. Gersbach, C. F. Barbas, ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends Biotechnol. 31, 397-405 (2013).
8. F. D. Urnov, E. J. Rebar, M. C. Holmes, H. S. Zhang, P. D. Gregory, Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nat. Rev. Genet. 11, 636-646 (2010).
9. H. Kim, J.-S. Kim, A guide to genome engineering with programmable nucleases. Nat. Rev. Genet. 15, 321-334 (2014).
10. W. Jiang, L. A. Marraffini, CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. Annu. Rev. Microbiol. 69, 209-228 (2015).
11. A. V. Anzalone, L. W. Koblan, D. R. Liu, Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. Nat. Biotechnol. 38, 824-844 (2020).
12. M. Jasin, J. E. Haber, The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair. DNA Repair. 44, 6-16 (2016).
13. N. Maizels, L. Davis, Initiation of homologous recombination at DNA nicks. Nucleic Acids Res. 46, 6962-6973 (2018).
14. S. Q. Tsai, J. K. Joung, Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. Nat. Rev. Genet. 17, 300-312 (2016).
15. D. Kim, K. Luk, S. A. Wolfe, J.-S. Kim, Evaluating and Enhancing Target Specificity of Gene-Editing Nucleases and Deaminases. Annu. Rev. Biochem. 88, 191-220 (2019).
16. R. J. Ihry, K. A. Worringer, M. R. Salick, E. Frias, D. Ho, K. Theriault, S. Kommineni, J. Chen, M. Sondey, C. Ye, R. Randhawa, T. Kulkarni, Z. Yang, G. McAllister, C. Russ, J. Reece-Hoyes, W. Forrester, G. R. Hoffman, R. Dolmetsch, A. Kaykas, p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. Nat. Med. 24, 939-946 (2018).
17. O. M. Enache, V. Rendo, M. Abdusamad, D. Lam, D. Davison, S. Pal, N. Currimjee, J. Hess, S. Pantel, A. Nag, A. R. Thorner, J. G. Doench, F. Vazquez, R. Beroukhim, T. R. Golub, U. Ben-David, Cas9 activates the p53 pathway and selects for p53-inactivating mutations. Nat. Genet. 52, 662-668 (2020).
18. E. Haapaniemi, S. Botla, J. Persson, B. Schmierer, J. Taipale, CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. Nat. Med. 24, 927-930 (2018).
19. C. E. Dunbar, K. A. High, J. K. Joung, D. B. Kohn, K. Ozawa, M. Sadelain, Gene therapy comes of age. Science. 359, eaan4672 (2018).
20. F. Mingozzi, K. A. High, Therapeutic in vivo gene transfer f

or genetic disease using AAV: progress and challenges. Nat. Rev. Genet. 12, 341-355 (2011).
21. D. Wang, F. Zhang, G. Gao, CRISPR-Based Therapeutic Genome Editing: Strategies and In Vivo Delivery by AAV Vectors. Cell. 181, 136-150 (2020).
22. H. Shivram, B. F. Cress, G. J. Knott, J. A. Doudna, Controlling and enhancing CRISPR systems. Nat. Chem. Biol. 17, 10-19 (2021).
23. C. D. Yeh, C. D. Richardson, J. E. Corn, Advances in genome editing through control of DNA repair pathways. Nat. Cell Biol. 21, 1468-1478 (2019).
24. K. S. Pawelczak, N. S. Gavande, P. S. VanderVere-Carozza, J. J. Turchi, Modulating DNA Repair Pathways to Improve Precision Genome Engineering. ACS Chem. Biol. 13, 389-396 (2018).
25. N. G. Copeland, N. A. Jenkins, D. L. Court, Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. Nat. Rev. Genet. 2, 769-779 (2001).
26. R. Kolodner, S. D. Hall, C. Luisi-DeLuca, Homologous pairing proteins encoded by the Escherichia coli recE and recT genes. Mol. Microbiol. 11, 23-30 (1994).
27. L. M. Iyer, E. V. Koonin, L. Aravind, Classification and evolutionary history of the single-strand annealing proteins, RecT, Redbeta, ERF and RAD52. BMC Genomics. 3, 8 (2002).
28. D. L. Court, J. A. Sawitzke, L. C. Thomason, Genetic Engineering Using Homologous Recombination. Annu. Rev. Genet. 36, 361-388 (2002).
29. Y. Zhang, F. Buchholz, J. P. P. Muyrers, A. F. Stewart, A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli. Nat. Genet. 20, 123-128 (1998).
30. S. Datta, N. Costantino, X. Zhou, D. L. Court, Identification and analysis of recombineering functions from Gram-negative and Gram-positive bacteria and their phages. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 1626-1631 (2008).
31. C. Wang, J. K. W. Cheng, Q. Zhang, N. W. Hughes, Q. Xia, M. M. Winslow, L. Cong, Microbial single-strand annealing proteins enable CRISPR gene-editing tools with improved knock-in efficiencies and reduced off-target effects. Nucleic Acids Res. 49, e36-e36 (2021).
32. M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 337, 816-821 (2012).
33. L. S. Qi, M. H. Larson, L. A. Gilbert, J. A. Doudna, J. S. Weissman, A. P. Arkin, W. A. Lim, Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell. 152, 1173-1183 (2013).
34. D. Bikard, W. Jiang, P. Samai, A. Hochschild, F. Zhang, L. A. Marraffini, Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. Nucleic Acids Res. 41, 7429-7437 (2013).
35. M. L. Maeder, S. J. Linder, V. M. Cascio, Y. Fu, Q. H. Ho, J. K. Joung, CRISPR RNA-guided activation of endogenous human

genes. Nat. Methods. 10, 977-979 (2013).
36. L. A. Gilbert, M. H. Larson, L. Morsut, Z. Liu, G. A. Brar, S. E. Torres, N. Stern-Ginossar, O. Brandman, E. H. Whitehead, J. A. Doudna, W. A. Lim, J. S. Weissman, L. S. Qi, CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. Cell. 154, 442-451 (2013).
37. P. Perez-Pinera, D. D. Kocak, C. M. Vockley, A. F. Adler, A. M. Kabadi, L. R. Polstein, P. I. Thakore, K. A. Glass, D. G. Ousterout, K. W. Leong, F. Guilak, G. E. Crawford, T. E. Reddy, C. A. Gersbach, RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. Nat. Methods. 10, 973-976 (2013).
38. F. Farzadfard, S. D. Perli, T. K. Lu, Tunable and multifunctional eukaryotic transcription factors based on CRISPR/Cas. ACS Synth. Biol. 2, 604-613 (2013).
39. D. L. Jones, P. Leroy, C. Unoson, D. Fange, V. Curic, M. J. Lawson, J. Elf, Kinetics of dCas9 target search in Escherichia coli. Science. 357, 1420-1424 (2017).
40. S. H. Sternberg, S. Redding, M. Jinek, E. C. Greene, J. A. Doudna, DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. Nature. 507, 62-67 (2014).
41. S. C. Knight, L. Xie, W. Deng, B. Guglielmi, L. B. Witkowsky, L. Bosanac, E. T. Zhang, M. El Beheiry, J.-B. Masson, M. Dahan, Z. Liu, J. A. Doudna, R. Tjian, Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. Science. 350, 823-826 (2015).
42. P. A. Carr, G. M. Church, Genome engineering. Nat. Biotechnol. 27, 1151-1162 (2009).
43. K. M. Esvelt, H. H. Wang, Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. Mol. Syst. Biol. 9, 641 (2013).
44. N. Rybalchenko, E. I. Golub, B. Bi, C. M. Radding, Strand invasion promoted by recombination protein beta of coliphage lambda. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 17056-17060 (2004).
45. J. A. Mosberg, M. J. Lajoie, G. M. Church, Lambda red recombineering in Escherichia coli occurs through a fully single-stranded intermediate. Genetics. 186, 791-799 (2010).
46. J. P. Muyrers, Y. Zhang, F. Buchholz, A. F. Stewart, RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. Genes Dev. 14, 1971-1982 (2000).
47. T. M. Wannier, A. Nyerges, H. M. Kuchwara, M. Czikkely, D. Balogh, G. T. Filsinger, N. C. Borders, C. J. Gregg, M. J. Lajoie, X. Rios, C. Pal, G. M. Church, Improved bacterial recombineering by parallelized protein discovery. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 117, 13689-13698 (2020).
48. P. Noirot, R. D. Kolodner, DNA strand invasion promoted by Escherichia coli RecT protein. J. Biol. Chem. 273, 12274-12280 (1998).
49. L. C. Thomason, N. Costantino, D. L. Court, Examining a DNA Replication Requirement for Bacteriophage λ Red- and Rac Prophage RecET-Promoted Recombination in Escherichia coli. mBio. 7 (2016), doi:10.1128/mBio.01443-16.
50. P. Baumann, F. E. Benson, S. C. West, Human Rad51 protein

promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. Cell. 87, 757-766 (1996).
51. T. Sakuma, S. Nakade, Y. Sakane, K.-I. T. Suzuki, T. Yamamoto, MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. Nat. Protoc. 11, 118-133 (2016).
52. M. Charpentier, A. H. Y. Khedher, S. Menoret, A. Brion, K. Lamribet, E. Dardillac, C. Boix, L. Perrouault, L. Tesson, S. Geny, A. D. Cian, J. M. Itier, I. Anegon, B. Lopez, C. Giovannangeli, J. P. Concordet, CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair. Nat. Commun. 9, 1-11 (2018).
53. T. Gutschner, M. Haemmerle, G. Genovese, G. F. Draetta, L. Chin, Post-translational Regulation of Cas9 during G1 Enhances Homology-Directed Repair. Cell Rep. 14, 1555-1566 (2016).
54. H. A. Rees, W.-H. Yeh, D. R. Liu, Development of hRad51-Cas9 nickase fusions that mediate HDR without double-stranded breaks. Nat. Commun. 10, 1-12 (2019).
55. Z. Zhu, N. Verma, F. Gonzalez, Z.-D. Shi, D. Huangfu, A CRISPR/Cas-Mediated Selection-free Knockin Strategy in Human Embryonic Stem Cells. Stem Cell Rep. 4, 1103-1111 (2015).
56. A. Dupre, L. Boyer-Chatenet, R. M. Sattler, A. P. Modi, J.-H. Lee, M. L. Nicolette, L. Kopelovich, M. Jasin, R. Baer, T. T. Paull, J. Gautier, A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. Nat. Chem. Biol. 4, 119-125 (2008).
57. B. Budke, H. L. Logan, J. H. Kalin, A. S. Zelivianskaia, W. Cameron McGuire, L. L. Miller, J. M. Stark, A. P. Kozikowski, D. K. Bishop, P. P. Connell, RI-1: a chemical inhibitor of RAD51 that disrupts homologous recombination in human cells. Nucleic Acids Res. 40, 7347-7357 (2012).
58. F. Huang, N. A. Motlekar, C. M. Burgwin, A. D. Napper, S. L. Diamond, A. V. Mazin, Identification of specific inhibitors of human RAD51 recombinase using high-throughput screening. ACS Chem. Biol. 6, 628-635 (2011).
59. N. Hustedt, D. Durocher, The control of DNA repair by the cell cycle. Nat. Cell Biol. 19, 1-9 (2016).
60. C. J. Bostock, D. M. Prescott, J. B. Kirkpatrick, An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G1-S border. Exp. Cell Res. 68, 163-168 (1971).
61. K. Shedden, S. Cooper, Analysis of cell-cycle-specific gene expression in human cells as determined by microarrays and double-thymidine block synchronization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 4379-4384 (2002).
62. F. A. Ran, L. Cong, W. X. Yan, D. A. Scott, J. S. Gootenberg, A. J. Kriz, B. Zetsche, O. Shalem, X. Wu, K. S. Makarova, E. V. Koonin, P. A. Sharp, F. Zhang, In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. Nature. 520, 186-191 (2015).
63. R. J. Austin, T. Xia, J. Ren, T. T. Takahashi, R. W. Roberts, Designed arginine-rich RNA-binding peptides with picomolar affinity. J. Am. Chem. Soc. 124, 10966-10967 (2002).
64. S. Q. Tsai et al., GUIDE-seq enables genome-wide profiling o

f off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. Nat Biotechnol 33, 187-197 (2015).
65. C. L. Nobles et al., iGUIDE: an improved pipeline for analyzing CRISPR cleavage specificity. Genome Biol 20, 14 (2019).
66. S. Nakade et al., Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. Nat Commun 5, 5560 (2014).
67. A. Paix et al., Precision genome editing using synthesis-dependent repair of Cas9-induced DNA breaks. Proc Natl Acad Sci U S A 114, E10745-E10754 (2017).
68. O. Kanca et al., An efficient CRISPR-based strategy to insert small and large fragments of DNA using short homology arms. E life 8, (2019).
69. K. J. Tatiossian et al., Rational Selection of CRISPR-Cas9 Guide RNAs for Homology-Directed Genome Editing. Mol Ther 29, 1057-1069 (2021).

【０５０３】

本明細書で引用されている刊行物、特許出願、および特許を含む全ての参考文献は、各参考文献が個別にかつ具体的に参照により組み込まれることが示され、その全体が本明細書に記載される場合と同じ程度まで、参照により本明細書に組み込まれる。

【０５０４】

本発明を実施するための本発明者らが知る最良の態様を含む本発明の好ましい実施形態が本明細書に記載されている。前記記載を読めば、これらの好ましい実施形態の変形が当業者に自明なものとなり得る。本発明者らは、当業者が適宜このような変形を利用することを予期し、本発明者らは、本発明が本明細書に具体的に記載されているものとは異なって実施されることを意図する。したがって、本発明は、適法される法によって許容されるところにより、本明細書に添付された特許請求の範囲に記載された主題の全ての改変および均等物を含む。さらに、本明細書に別段の記載がなければ、または文脈上明らかに矛盾しなければ、全ての可能なその変形中での上記要素のあらゆる組み合わせが本発明によって包含される。

＊　＊　＊

【０５０５】

このように本発明の好ましい実施形態を詳細に説明してきたが、上記の段落によって定義される本発明は、本発明の精神または範囲から逸脱することなく多くの明らかな変形が可能であるため、上記の説明に記載された特定の詳細に限定されるものではないことを理解されたい。

【図面】

【図１】

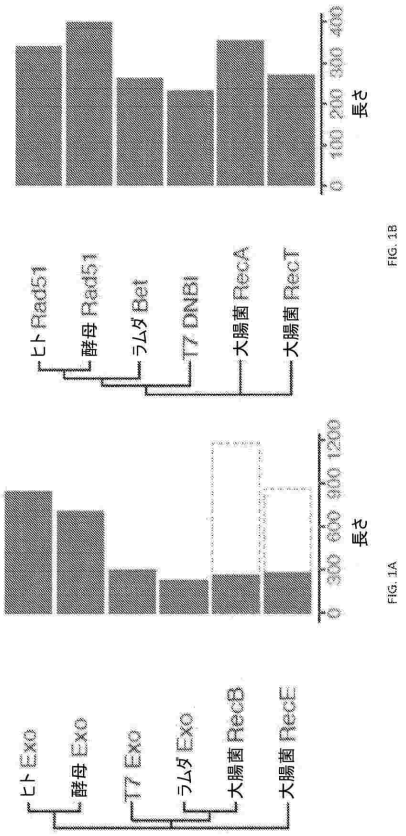


FIG. 1B

FIG. 1A

【図２－１】

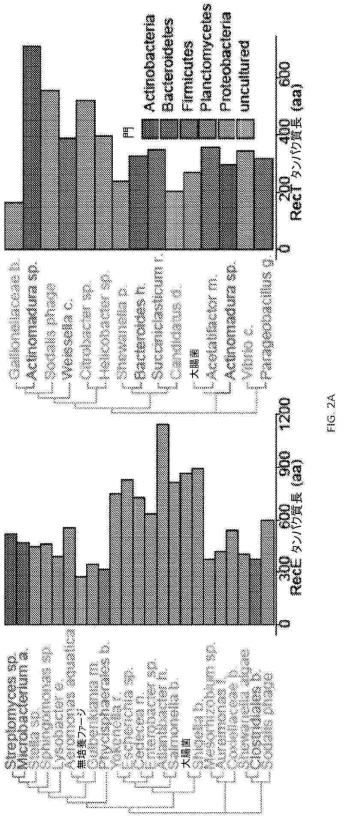


FIG. 2A

【図２－２】

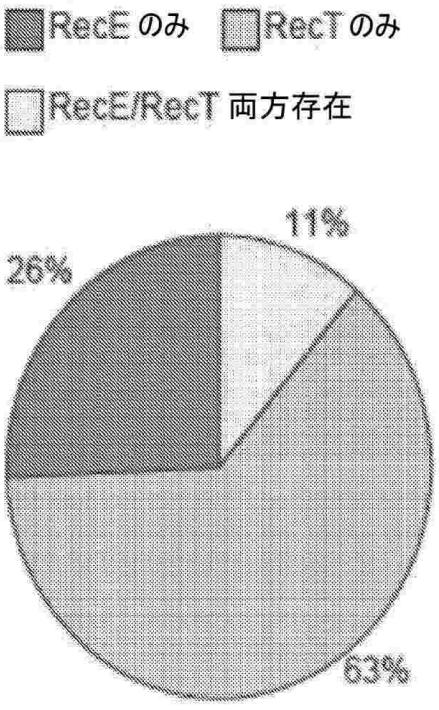


FIG. 2B

【図２－３】

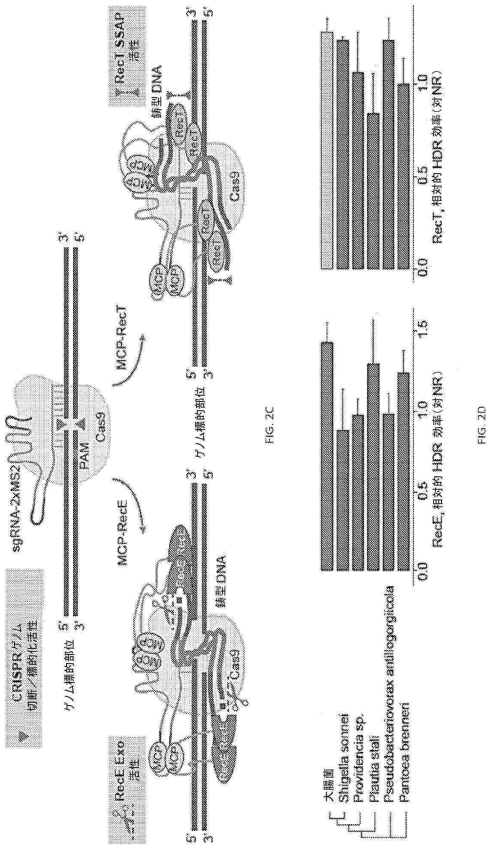


FIG. 2C

FIG. 2D

【図３－１】

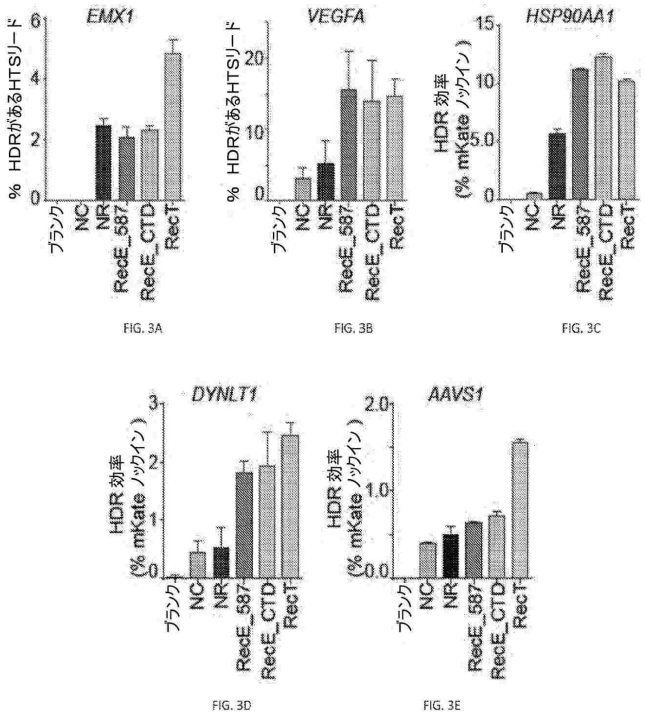


FIG. 3A FIG. 3B FIG. 3C FIG. 3D FIG. 3E

【図３－２】

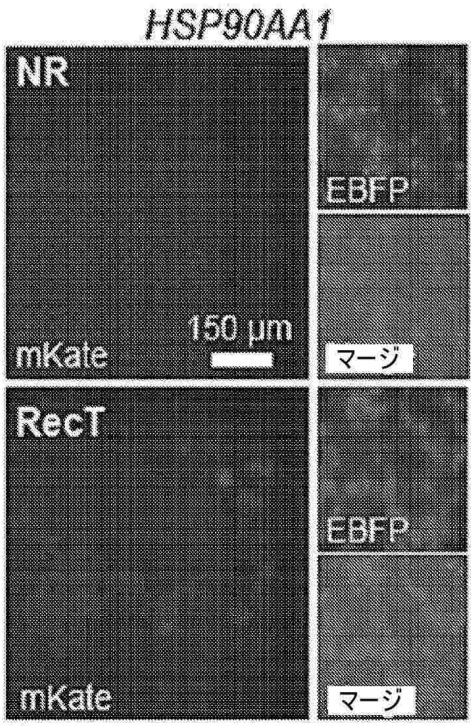


FIG. 3F

【図３－３】

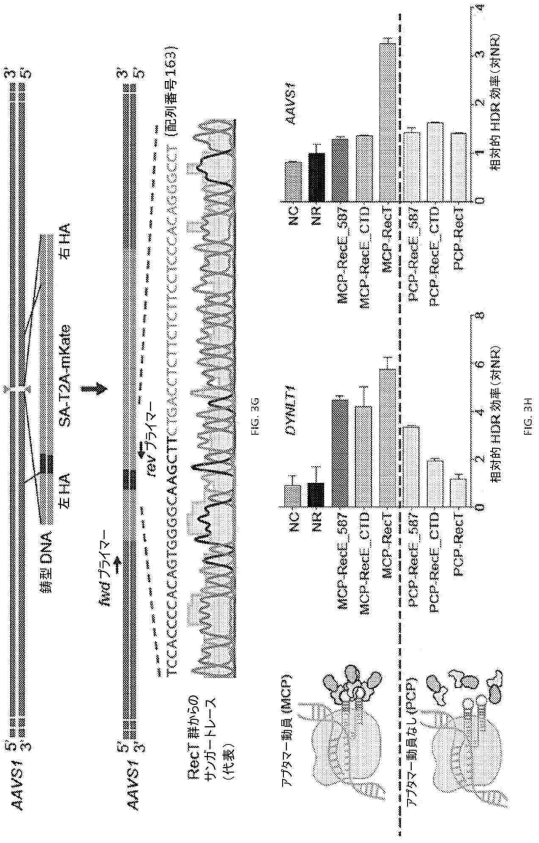


FIG. 3G FIG. 3H

【図４－１】

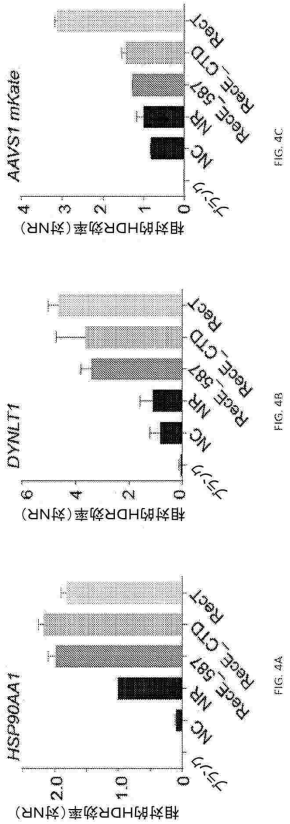
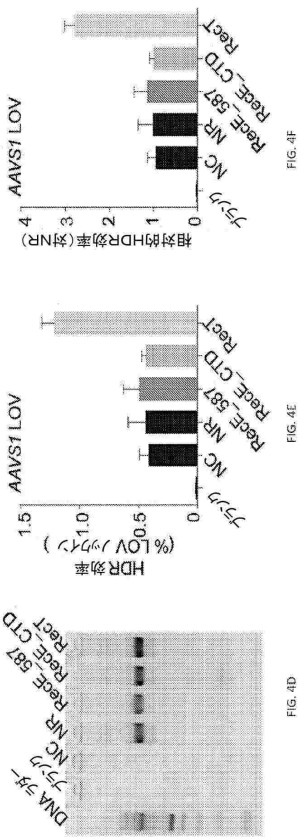
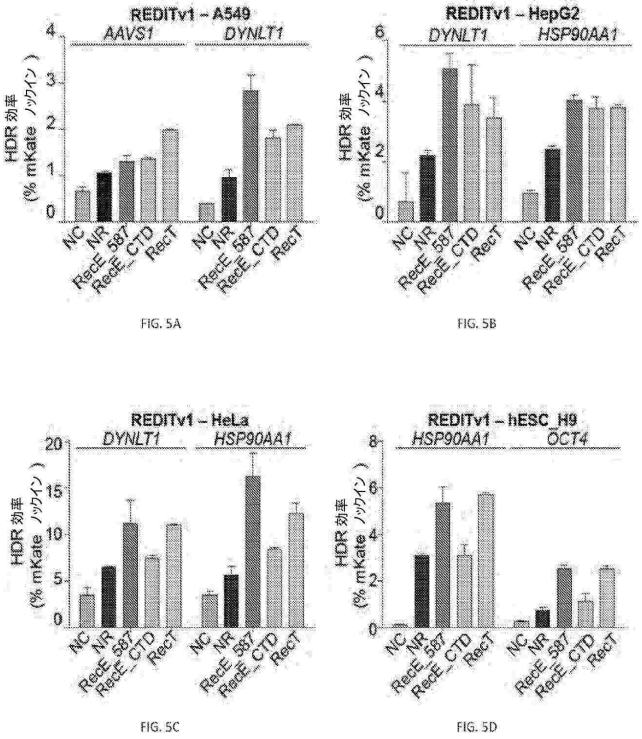


FIG. 4C FIG. 4B FIG. 4A

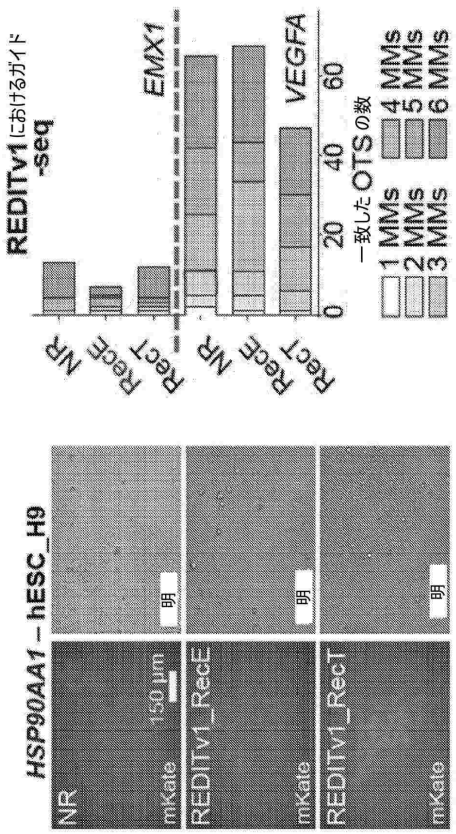
【図４－２】



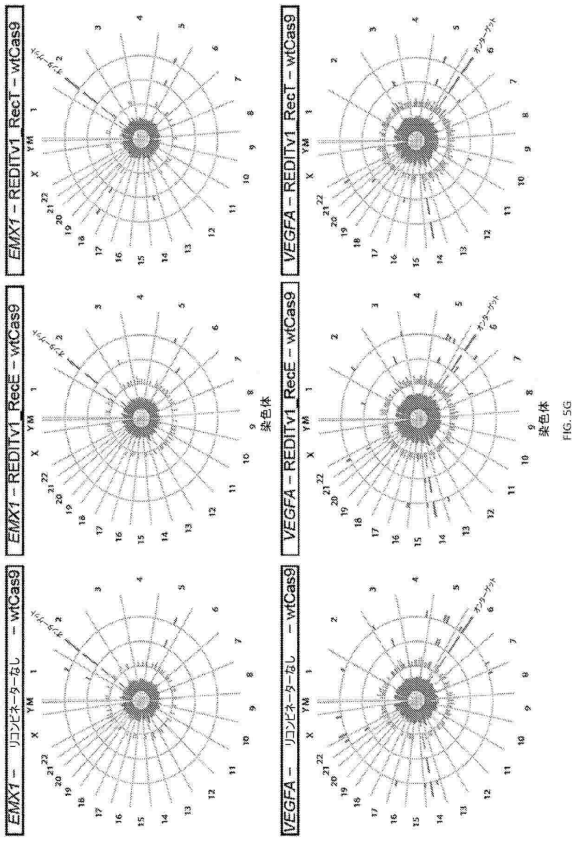
【図５－１】



【図５－２】



【図５－３】



【図６－１】

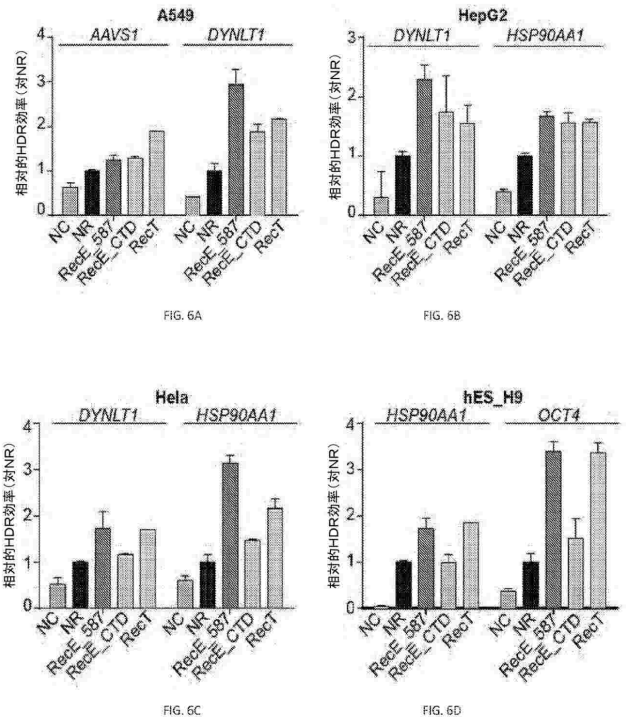


FIG. 6A FIG. 6B FIG. 6C FIG. 6D

【図６－２】

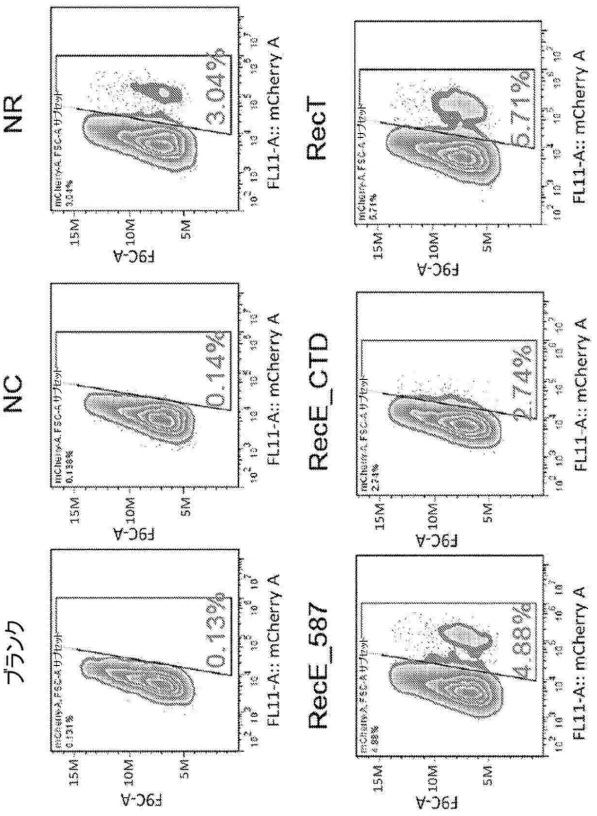


FIG. 6E

【図７－１】

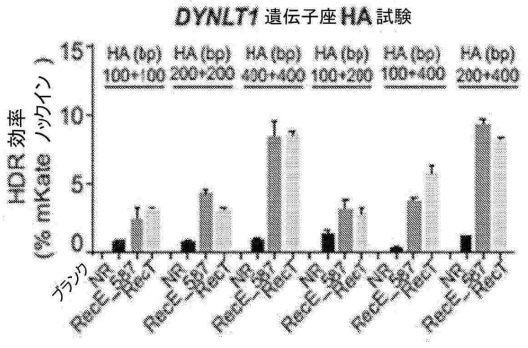


FIG. 7A

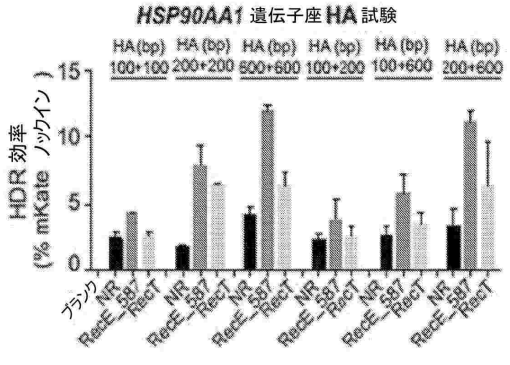


FIG. 7B

【図７－２】

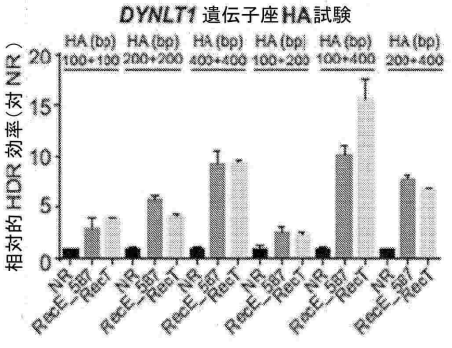


FIG. 7C

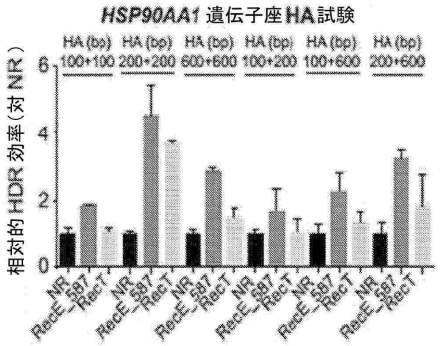


FIG. 7D

【図８】

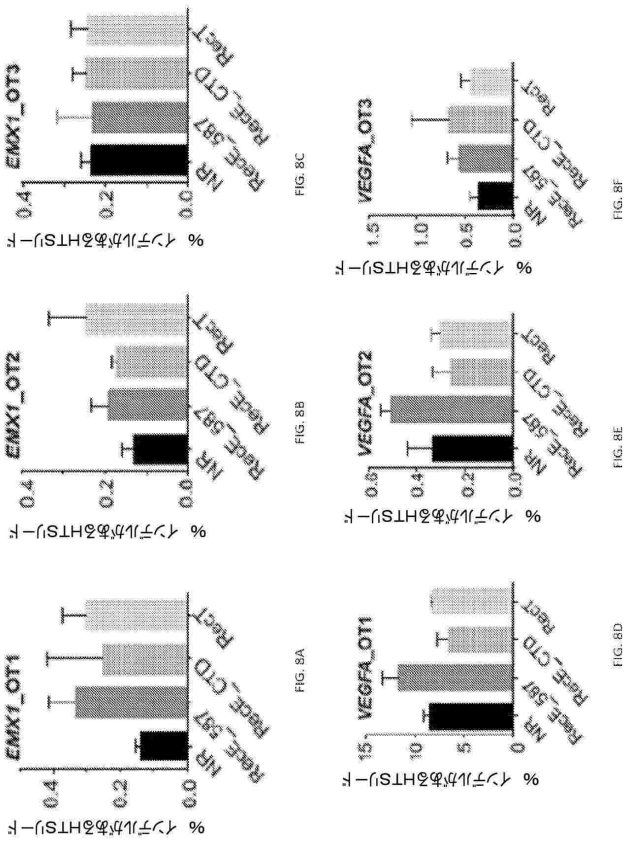


FIG. 8C
FIG. 8B
FIG. 8A

【図９－１】

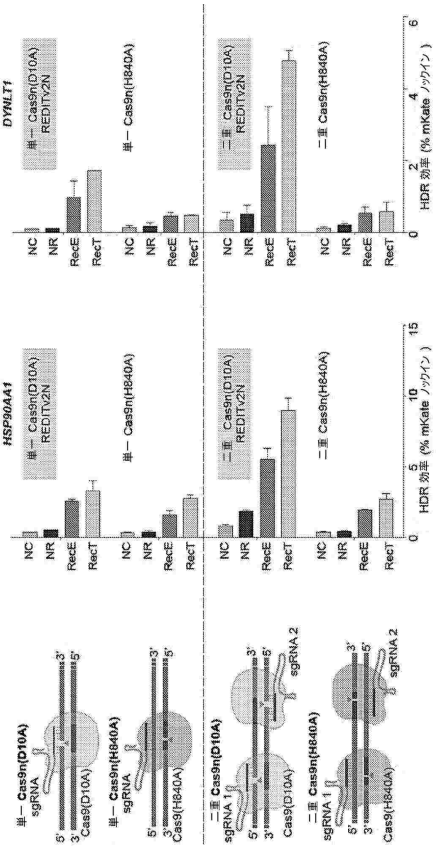


FIG. 8F
FIG. 8E
FIG. 8D
FIG. 9A

【図９－２】

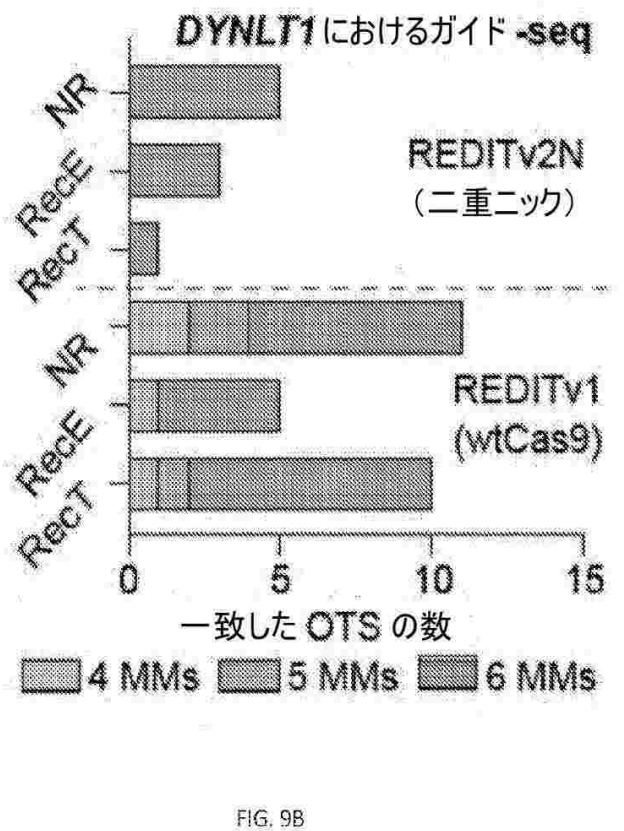


FIG. 9B

【図９－３】

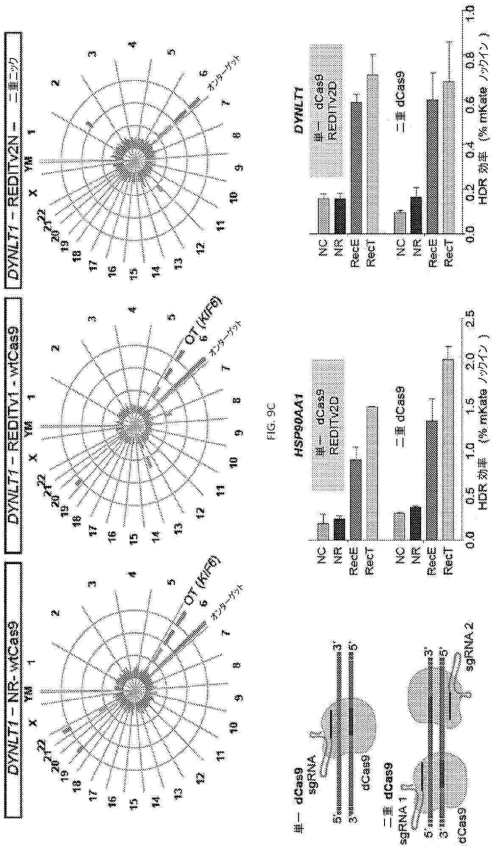


FIG. 9C
FIG. 9D

【図９－４】

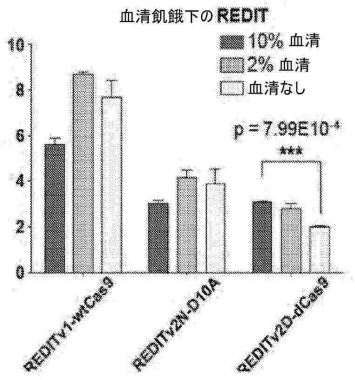


FIG. 9E

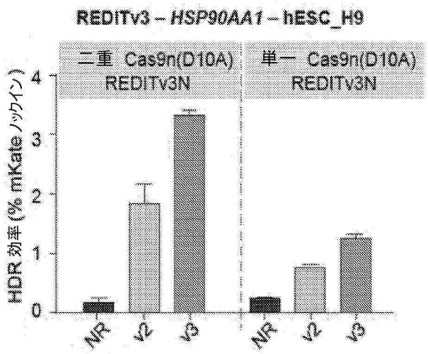


FIG. 9F

【図９－５】

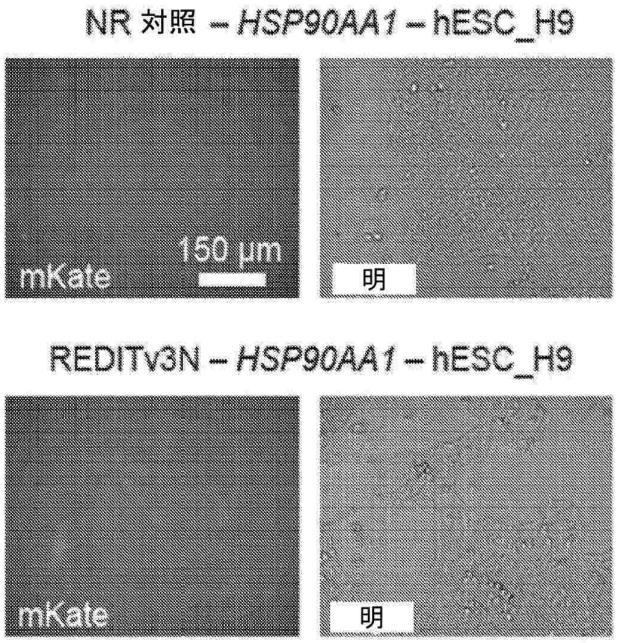


FIG. 9G

【図１０－１】

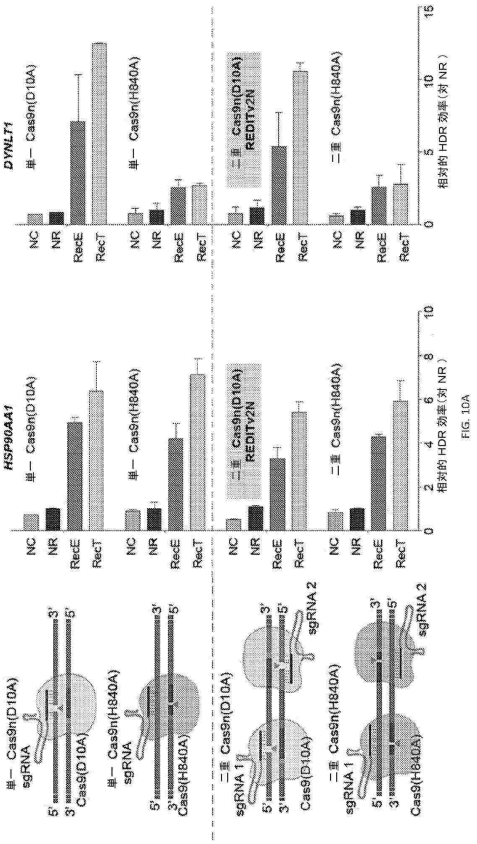


FIG. 10A

【図１０－２】

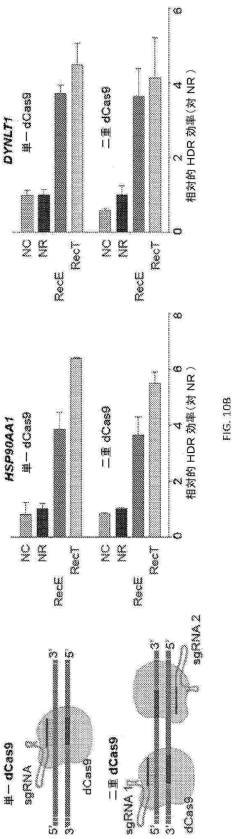


FIG. 10B

【図１１】

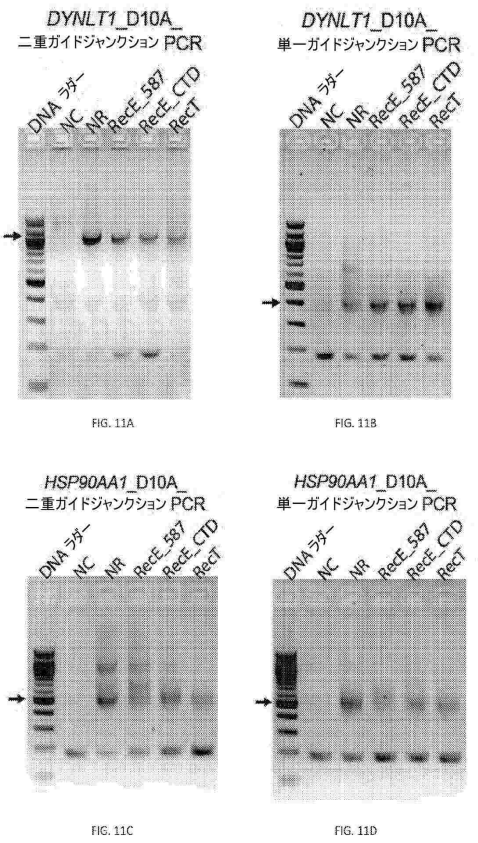


FIG. 11A FIG. 11B FIG. 11C FIG. 11D

【図１２－１】

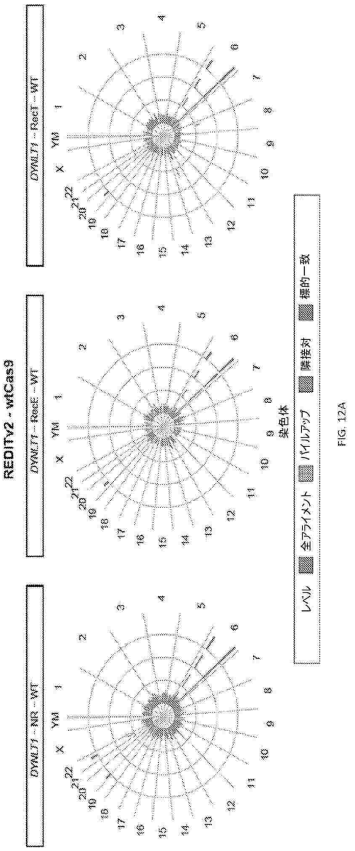


FIG. 12A

【図１２－２】

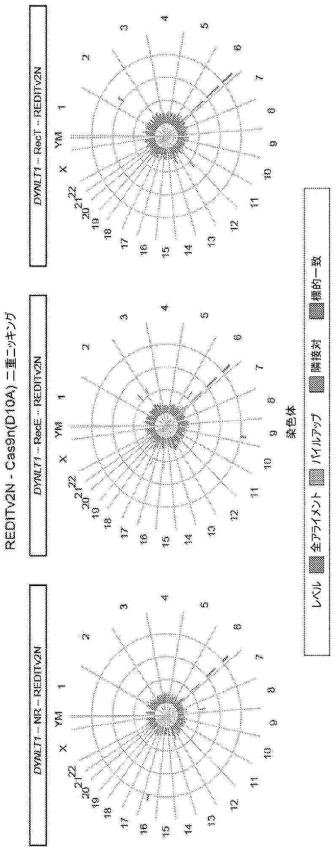


FIG. 12B

【図１２－３】

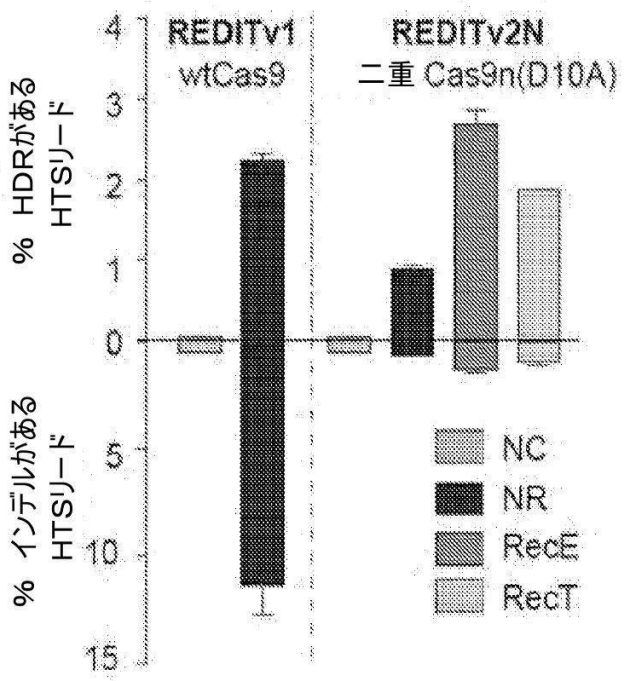


FIG. 12C

【図１３－１】

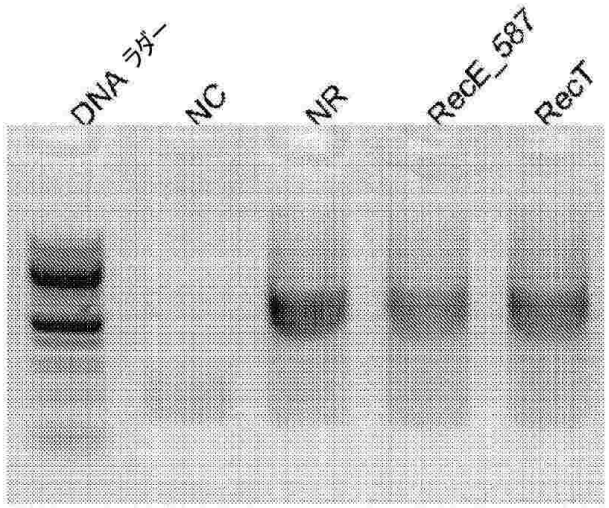


FIG. 13A

【図１３－２】

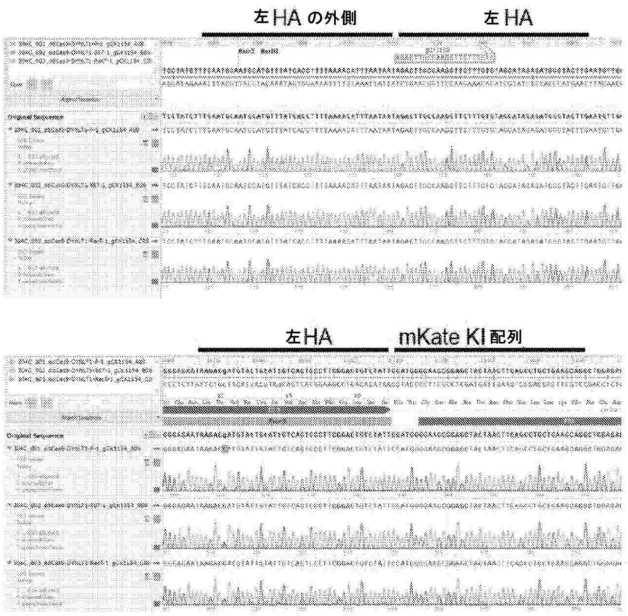


FIG. 13B

【図１４】

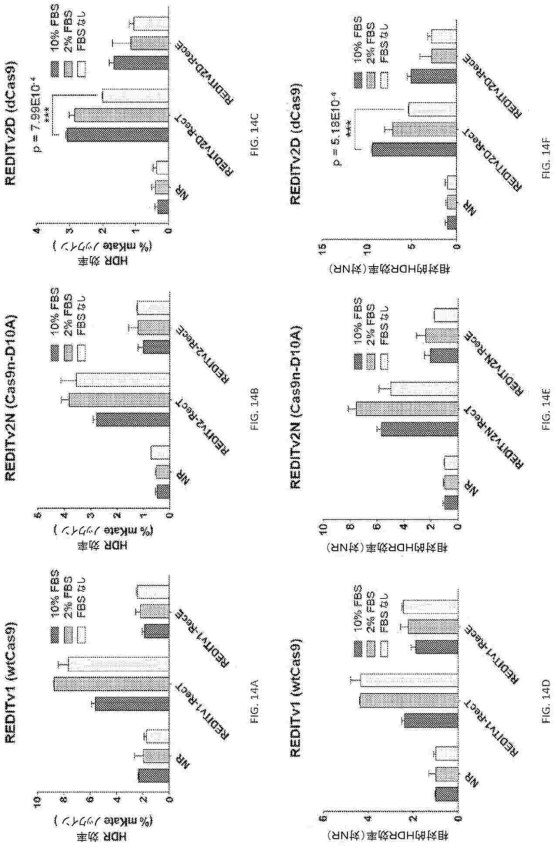


FIG. 14A FIG. 14B FIG. 14C FIG. 14D FIG. 14E FIG. 14F

【図１５】

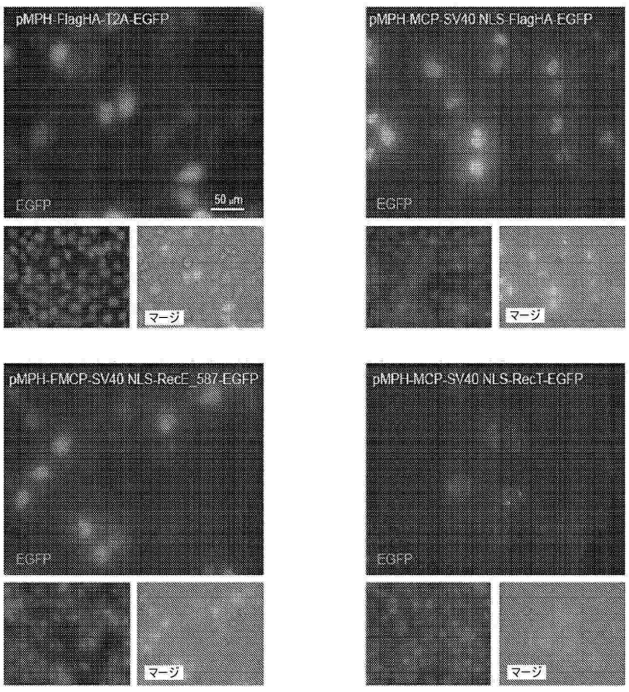


FIG. 15

【図１６－１】

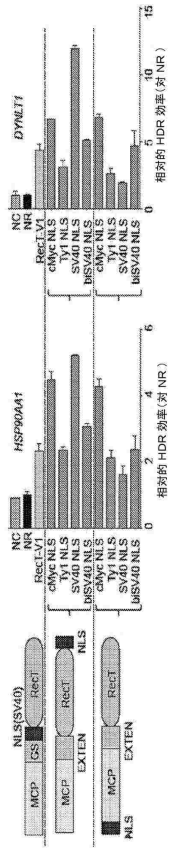


FIG. 16A

【図１６－２】

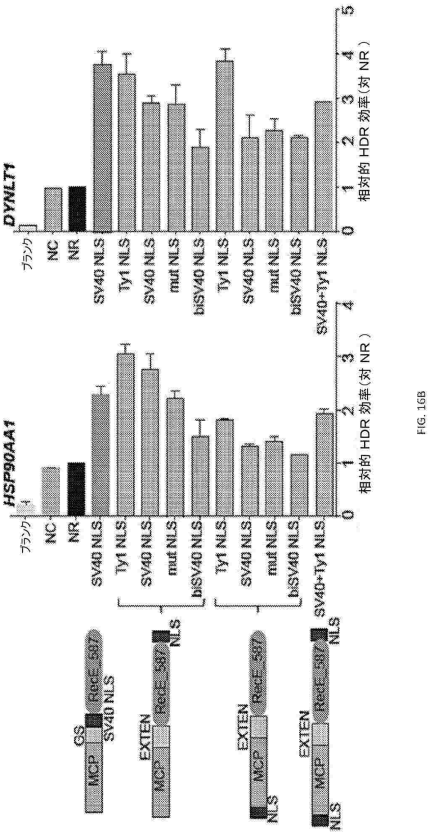


FIG. 16B

【図１６－３】



FIG. 16C

【図１６－４】

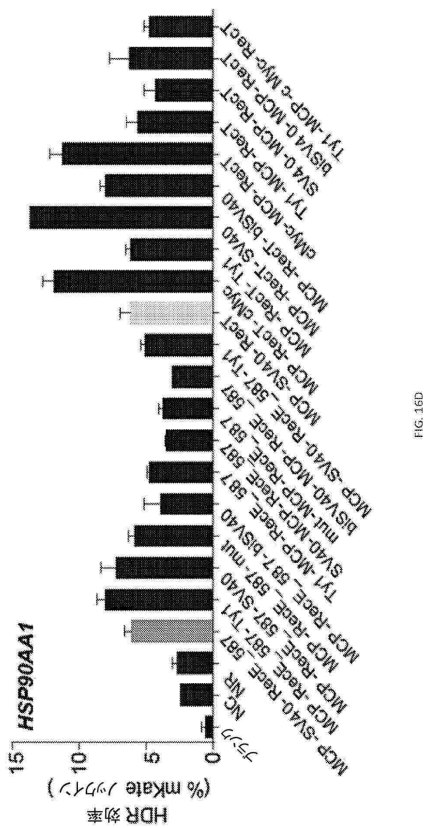


FIG. 16D

【図１７－１】

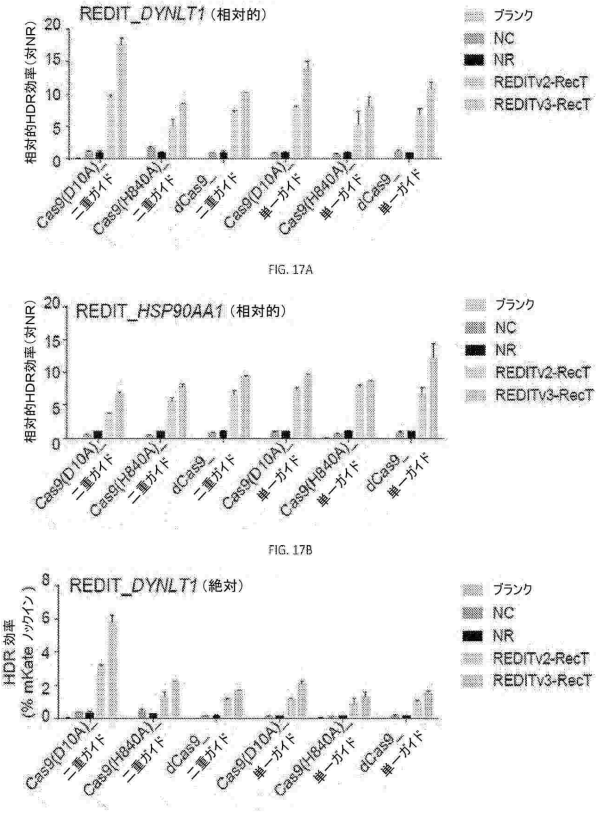


FIG. 17A

FIG. 17B

FIG. 17C

【図１７－２】

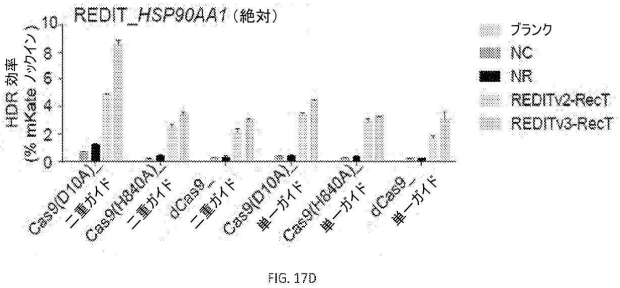


FIG. 17D

【図１８】

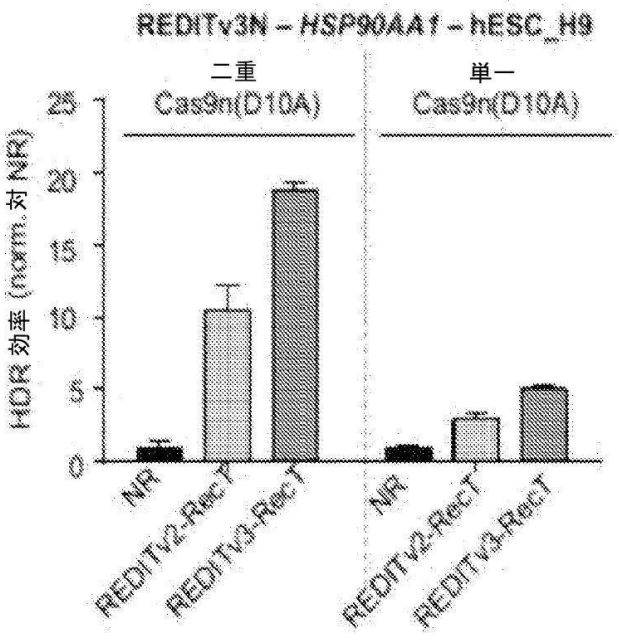


FIG. 18

【図１９－１】

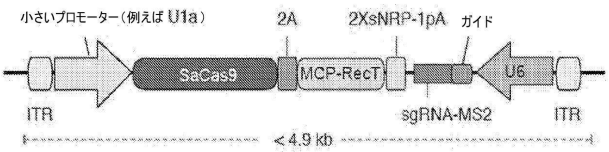


FIG. 19A

【図１９－２】

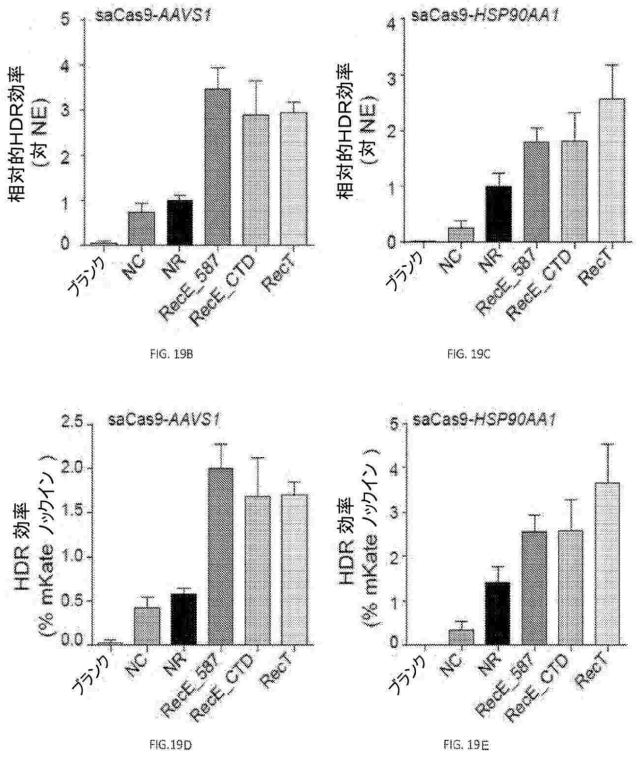


FIG. 19B FIG. 19C FIG.19D FIG. 19E

【図２０－１】

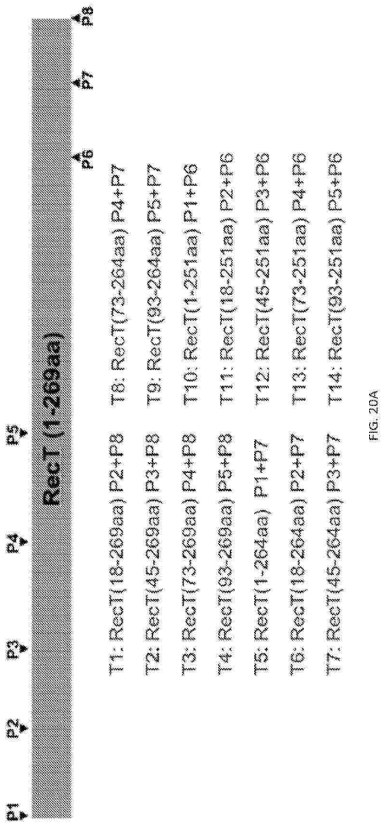


FIG. 20A

【図２０－２】

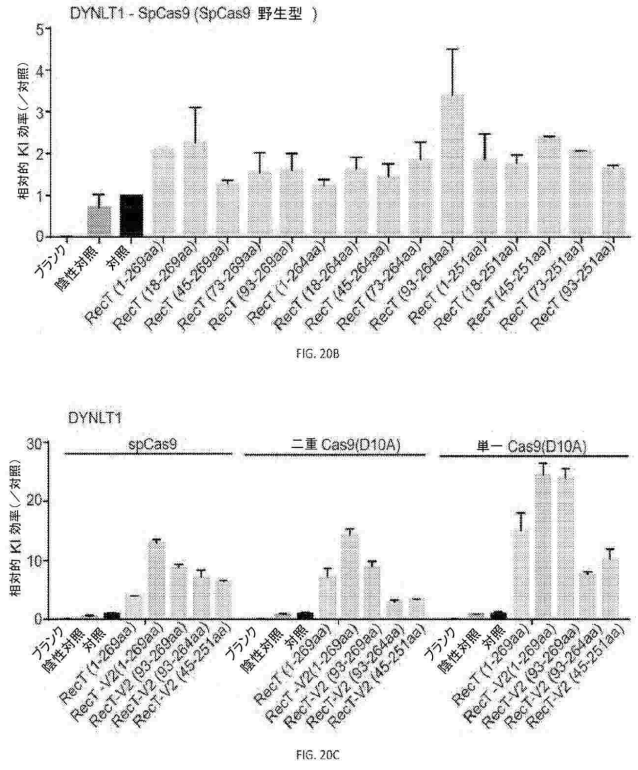


FIG. 20B FIG. 20C

【図２１－１】

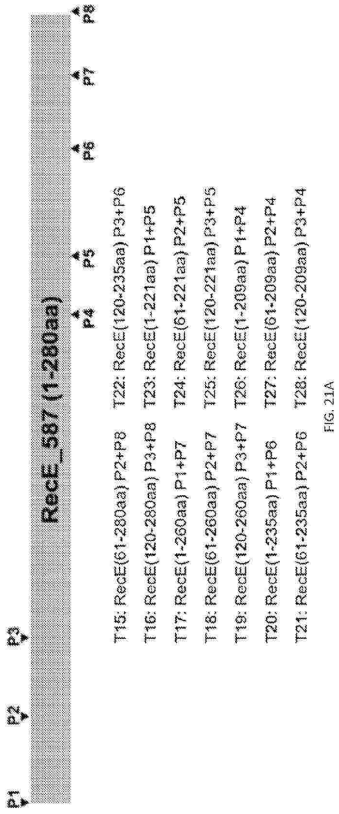


FIG. 21A

【図２１－２】

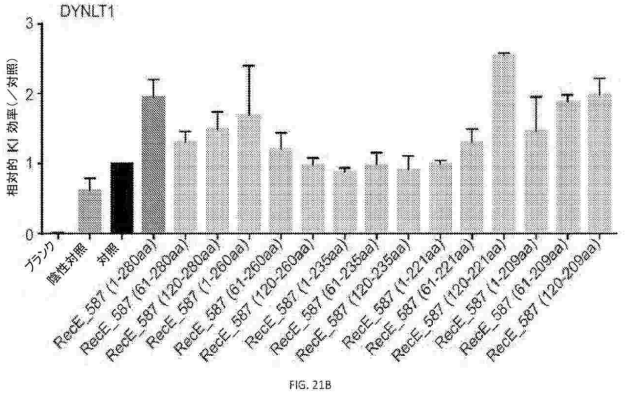


FIG. 21B

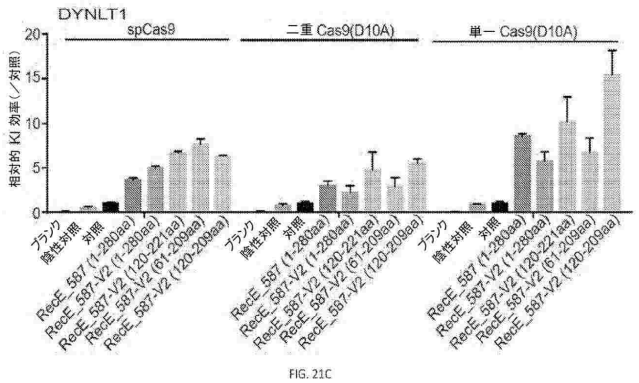


FIG. 21C

【図２２】

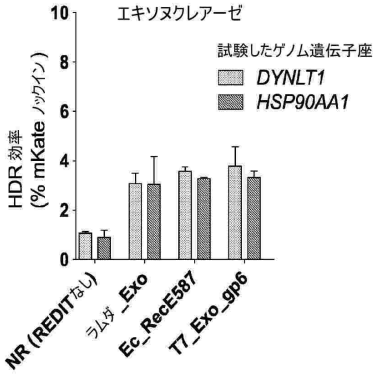


FIG. 22A

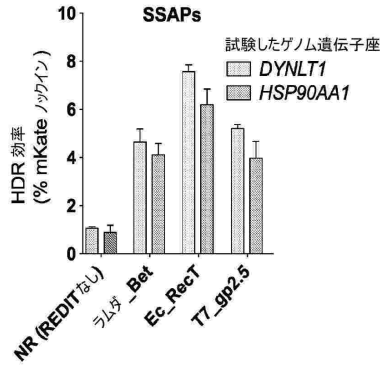


FIG. 22B

【図２３－１】

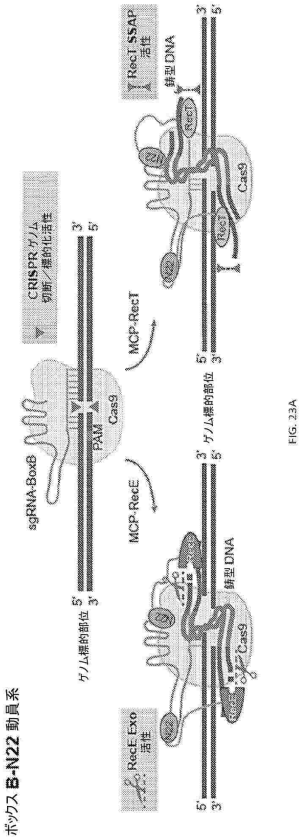


FIG. 23A

【図２３－２】

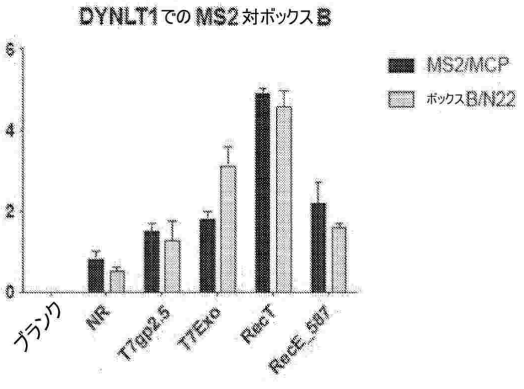


FIG. 23B

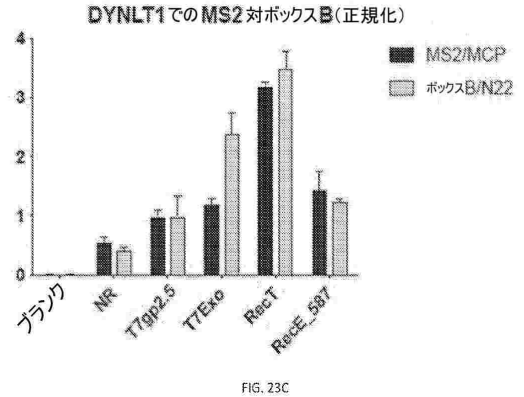


FIG. 23C

【図２３－３】

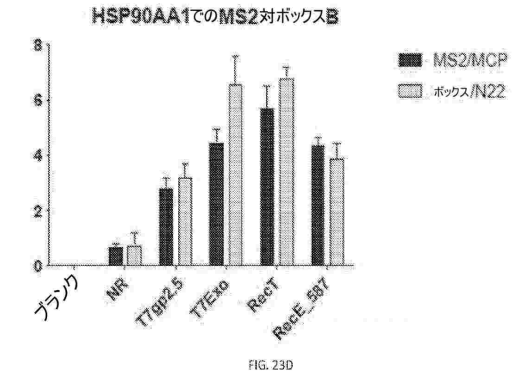


FIG. 23D

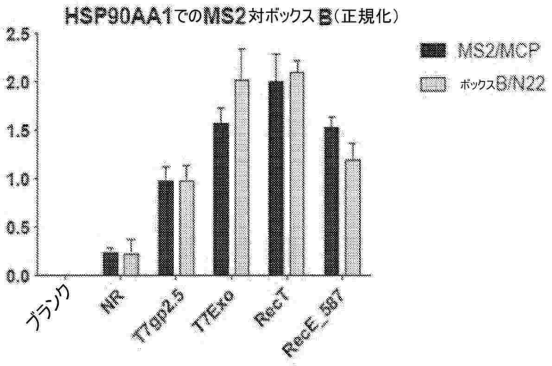


FIG. 23E

【図２４－１】

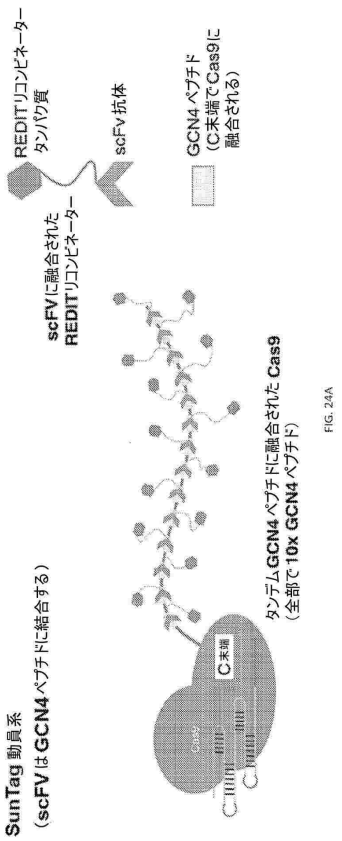


FIG. 24A

【図２４－２】

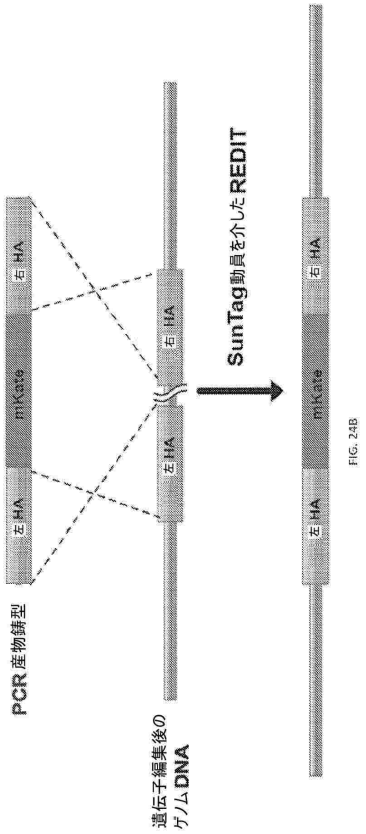


FIG. 24B

【図２４－３】

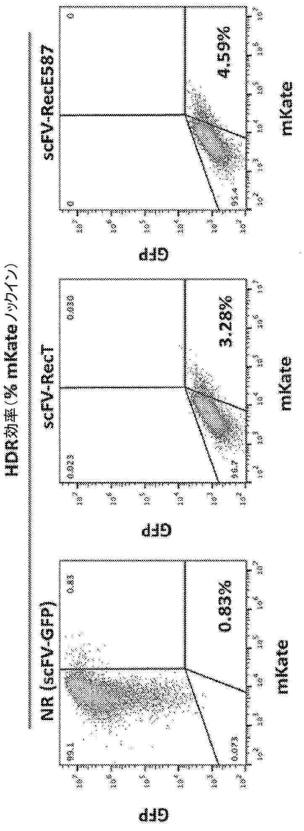


FIG. 24C

【図２５－１】

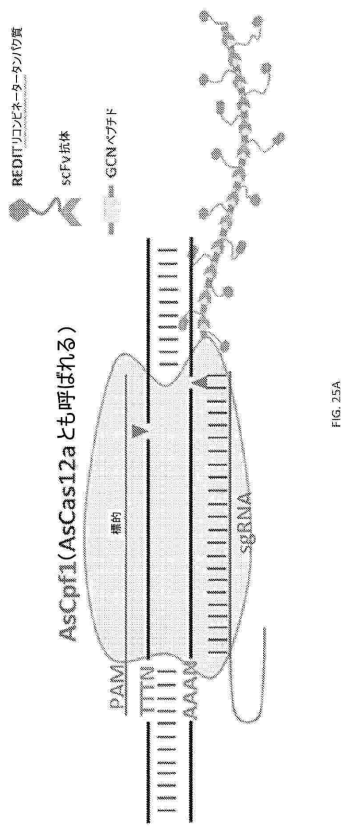


FIG. 25A

【図２５－２】

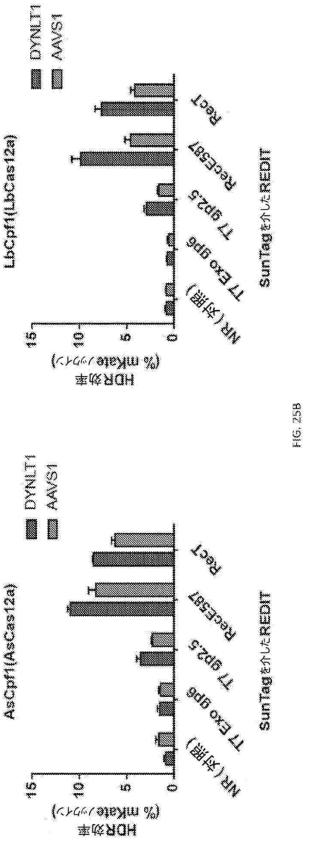


FIG. 25B

【図２６－１】

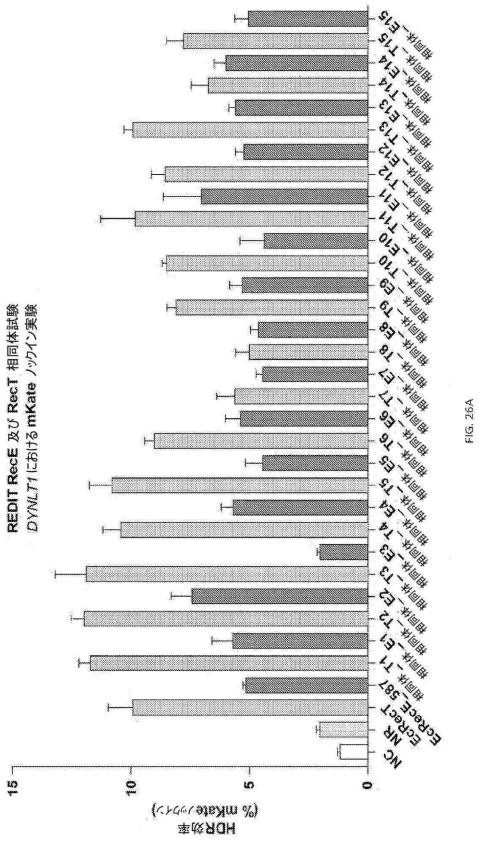


FIG. 26A

【図２６－２】

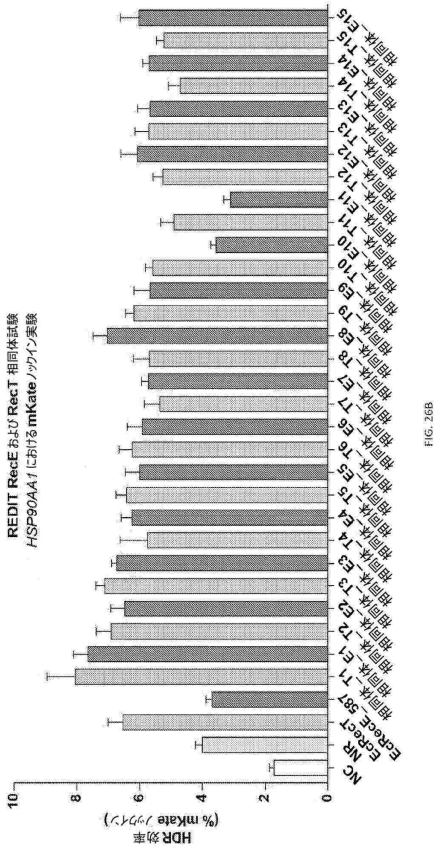


FIG. 26B

【図２７】

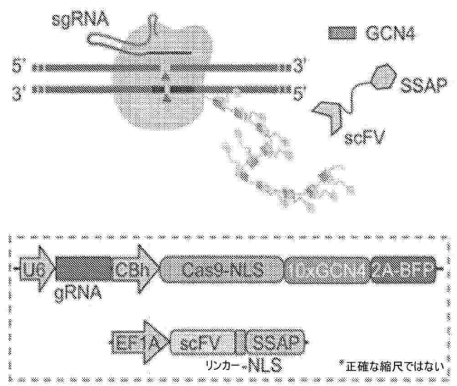


FIG. 27A

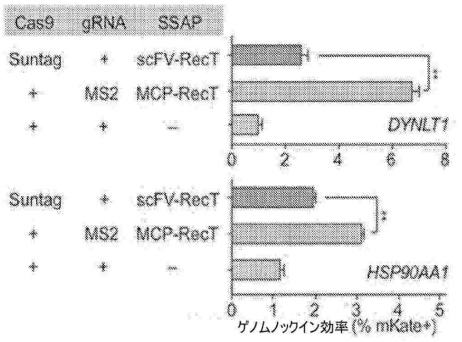


FIG. 27B

【図２８】

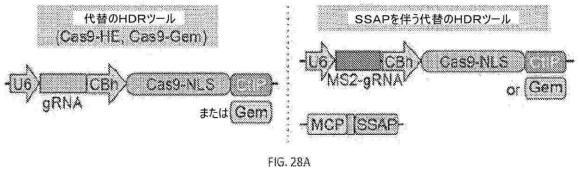


FIG. 28A

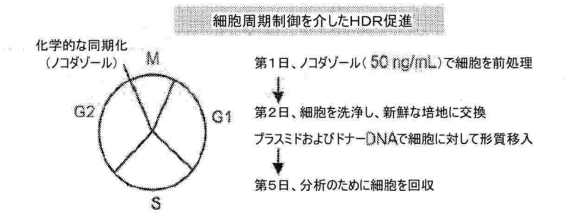


FIG. 28B

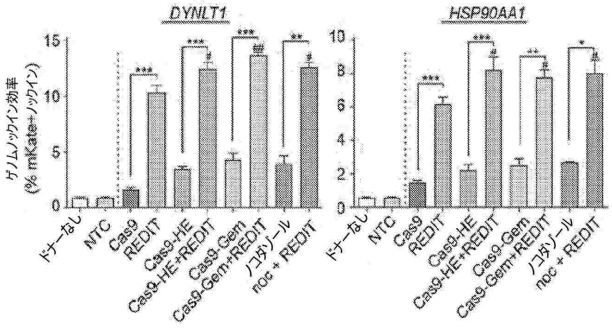


FIG. 28C

【図２９－１】

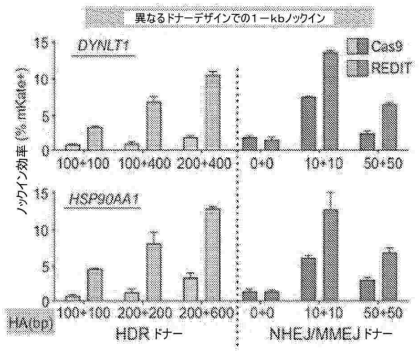


FIG. 29A

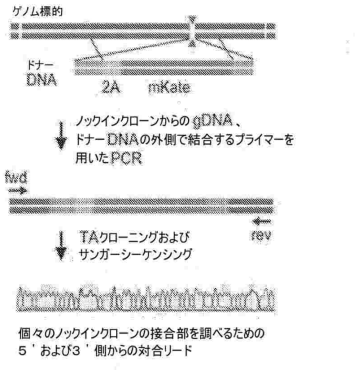


FIG. 29B

【図２９－２】

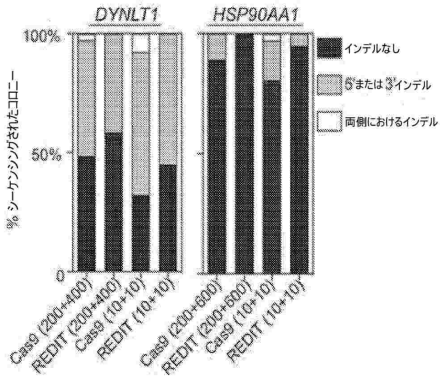


FIG. 29C

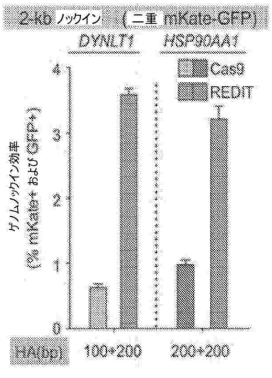
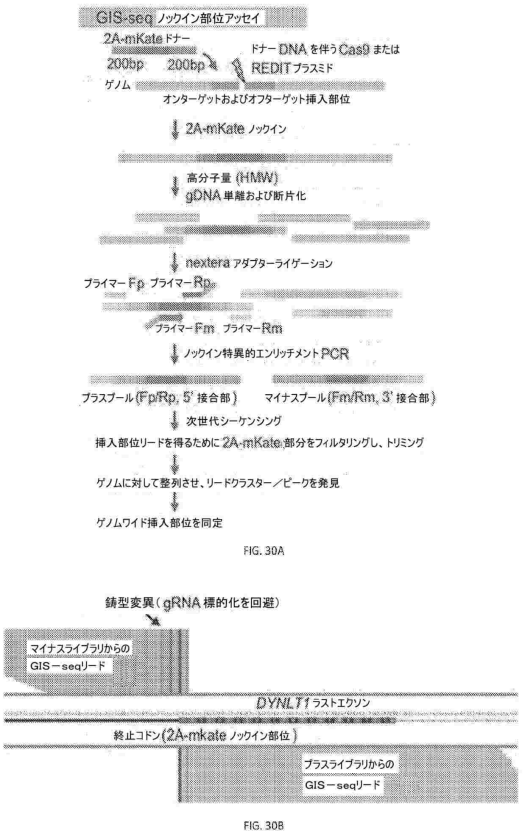
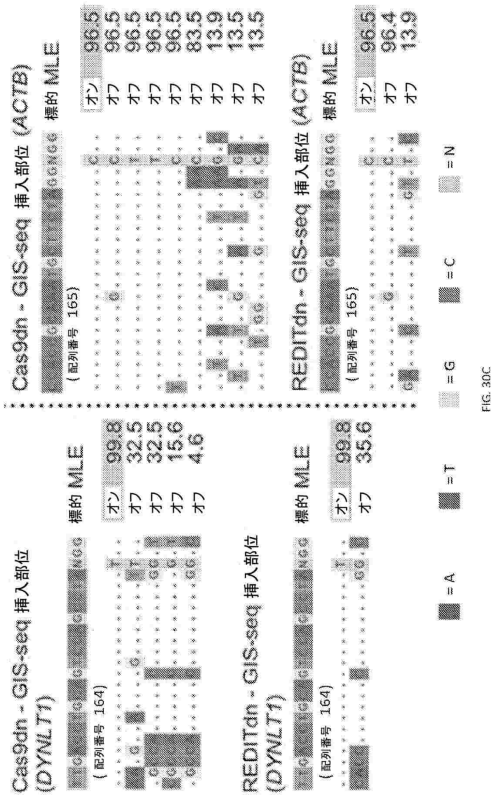


FIG. 29D

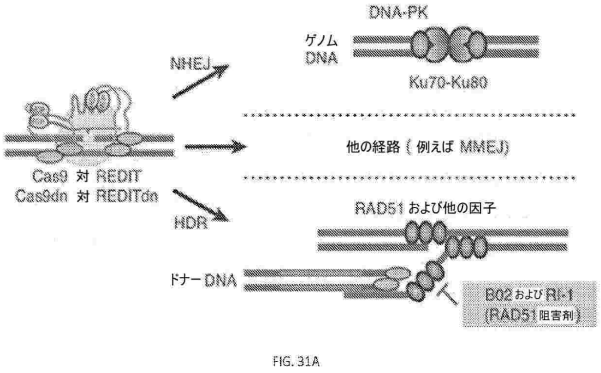
【図３０－１】

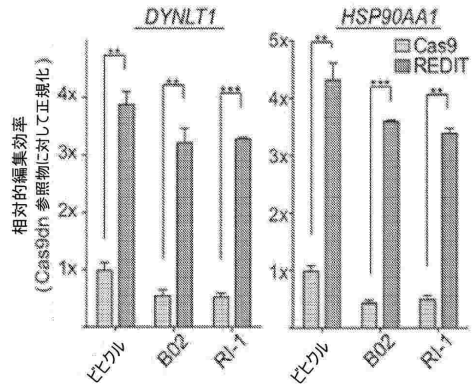


【図３０－２】

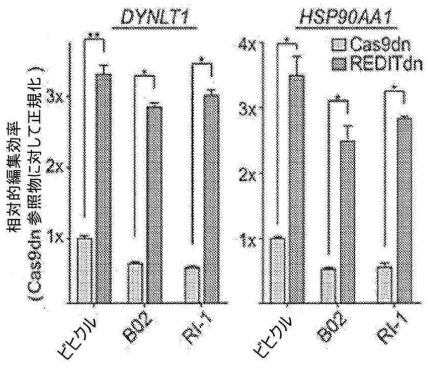


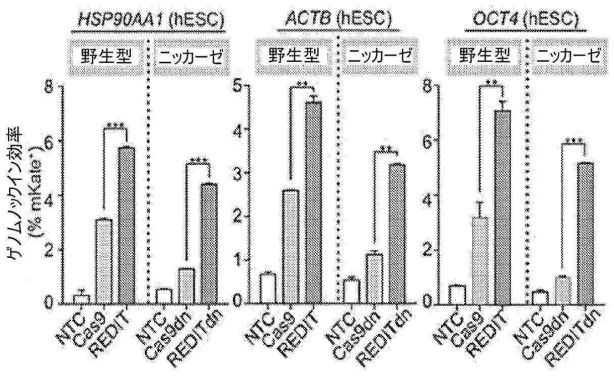
【図３１－１】





【図３１－２】





【図３１－３】

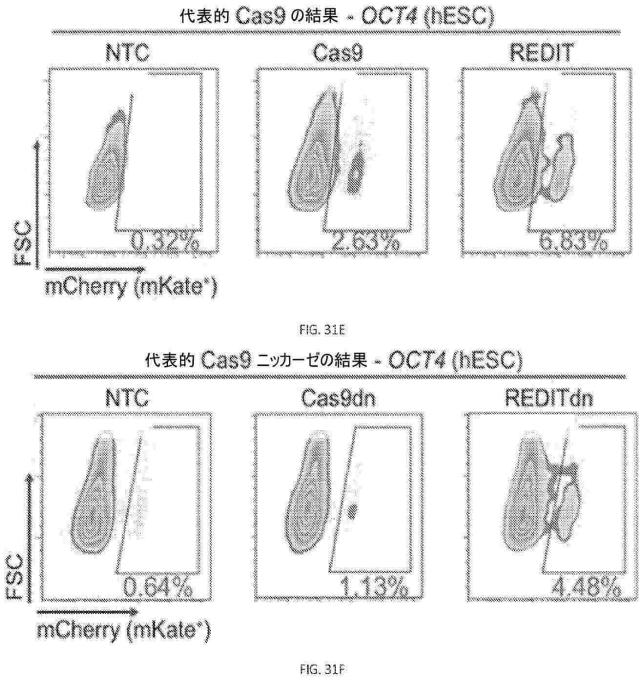


FIG. 31E

FIG. 31F

【図３２－１】

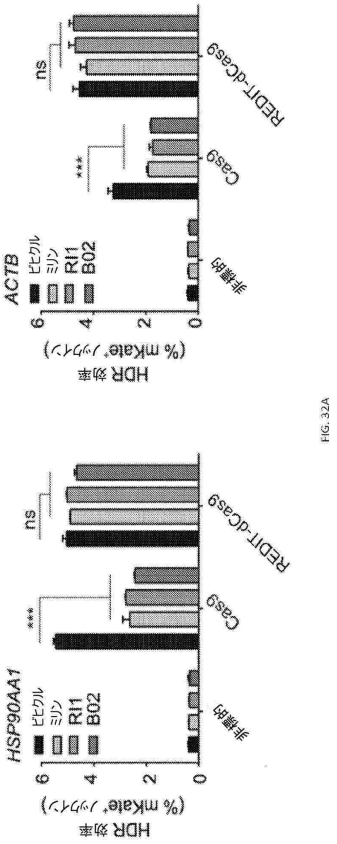


FIG. 32A

【図３２－２】

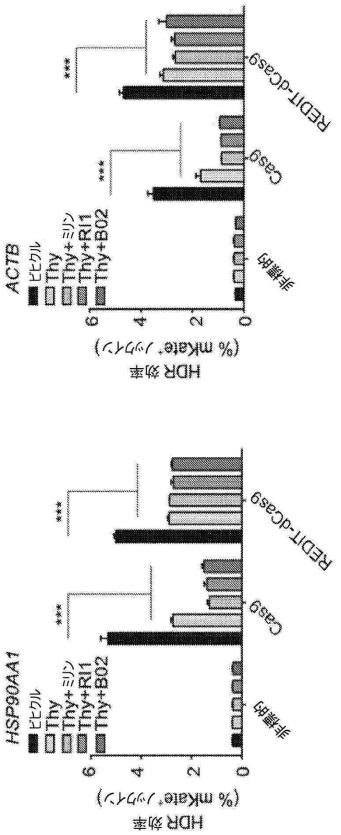
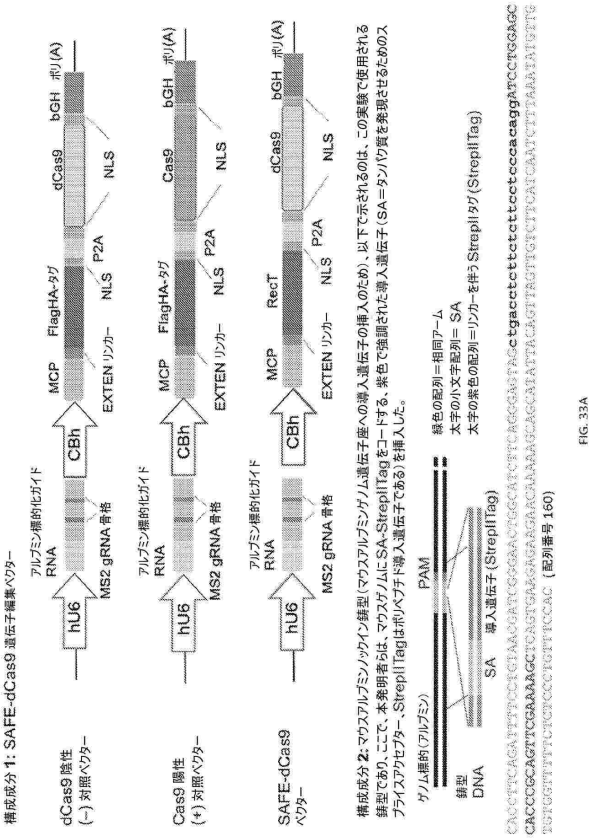


FIG. 32B

【図３３－１】


構成成分 1: SAFE-dCas9 遺伝子編集ベクター
dCas9 陰性
(−) 対照ベクター
Cas9 陽性
(+) 対照ベクター
SAFE-dCas9
ベクター
アルブミン標的化ガイド RNA
hU6
MS2 gRNA 骨格
CBh
MCP
FlagHA-タグ
dCas9
Cas9
RecT
EXTEN リンカー
NLS
P2A
bGH ポリ(A)
構成成分 2: マウスアルブミンソックイン鋳型（マウスアルブミン遺伝子座への導入遺伝子の挿入のため）。以下で示されるのは、この実験で使用される鋳型であり、ここで、本発明者らは、マウスゲノムにSA-StrepIIタグをコードする、紫色で強調された導入遺伝子（SA＝タンパク質を発現させるためのスプライスアセプター、StrepIIタグは ポリペプチド導入遺伝子である）を挿入した。
ゲノム標的（アルブミン）
PAM
鋳型 DNA
SA
導入遺伝子（StrepIIタグ）
緑色の配列＝相同アーム
太字の小文字配列＝ SA
太字の紫色の配列＝リンカーを伴う StrepIIタグ (StrepIIタグ)
CACCGCAGTTCGAAAAGCTCAGTTGAAAAGAGAGCAAAAAAGCAGCGAATTACAGTTGTTCTTCAATCAATCTTTAAATATGTTG
GTGTCAAGTCTTTTCGAGTTTTCGTCAACTTTTCTCGTCTTTCTAATGTTAAGTCATAATGTTTAGTTAGAAATTTATACAAC

【図３３－２】

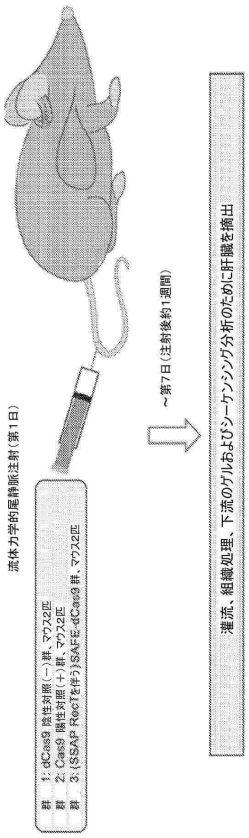


FIG. 33B

【図３４－１】

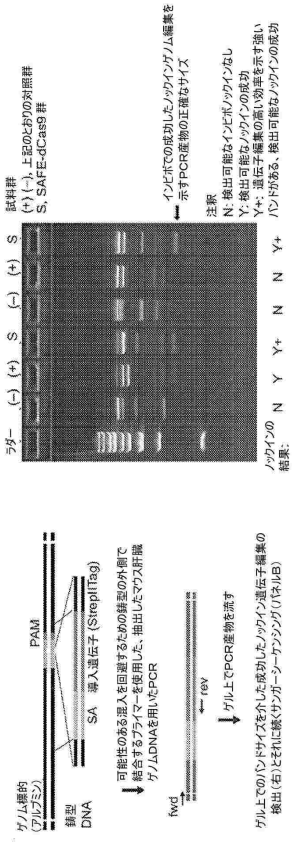


FIG. 34A

【図３４－２】

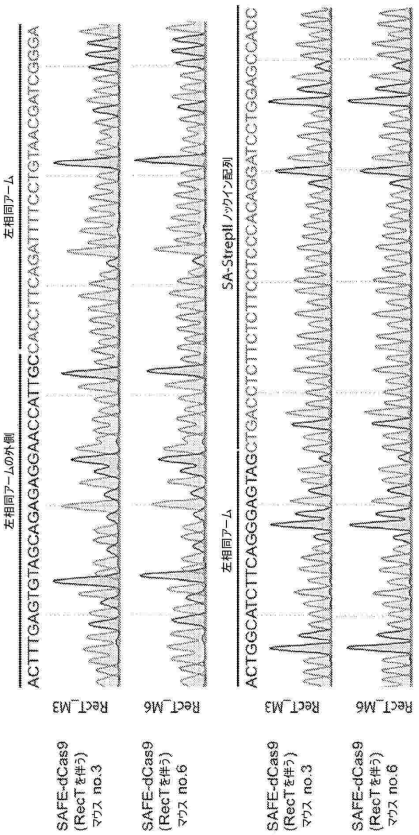


FIG. 34B

【図３４－３】

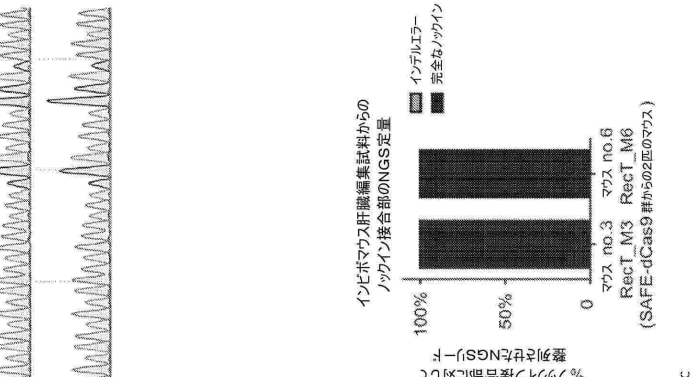


FIG. 34C

【図３５－１】

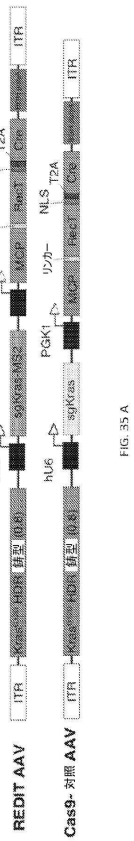


FIG. 35 A

【図３５－２】

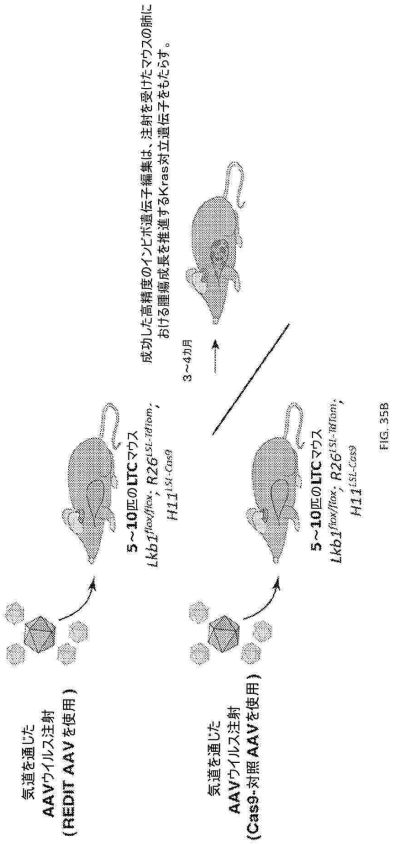


FIG. 35B

【図３５－３】

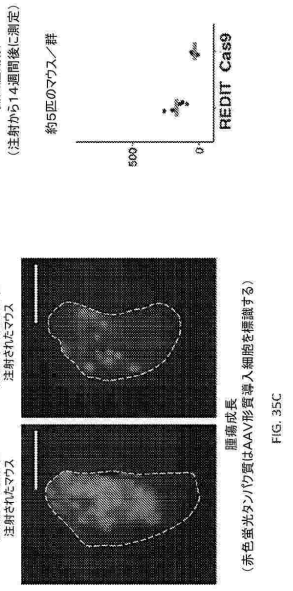


FIG. 35C

【図３６】

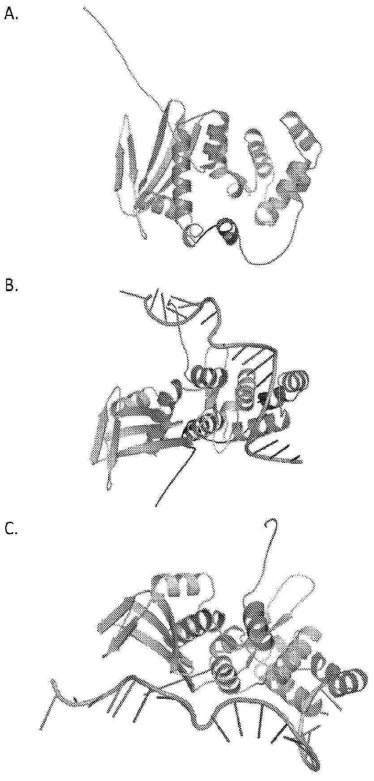


FIG. 36A-36C

【図３７－１】

受容体界面残基：

GLN	4A	4.107
VAL	24A	4.854
ASN	26A	2.727
SER	27A	3.416
ILE	30A	3.104
SER	31A	4.084
ASN	34A	3.111
LYS	39A	4.841
ARG	48A	3.943
HIS	49A	2.318
THR	51A	3.160
GLU	53A	2.512
ARG	54A	2.270
ILE	56A	3.968
ARG	57A	3.090
SER	85A	4.952
LEU	87A	4.951
GLY	88A	2.177
LEU	89A	3.838
LEU	95A	3.003
HIS	97A	3.069
ASP	126A	2.449
ARG	129A	3.757
ARG	130A	2.577
SER	136A	4.726
SER	138A	4.398
ARG	140A	2.675
PRO	162A	4.247
GLU	164A	2.527
GLU	166A	2.186

#リガンド界面残基：

DT	13D	2.527
DG	14D	3.334
DA	15D	2.186
DG	16D	4.247
DA	17D	2.675
DC	18D	2.871
DG	19D	3.757
DC	20D	3.793
DT	21D	3.003
DG	22D	2.177
DG	23D	2.318
DC	24D	2.270
DG	25D	3.581
DA	26D	3.090
DT	27D	2.512
DT	28D	4.400
DA	29D	3.111
DG	30D	2.727

受容体ーリガンド界面残基ペア

4A	-	19D	4.107
24A	-	30D	4.854
26A	-	29D	3.037
26A	-	30D	2.727
27A	-	30D	3.416
30A	-	29D	4.430
30A	-	30D	3.104
31A	-	30D	4.084
34A	-	29D	3.111
34A	-	30D	3.212
39A	-	29D	4.841
39A	-	30D	4.925
48A	-	24D	3.943
49A	-	22D	4.536
49A	-	23D	2.318
49A	-	24D	3.501
49A	-	25D	4.897
51A	-	25D	4.782
51A	-	26D	3.160
53A	-	26D	3.441
53A	-	27D	2.512
53A	-	28D	4.400
54A	-	23D	3.414
54A	-	24D	2.270
54A	-	25D	4.140
54A	-	26D	4.161
56A	-	29D	3.968
57A	-	26D	4.108
57A	-	25D	3.581
57A	-	26D	3.090
57A	-	27D	4.720
85A	-	23D	4.952
87A	-	22D	4.951
88A	-	21D	4.303
88A	-	22D	2.177
88A	-	23D	4.533
89A	-	22D	3.838
95A	-	20D	3.993
95A	-	21D	3.003
97A	-	20D	4.980
97A	-	21D	3.069
97A	-	22D	3.237
126A	-	21D	3.320
126A	-	22D	2.449
129A	-	19D	3.757
130A	-	21D	4.980
130A	-	22D	2.577
136A	-	18D	4.726
138A	-	18D	4.398
140A	-	16D	4.432
140A	-	17D	2.675
140A	-	18D	2.871
162A	-	16D	4.247
164A	-	13D	2.527
164A	-	14D	3.334
166A	-	14D	3.446
166A	-	15D	2.186
166A	-	16D	4.798

FIG. 37A

【図３７－２】

受容体界面残基：

ALA	45A	4.996
PRO	47A	2.815
ARG	48A	4.499
HIS	49A	2.553
ARG	54A	3.254
ARG	57A	3.694
GLN	83A	3.073
SER	85A	4.480
GLN	86A	2.789
LEU	87A	4.636
GLY	88A	4.263
GLU	90A	4.487
ASN	105A	3.540
ASN	107A	2.594
GLU	108A	4.448
ARG	130A	4.303
GLU	234A	2.961
ARG	237A	2.308
ALA	238A	4.651
MET	241A	3.086
LYS	244A	4.001
PRO	246A	3.605
THR	248A	4.878
ILE	249A	4.970
ASP	250A	3.074
PRO	251A	2.808

リガンド界面残基：

DG	16D	4.833
DA	17D	2.808
DC	18D	2.871
DG	19D	2.594
DC	20D	2.308
DT	21D	3.073
DG	22D	2.903
DG	23D	2.789
DC	24D	3.058
DG	25D	2.815
DA	26D	2.553
DT	27D	2.895
DT	28D	2.967
DA	29D	3.329
DG	30D	3.740

受容体ーリガンド界面残基ペア：

45A	-	24D	4.996
47A	-	24D	3.973
47A	-	25D	2.815
47A	-	26D	3.660
48A	-	26D	4.499
49A	-	26D	2.553
49A	-	27D	2.895
49A	-	28D	2.967
54A	-	28D	3.254
54A	-	29D	3.329
57A	-	29D	3.694
57A	-	30D	3.740
83A	-	21D	3.073
85A	-	25D	4.480
86A	-	22D	2.903
86A	-	23D	2.789
86A	-	24D	3.058
86A	-	25D	3.545
87A	-	25D	4.636
88A	-	25D	4.263
90A	-	28D	4.687
90A	-	29D	4.487
105A	-	19D	3.540
107A	-	18D	2.871
107A	-	19D	2.594
108A	-	19D	4.448
130A	-	27D	4.303
234A	-	22D	4.302
234A	-	23D	2.961
237A	-	20D	2.308
237A	-	21D	4.221
237A	-	22D	4.990
238A	-	21D	4.651
241A	-	20D	3.133
241A	-	21D	3.086
244A	-	20D	4.001
246A	-	19D	3.605
248A	-	18D	4.878
249A	-	17D	4.970
250A	-	16D	4.833
250A	-	17D	3.074
251A	-	17D	2.808

FIG. 37B

【図３８－１】

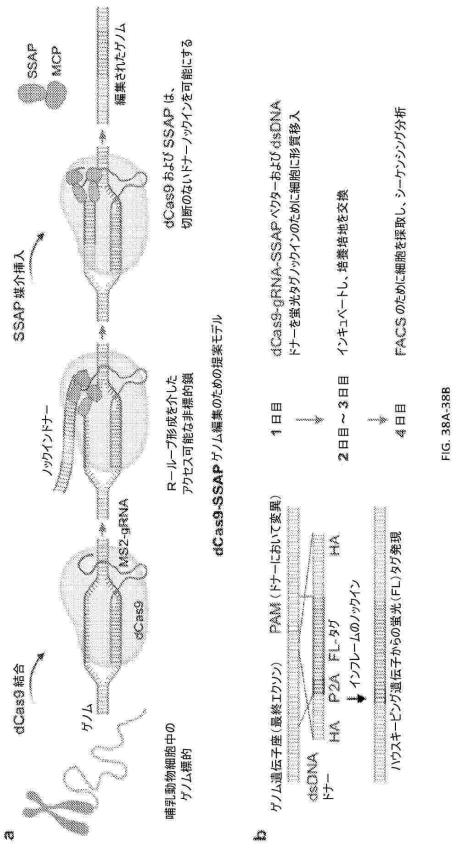


FIG. 38A-38B

【図３８－２】

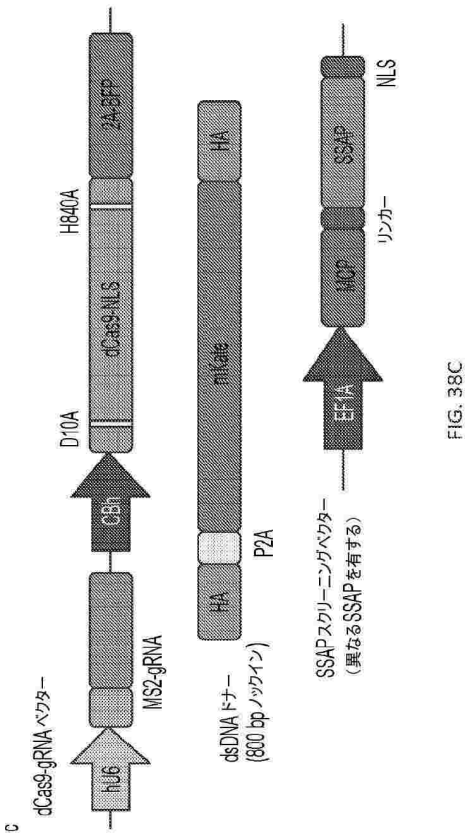
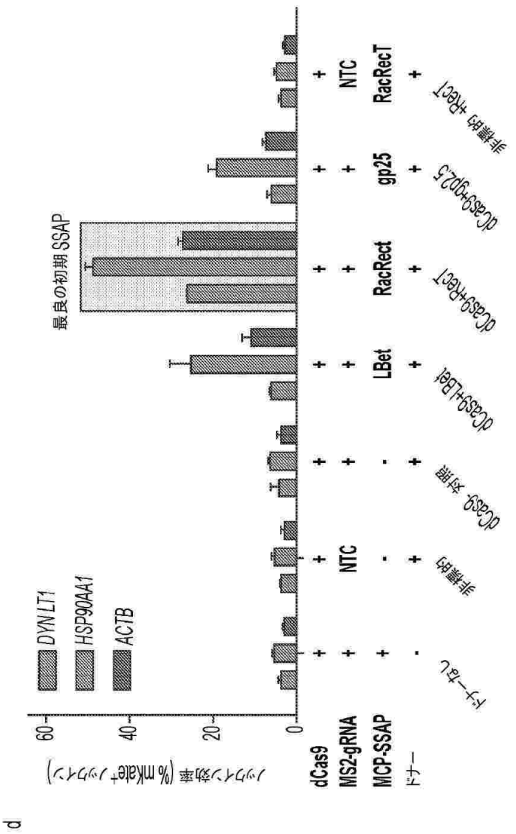
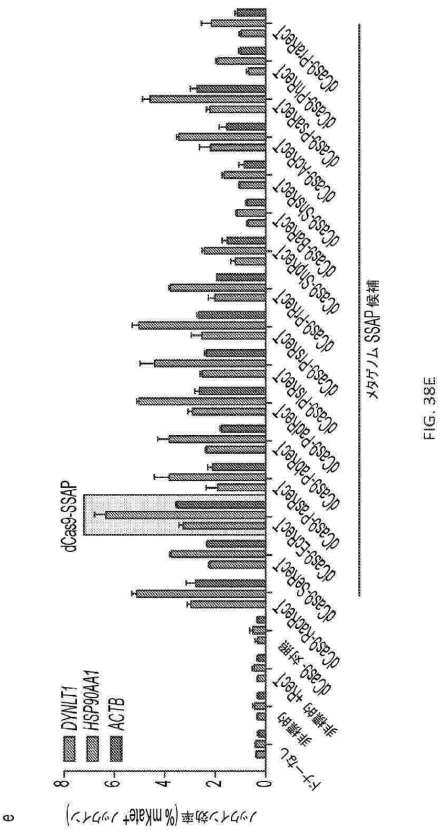


FIG. 38C

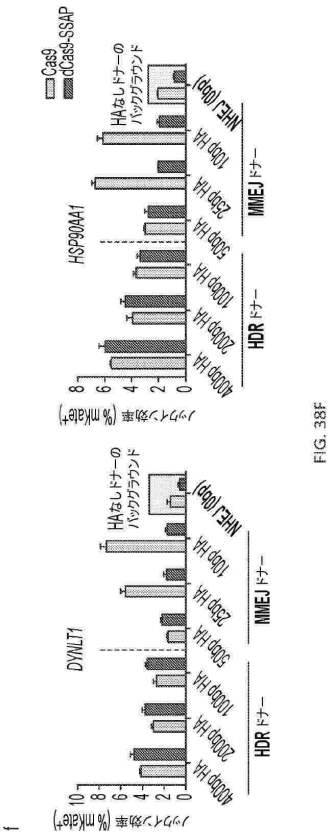
【図３８－３】



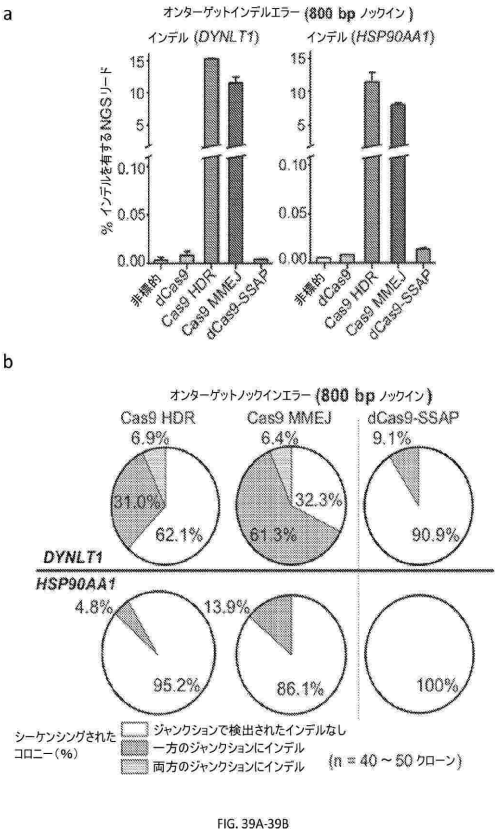
【図３８－４】



【図３８－５】



【図３９－１】



【図３９－２】

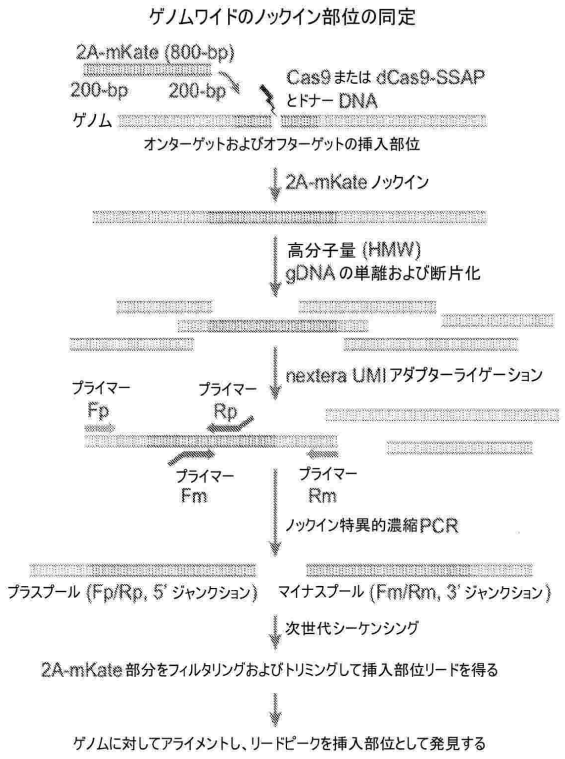


FIG. 39C

【図３９－３】

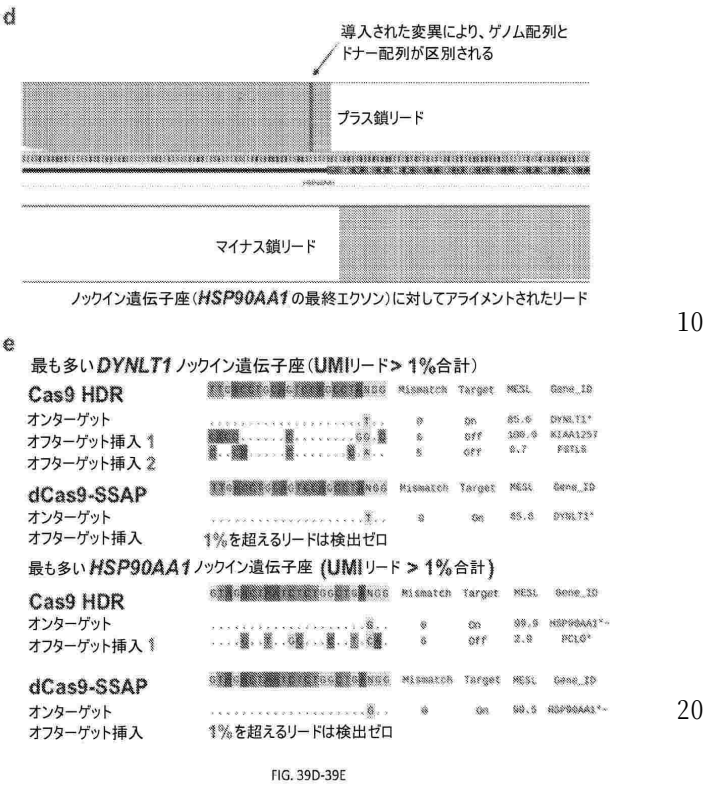


FIG. 39D-39E

【図３９－４】

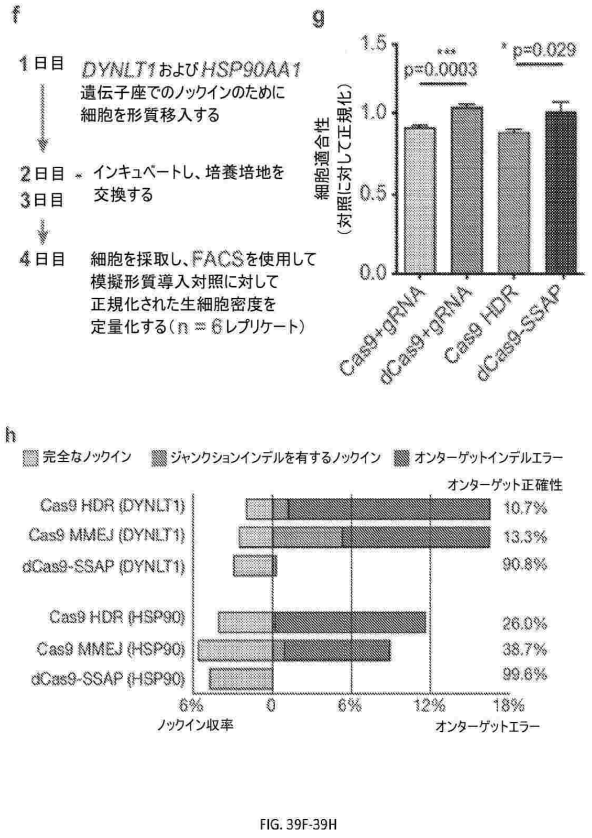


FIG. 39F-39H

【図４０－１】

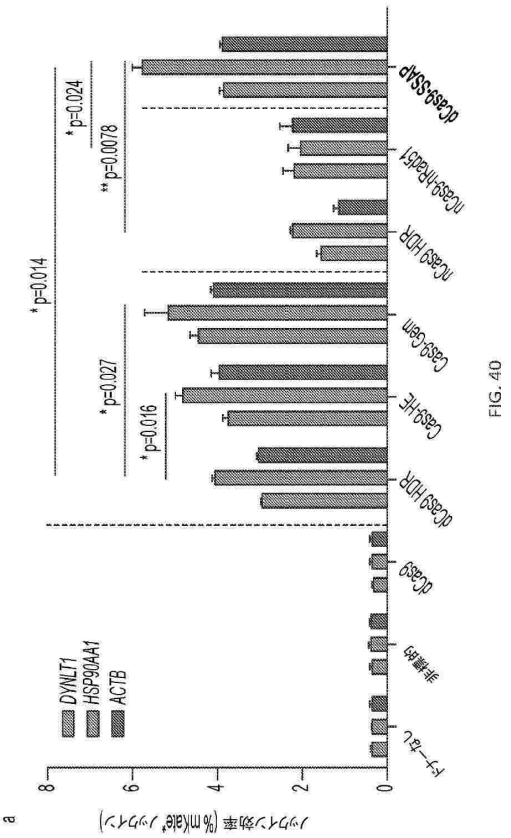


FIG. 40

【図４０－２】

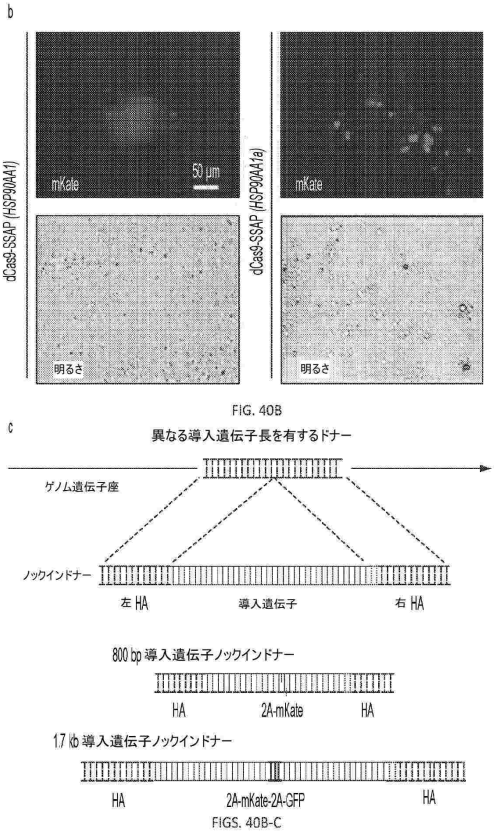


FIG. 40B
FIGS. 40B-C

【図４０－３】

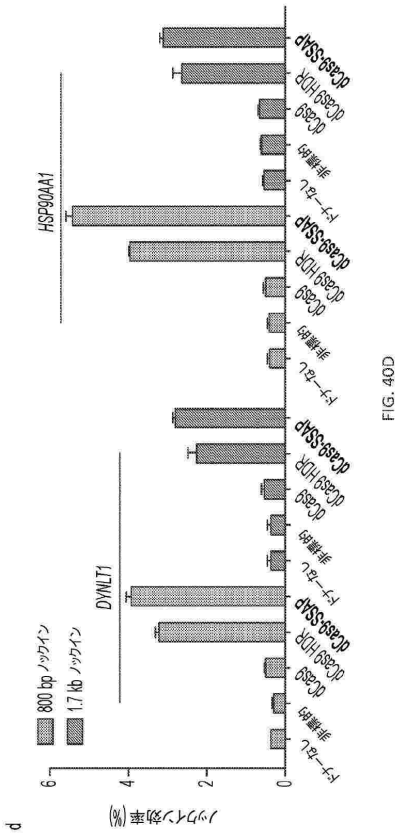


FIG. 40D

【図４０－４】

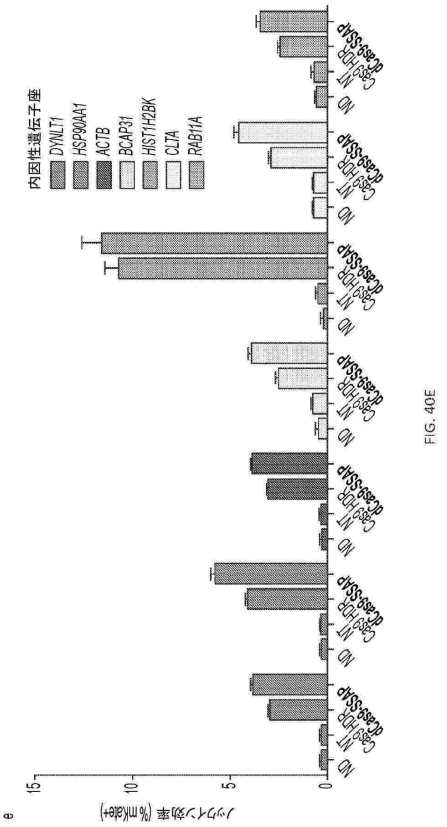


FIG. 40E

【図４０－５】

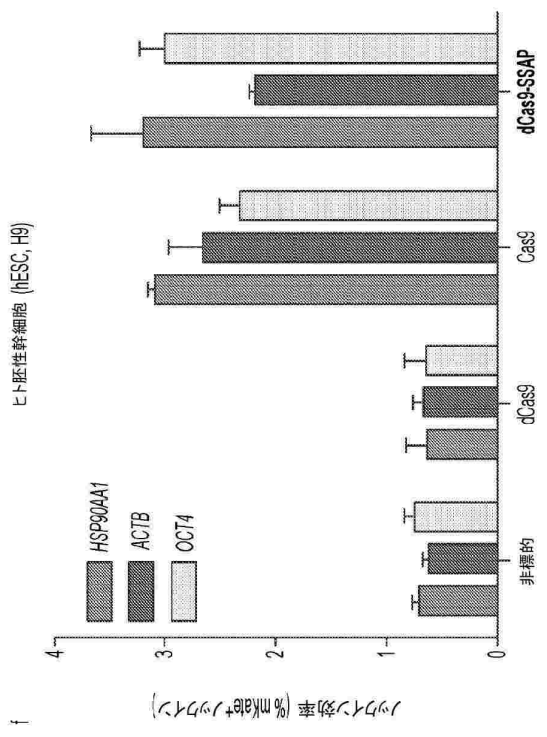


FIG. 40F

【図４０－６】

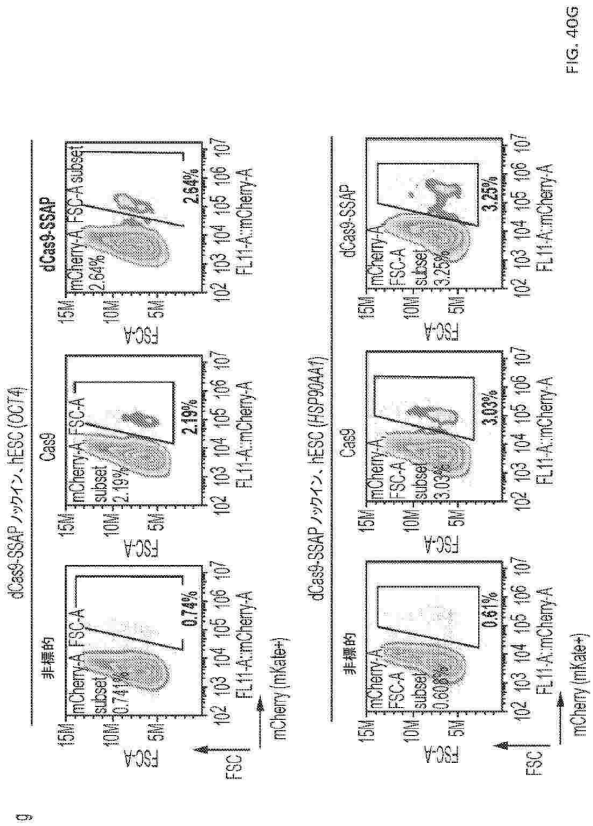


FIG. 40G

【図４１－１】

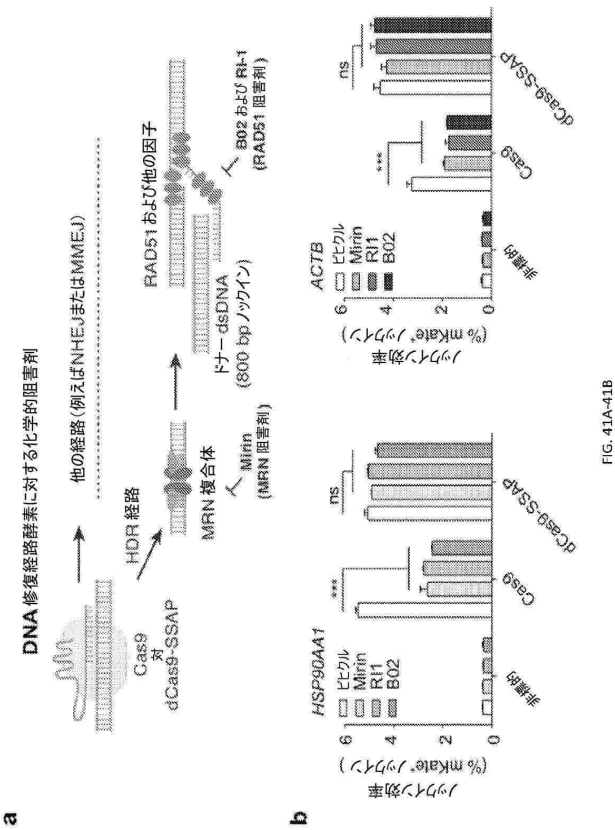


FIG. 41A-41B

【図４１－２】

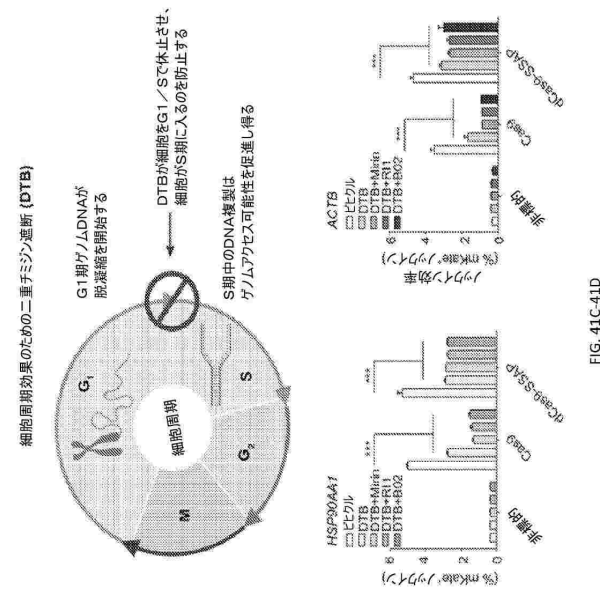


FIG. 41C-41D

【図４２－１】

FIG. 42A

【図４２－２】

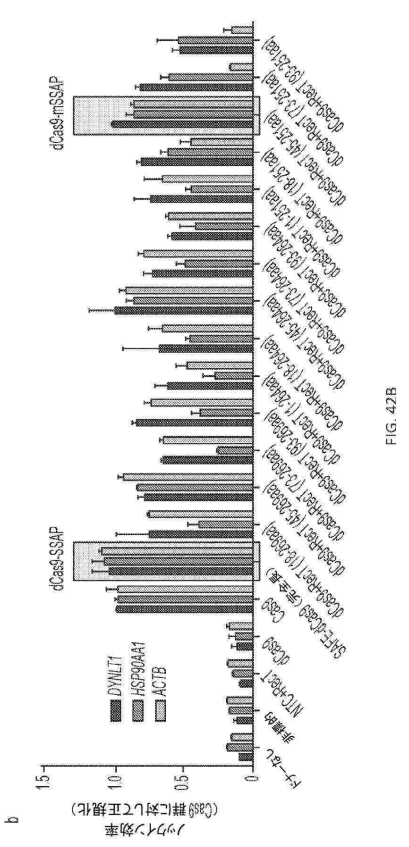
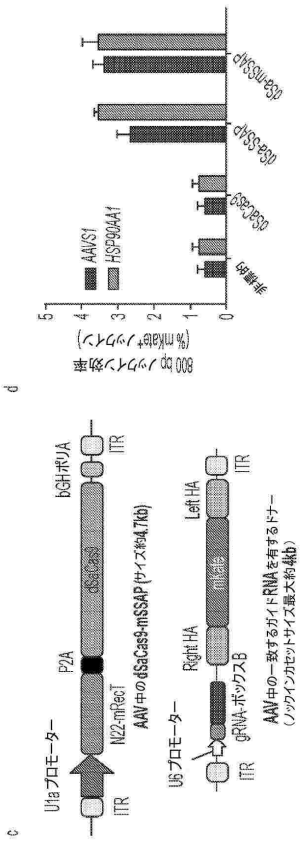


FIG. 42B

【図４２－３】



FIGS. 42C-42D

【図４３－１】

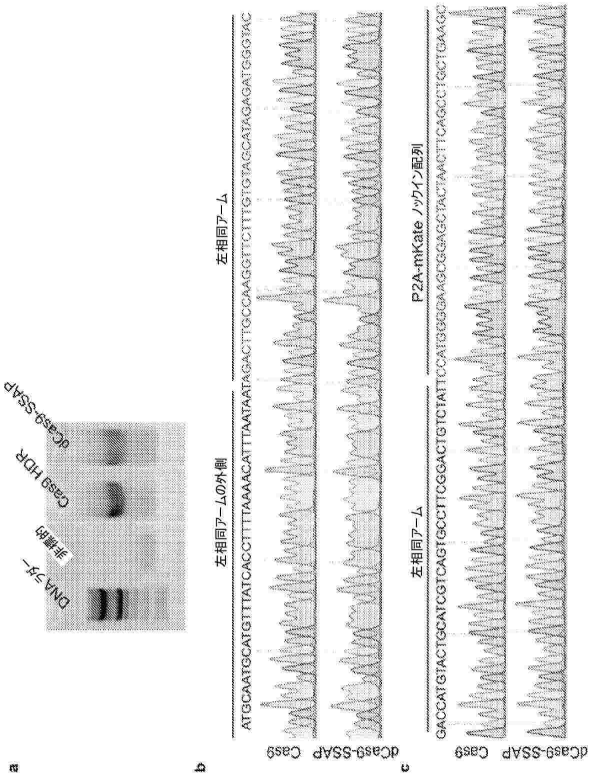


FIG. 43A-43C

【図４３－２】

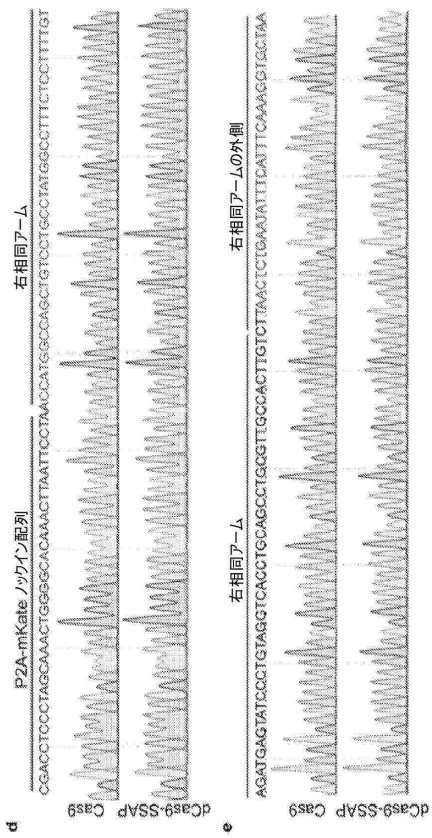


FIG. 43D-43E

【図４４】

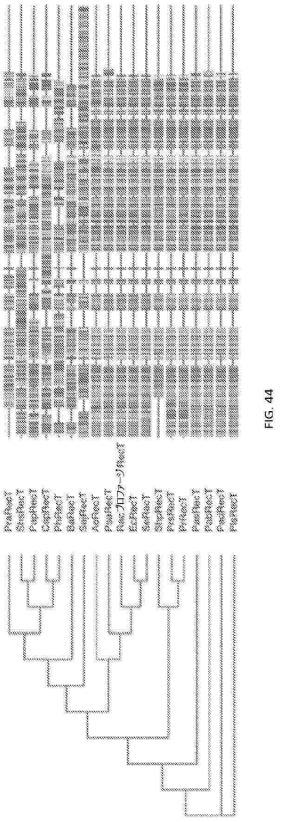


FIG. 44

【図４５】

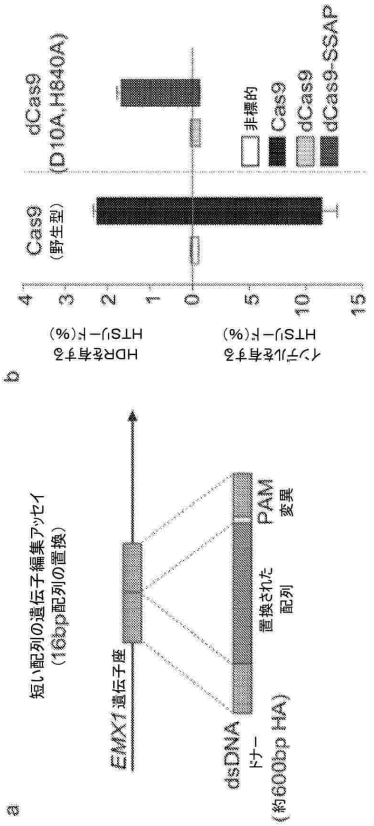


FIG. 45

【図４６】

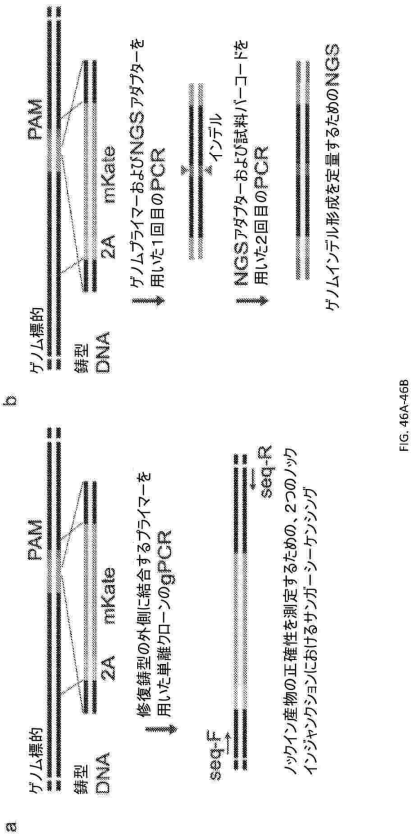


FIG. 46A-46B

【図４７－１】

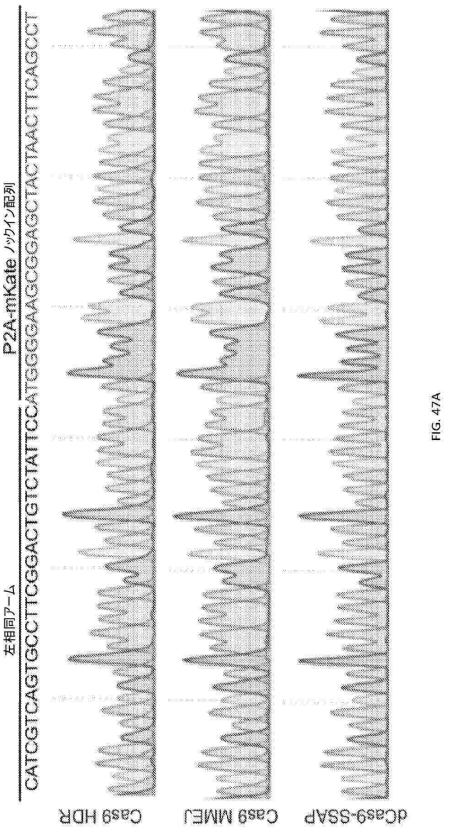


FIG. 47A

【図４７－２】

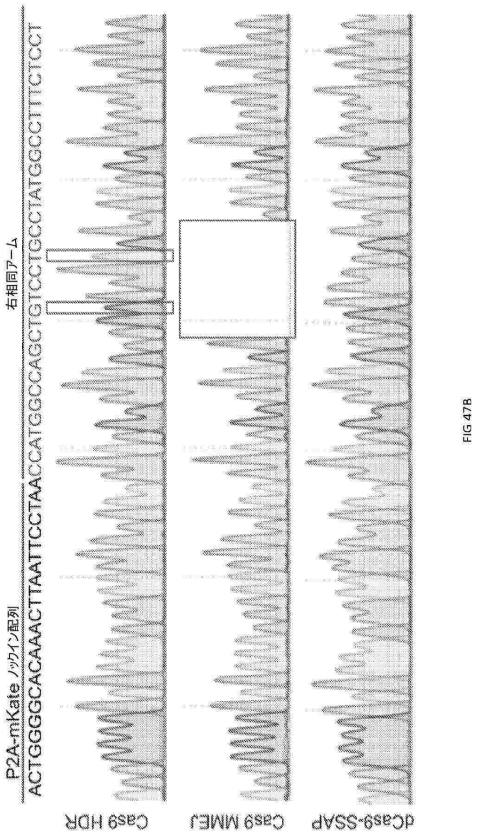


FIG 47B

【図４８－１】

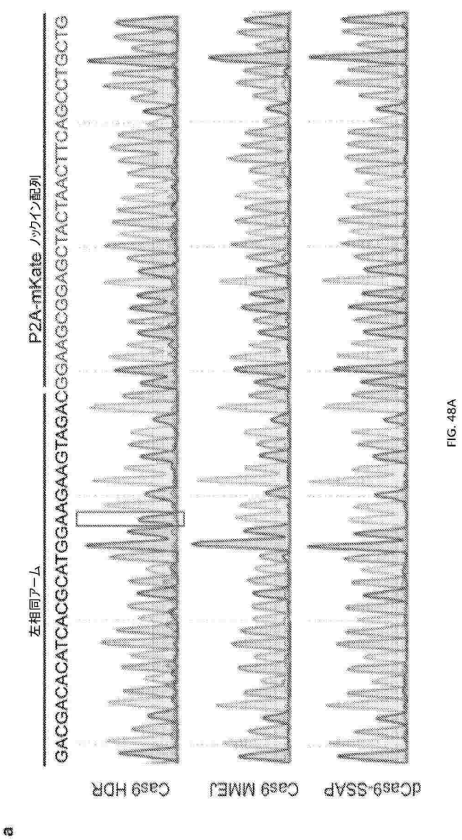


FIG. 48A

【図４８－２】

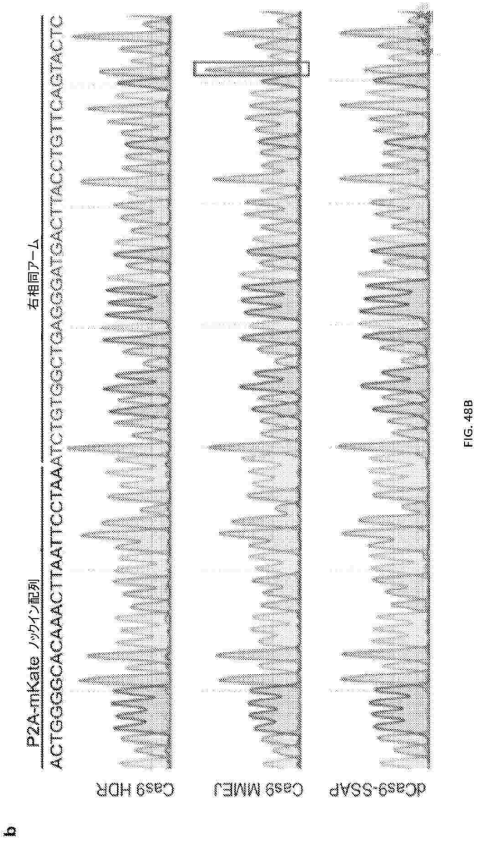


FIG. 48B

【図４９】

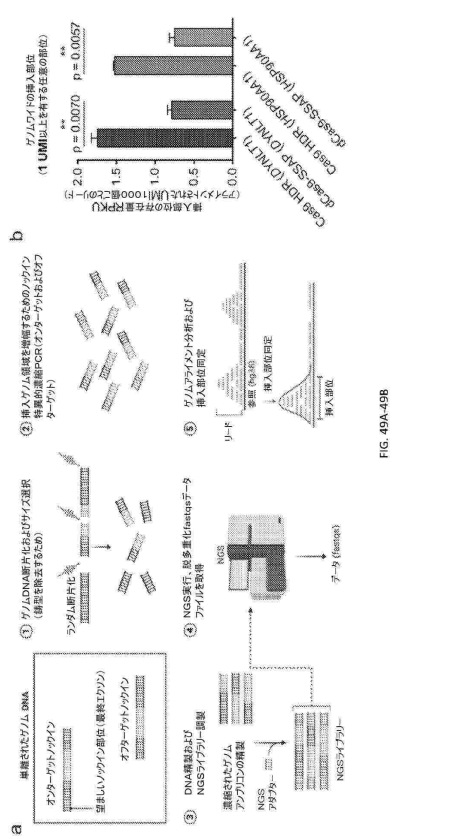


FIG. 49A-49B

【図５０】

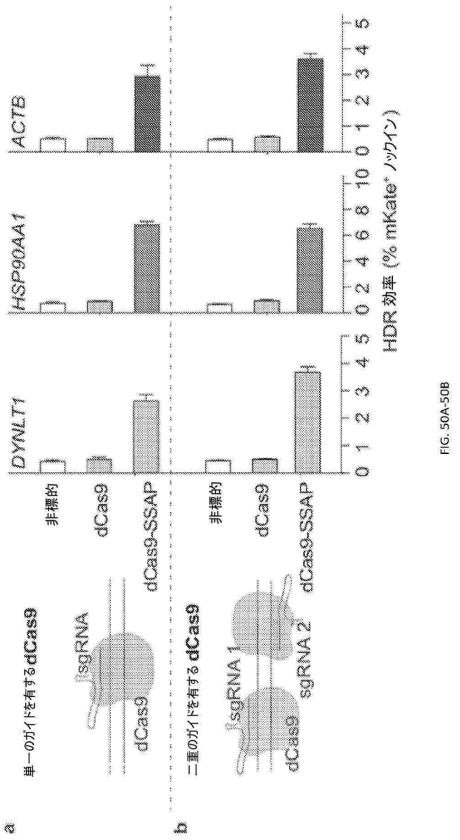


FIG. 50A-50B

【図５１】

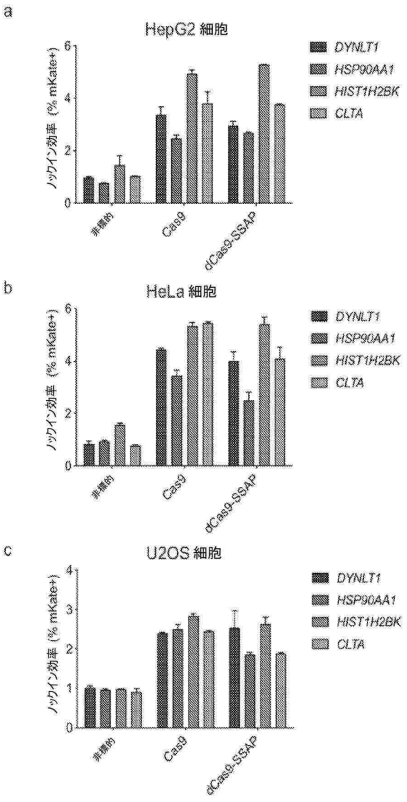


FIG. 51A-51C

【図５２】

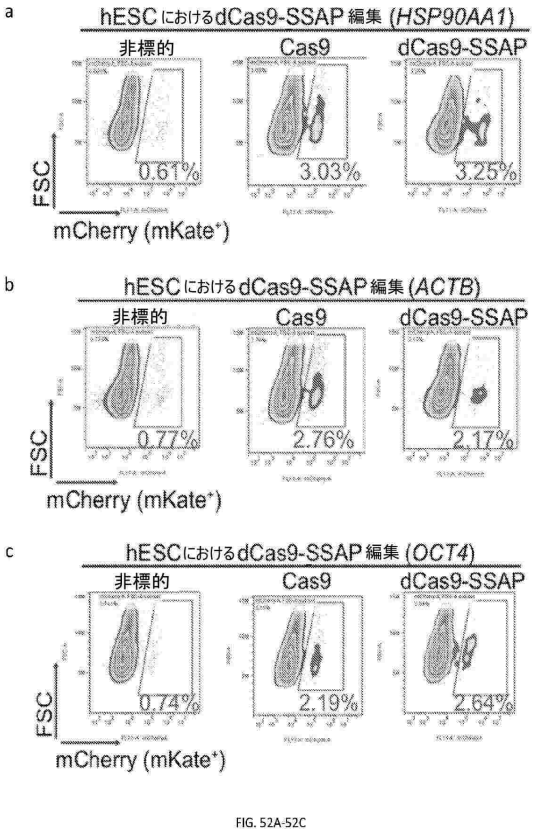


FIG. 52A-52C

【図５３】

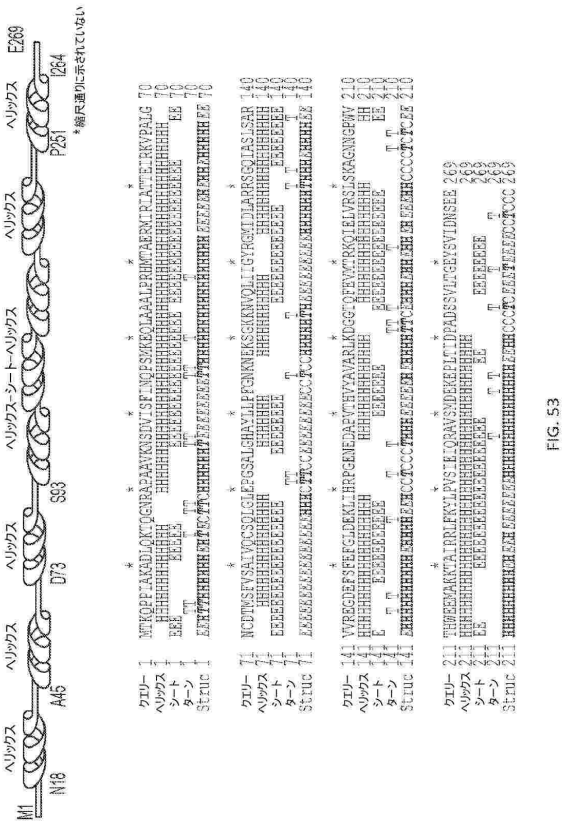


FIG. 53

【図５４－１】

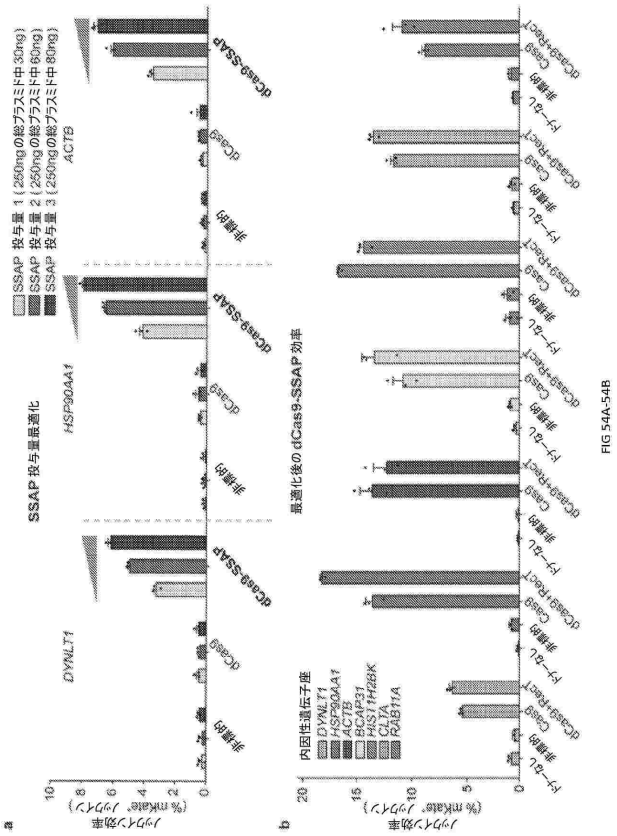


FIG 54A-54B

【図５４－２】

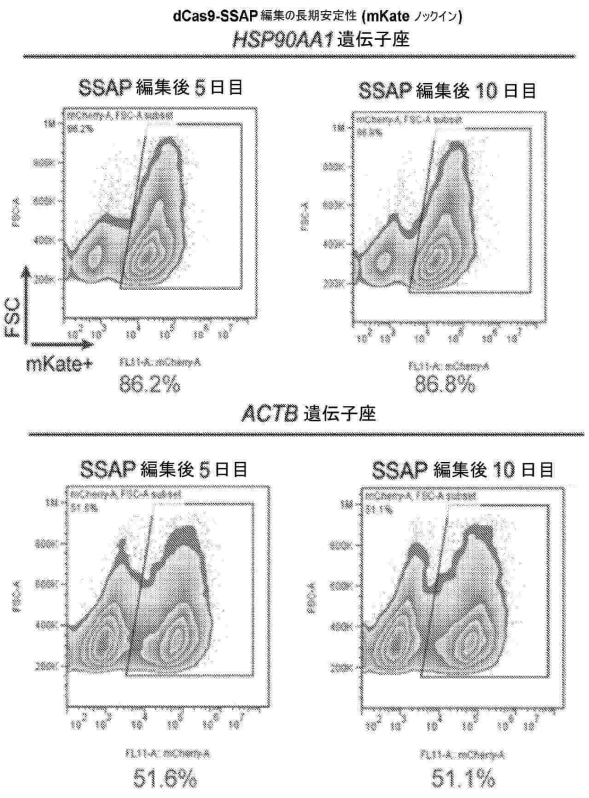


FIG. 54C

【図５５－１】

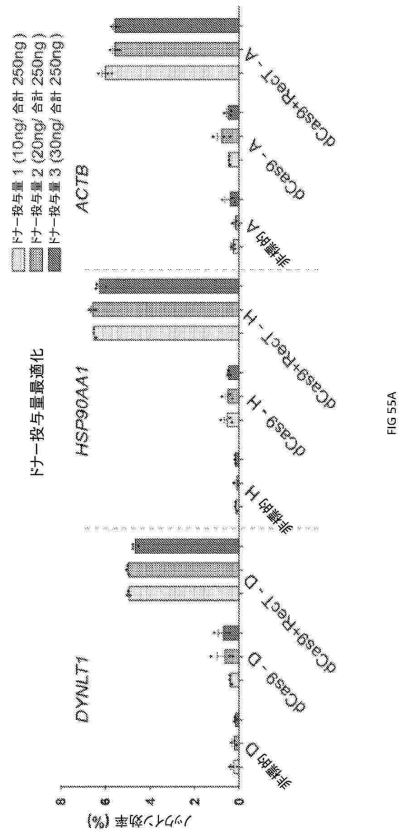


FIG 55A

【図５５－２】

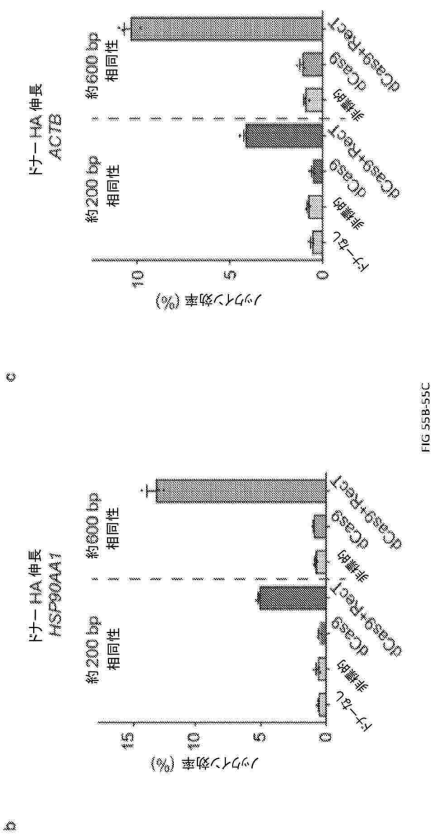


FIG 55B-55C

【図５６－１】

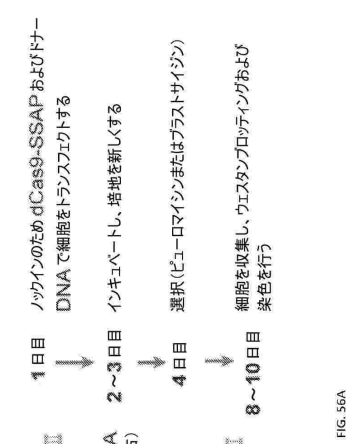


FIG. 56A

【図５６－２】

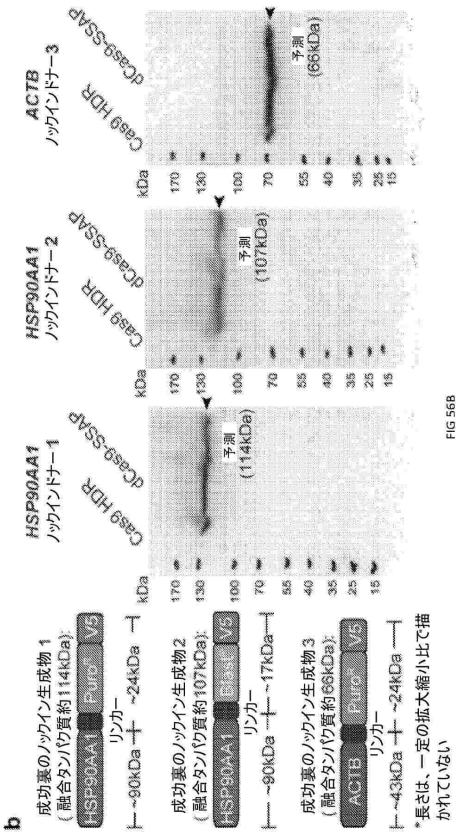


FIG 56B

【図５６－３】

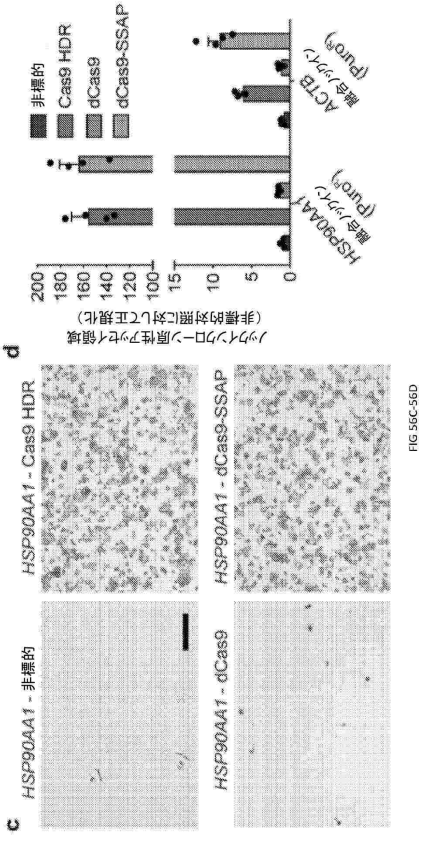


FIG 56C-56D

【図５７－１】

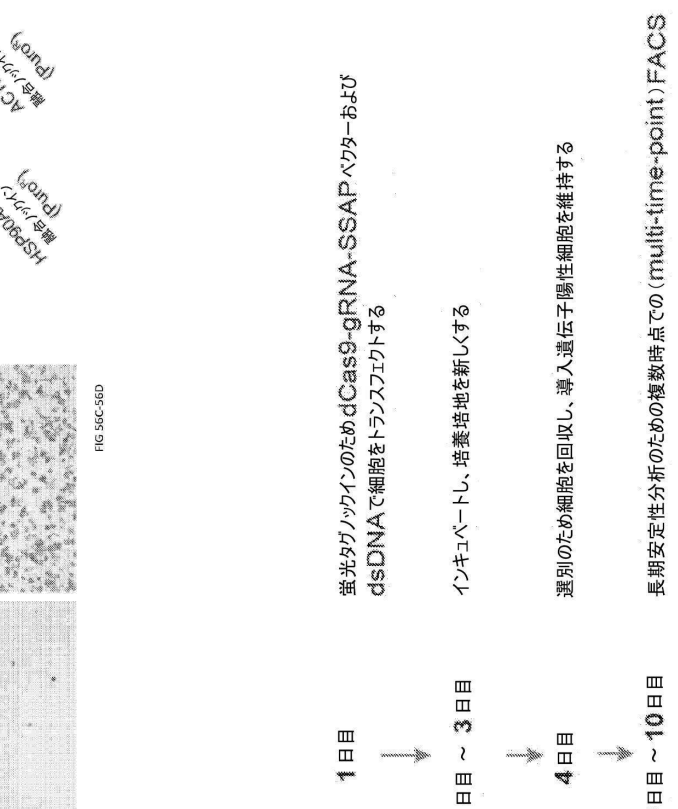


FIG. 57A

【図５７－２】

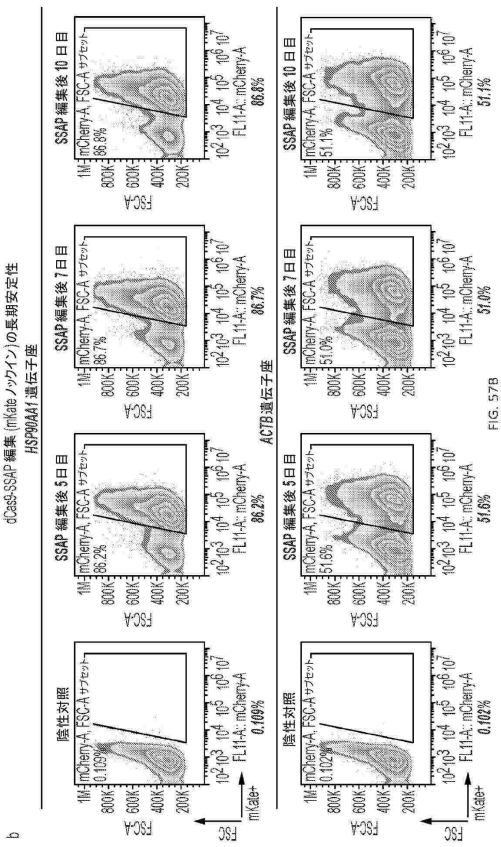


FIG. 57B

【図５７－３】

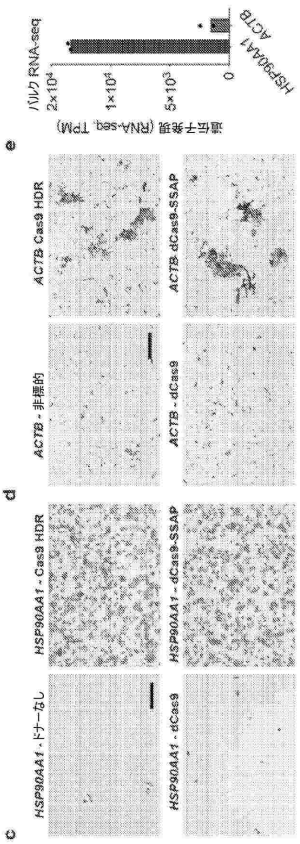


FIG 57C-57E

【図５８】

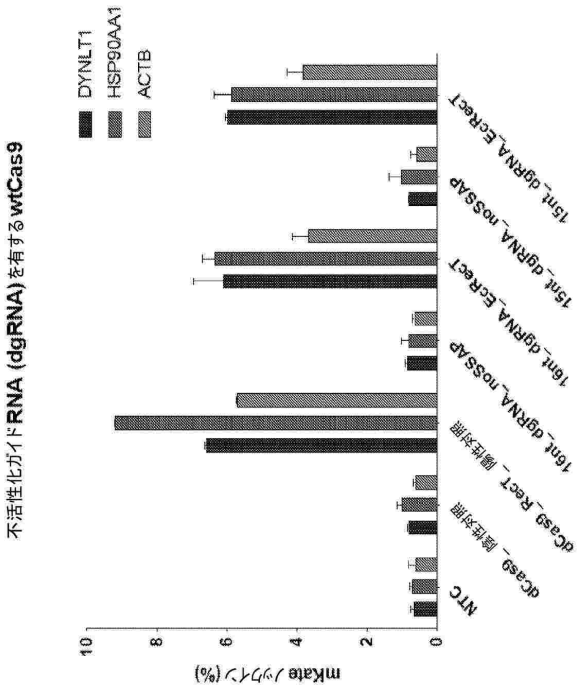


FIG. 58

【図５９】

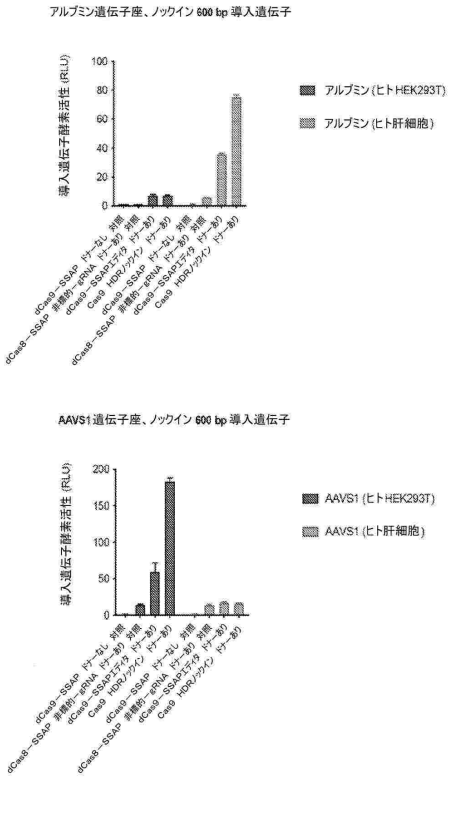


FIG. 59

【図６０】

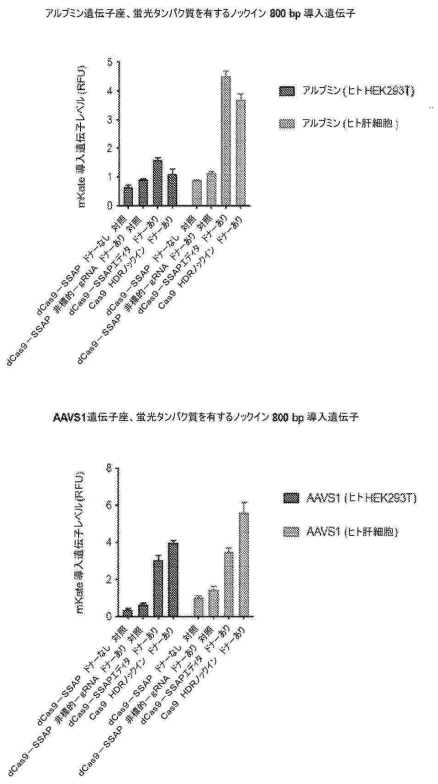


FIG. 60

【図６１】

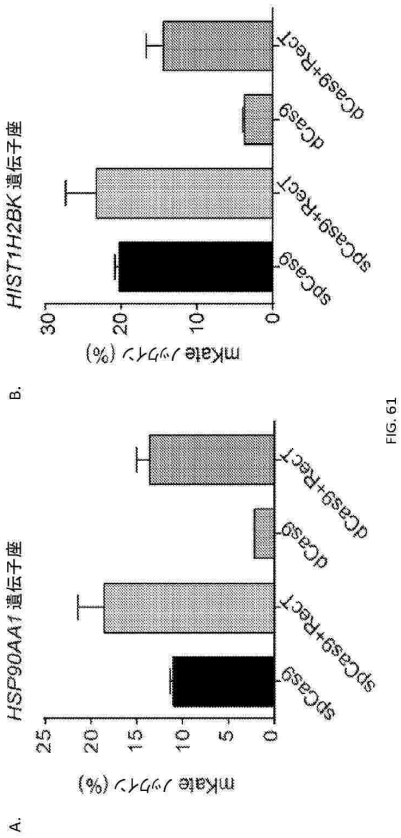


FIG. 61

【図６２】

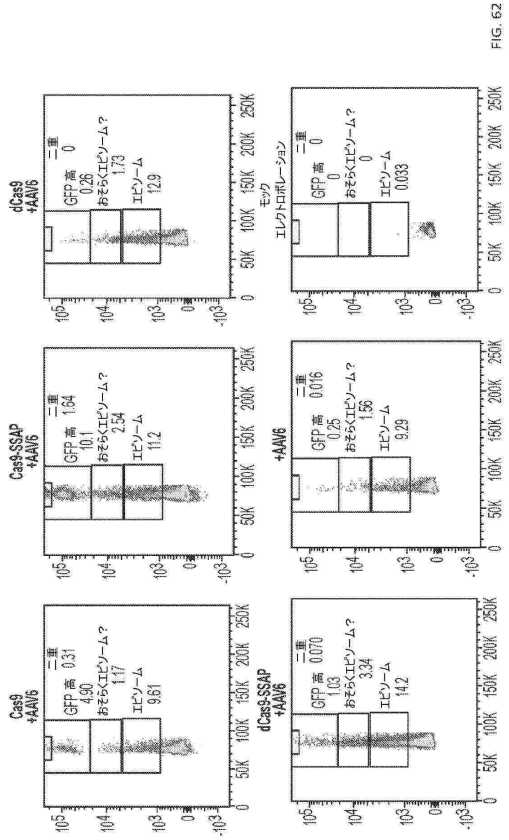


FIG. 62

【図６３】

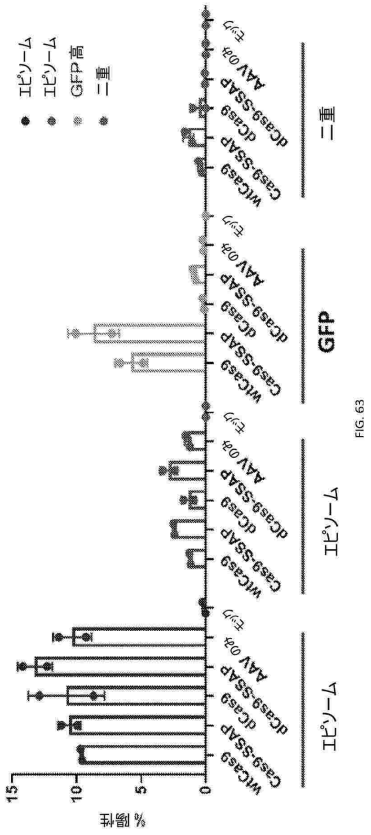


FIG. 63

【図６４－１】

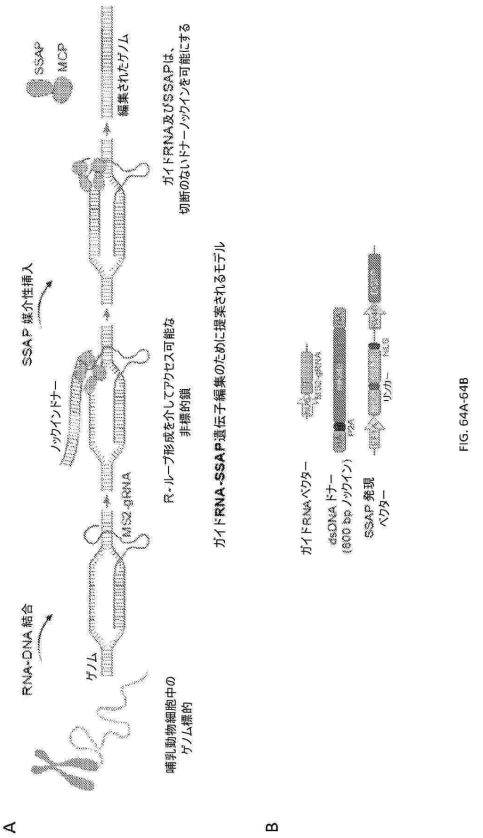


FIG. 64A-64B

【図６４－２】

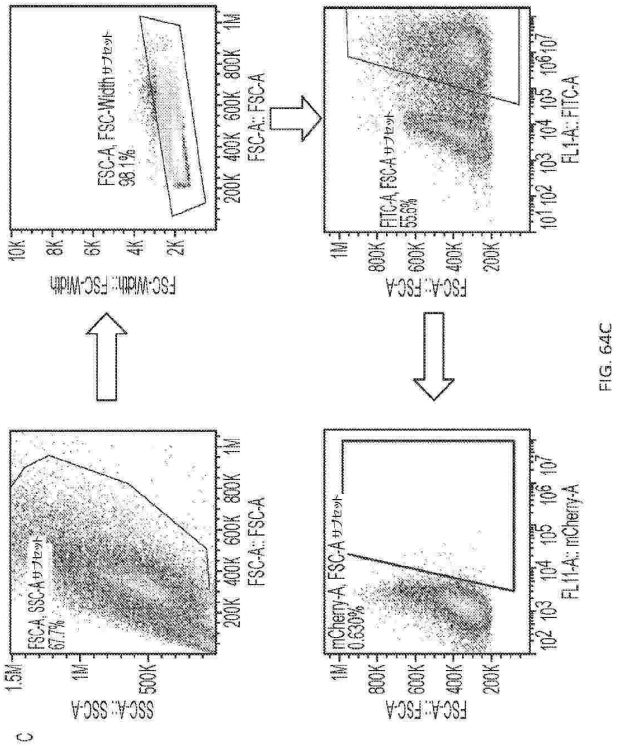


FIG. 64C

【図６４－３】

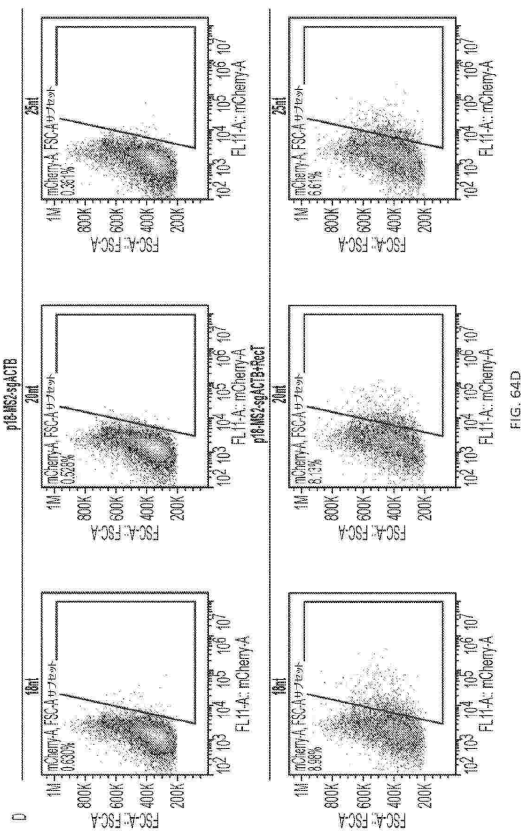


FIG. 64D

【図６５】

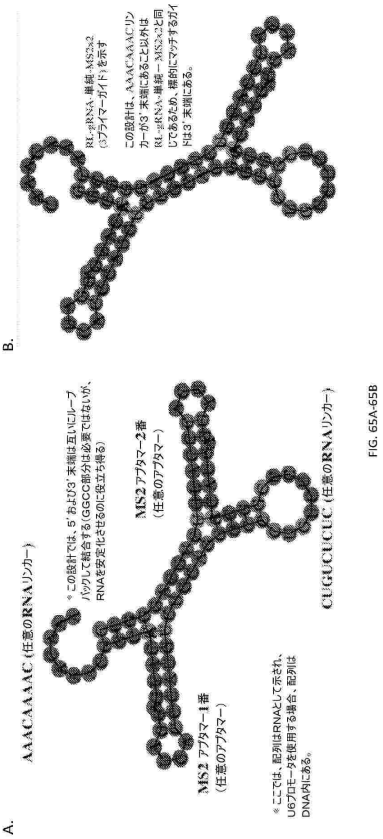


FIG. 65A-65B

【図６６】

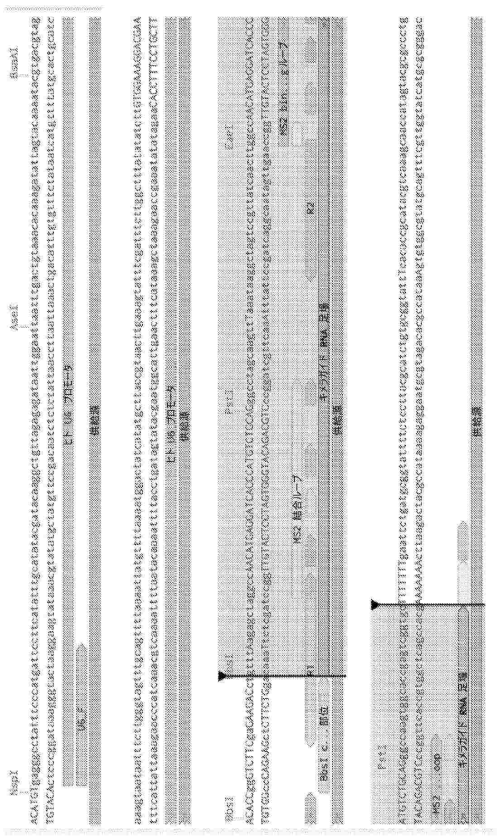


Fig. 66

【図６７】

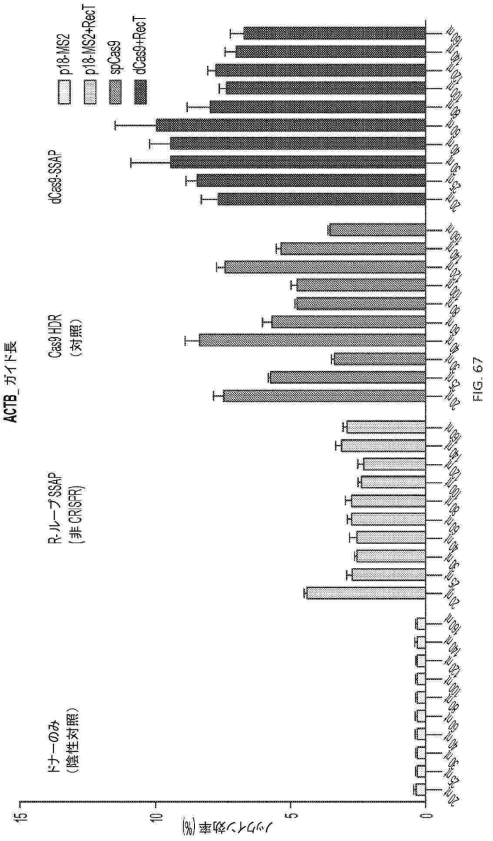


FIG. 67

【図６８】

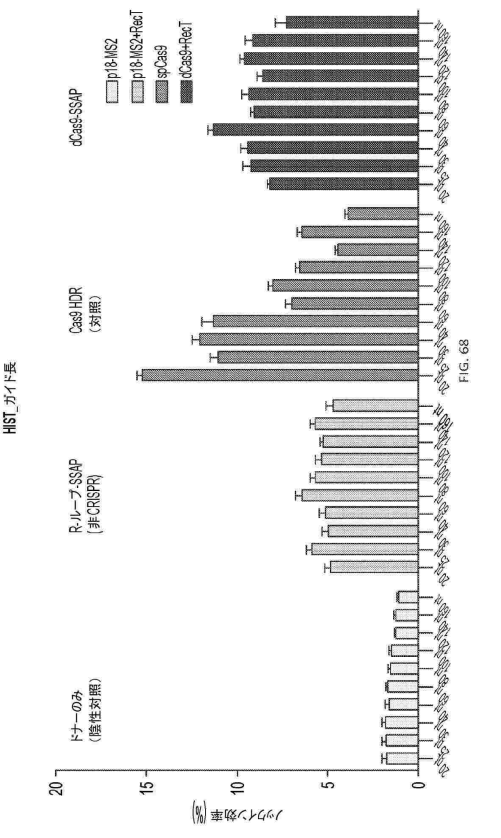


FIG. 68

【図６９】

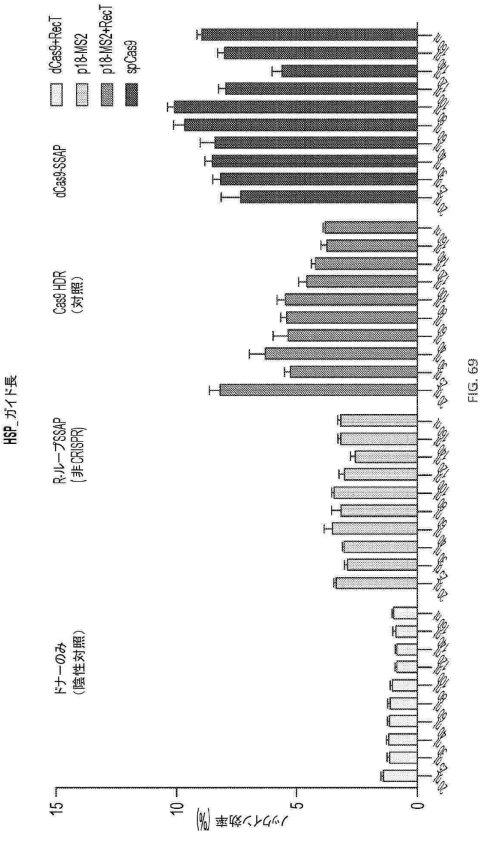


FIG. 69

【図７０】

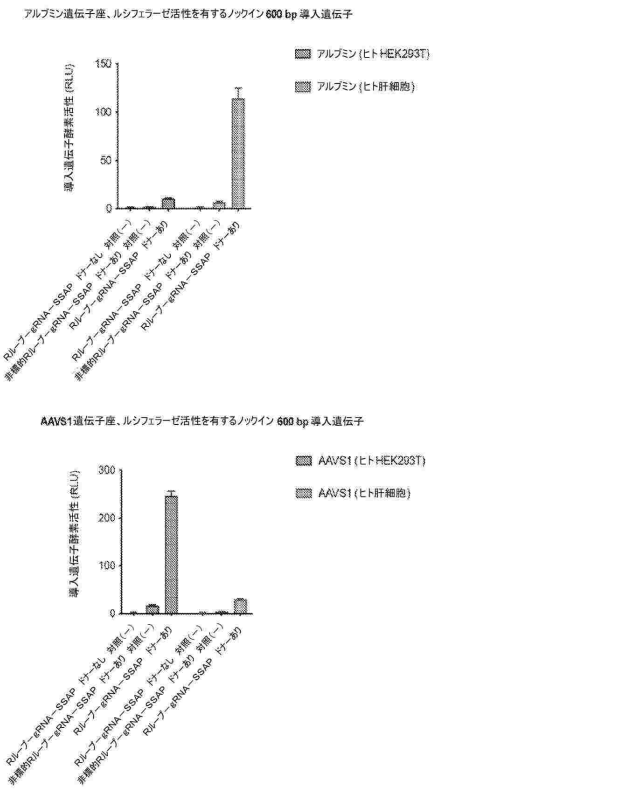


FIG. 70

【図７１】

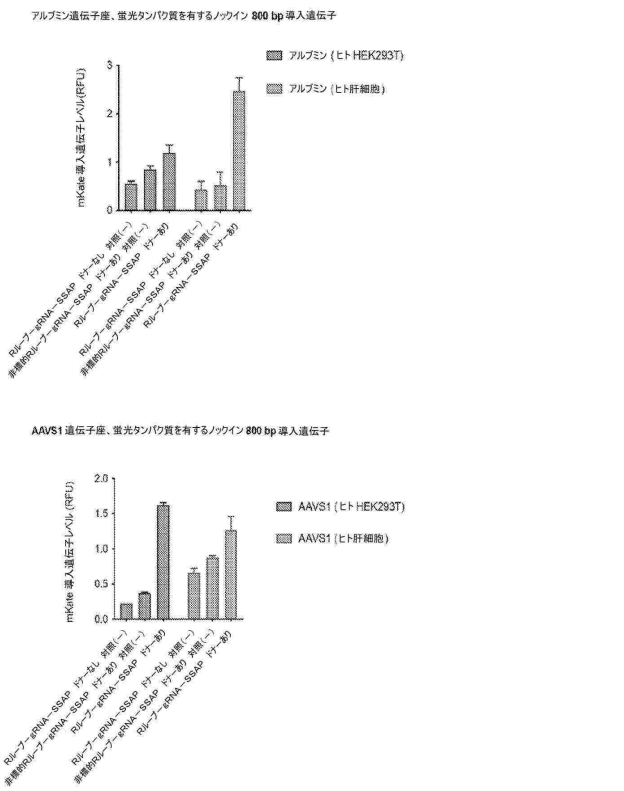


FIG. 71

【図７２】

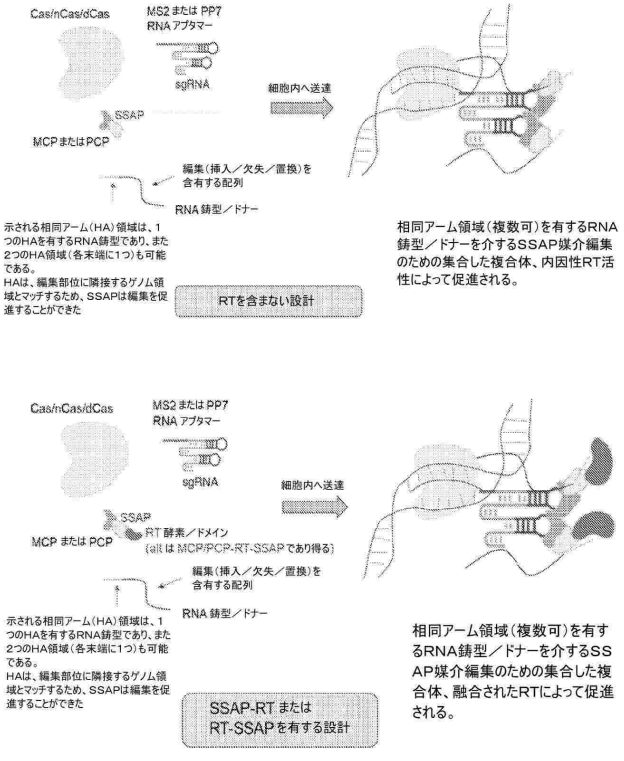


FIG. 72

【図７３】

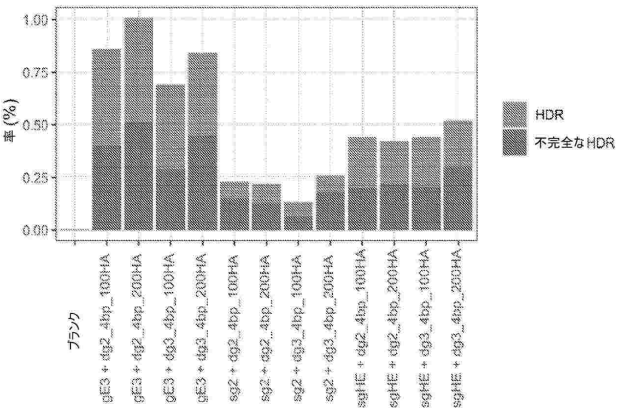


FIG. 73

【図７４】

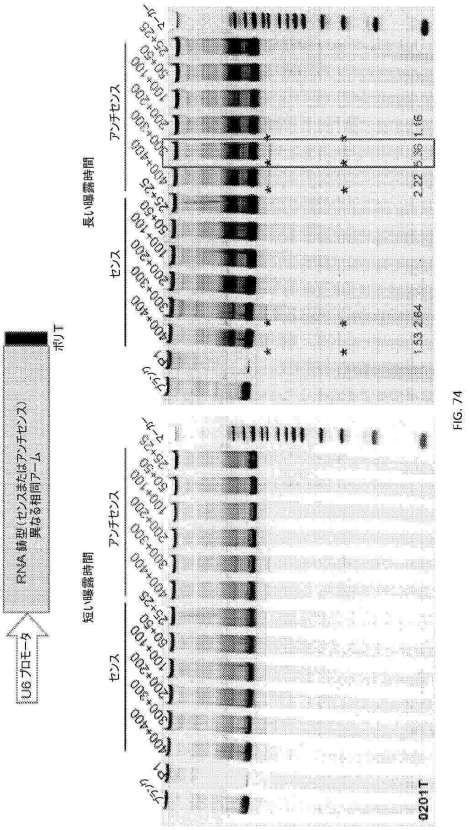


FIG. 74

【図７５】

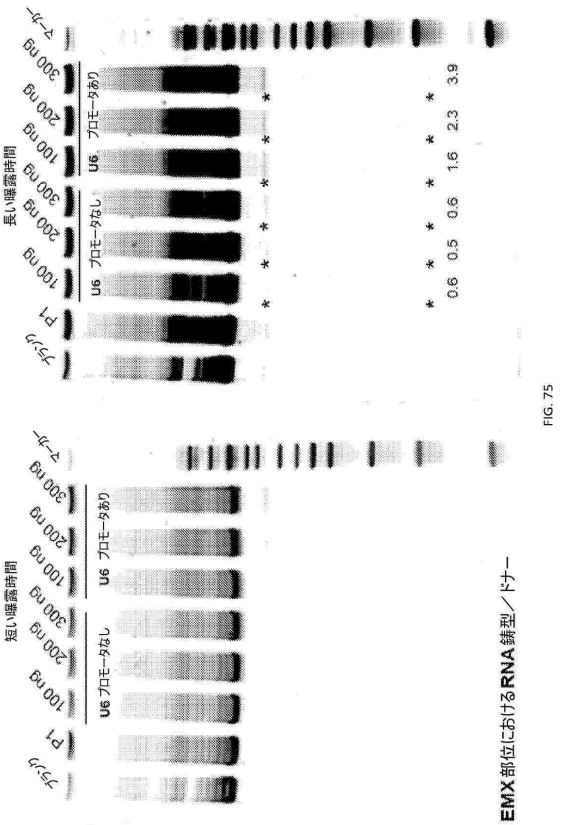


FIG. 75

【図７６】

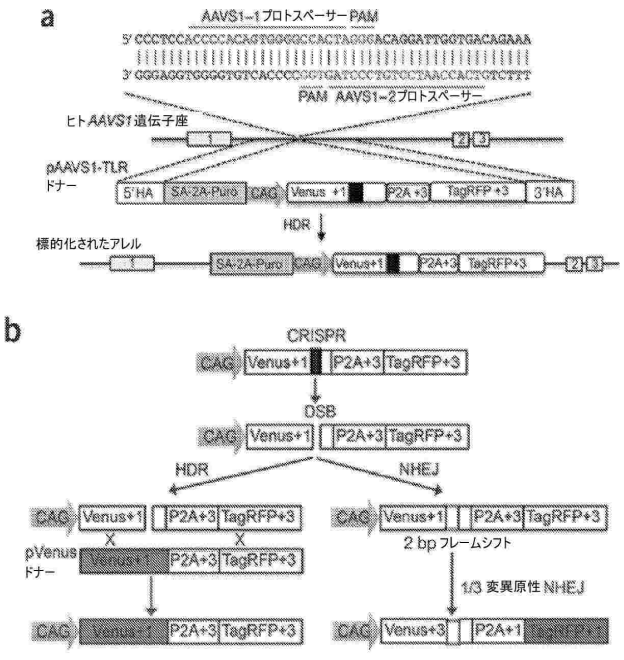


FIG. 76

【図７７】

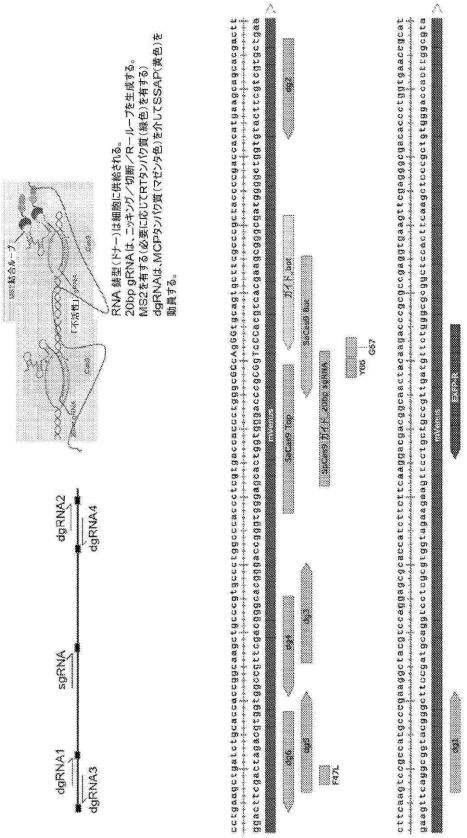


FIG. 77

【図７８－１】

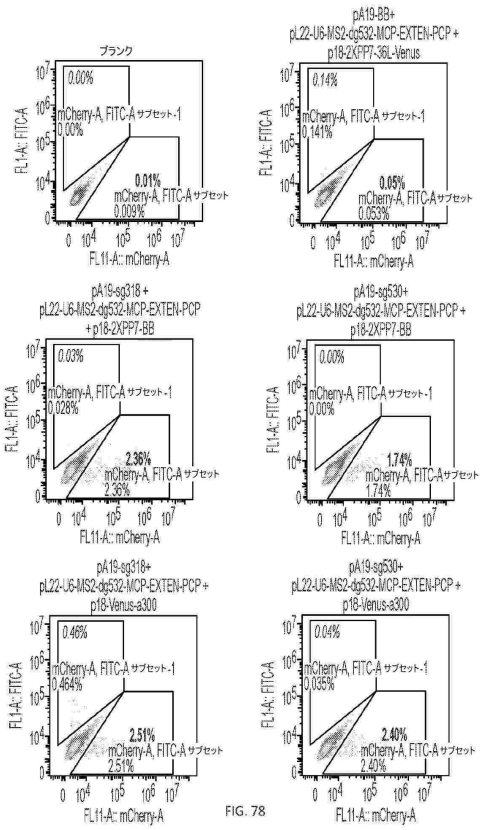


FIG. 78

【図７８－２】

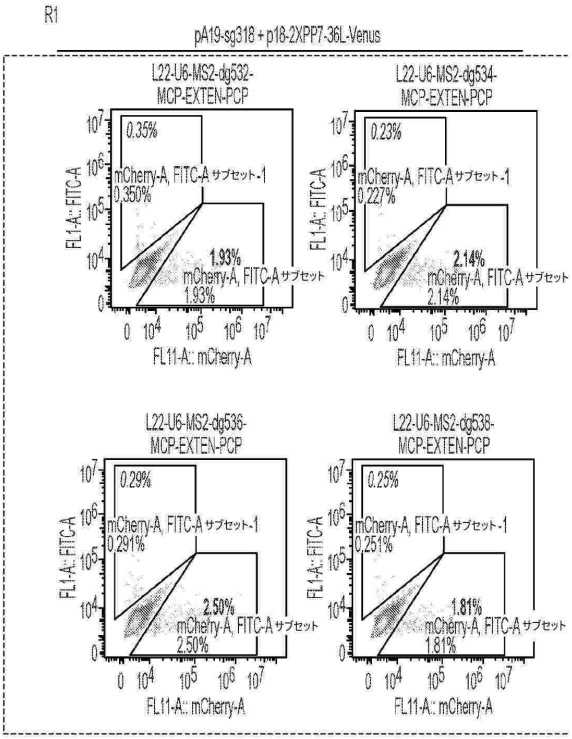


FIG. 78
続き

【図７８－３】

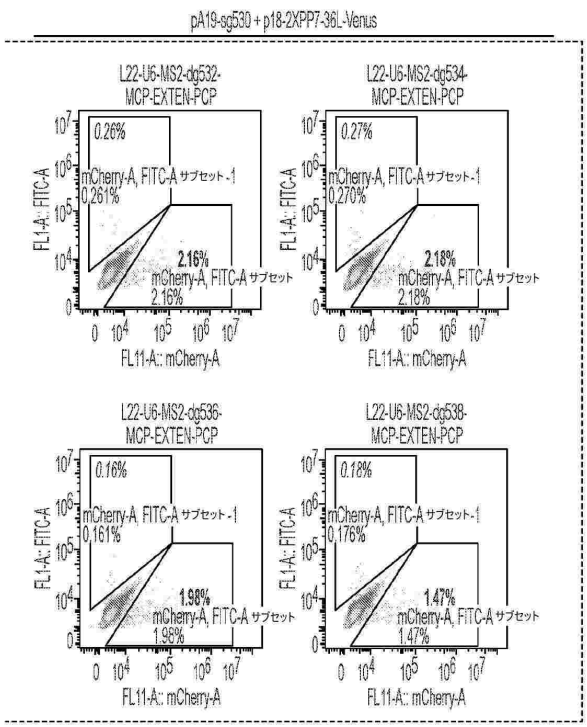


FIG. 78
続き

【図７８－４】

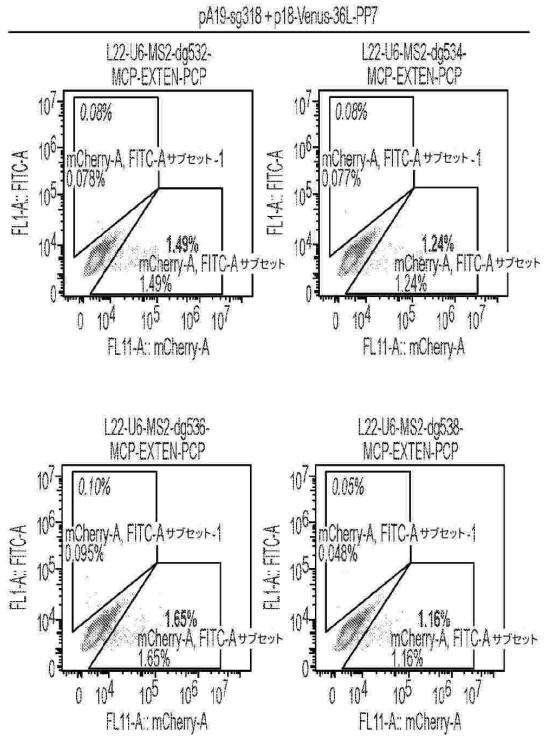


FIG. 78
続き

【図７８－５】

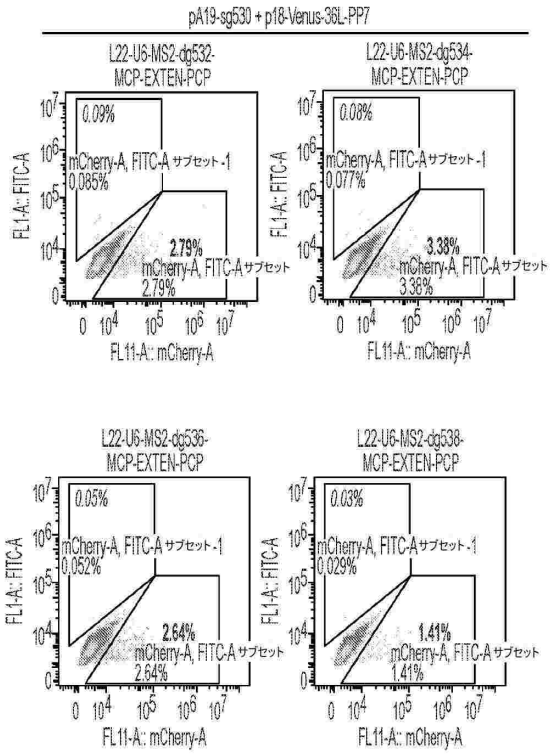


FIG. 78
続き

【図７９】

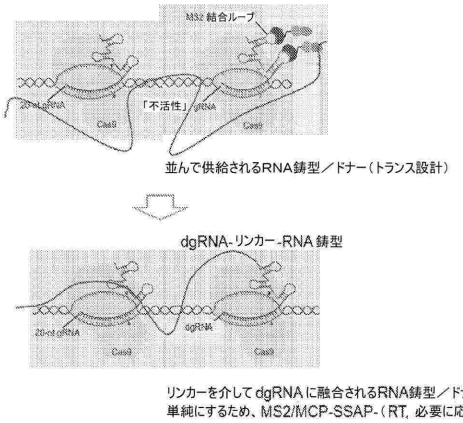


FIG. 79

【図８０－１】

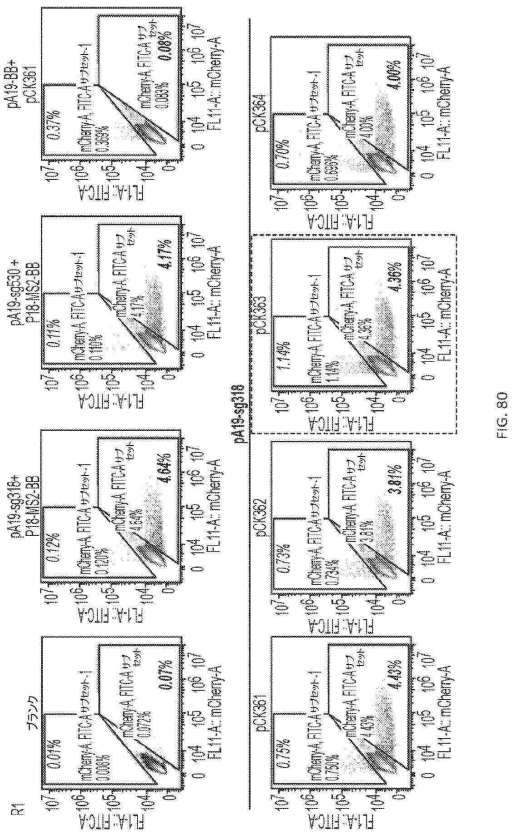


FIG. 80

【図８０－２】

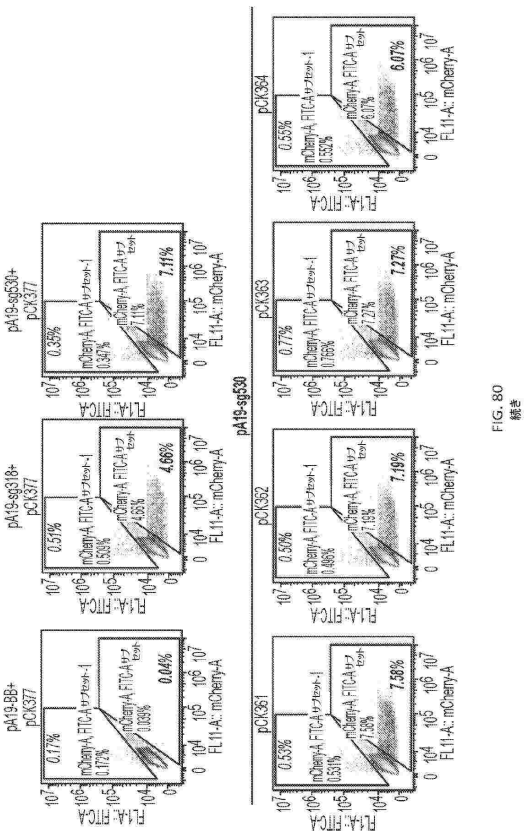


FIG. 80
続き

【図８０－３】

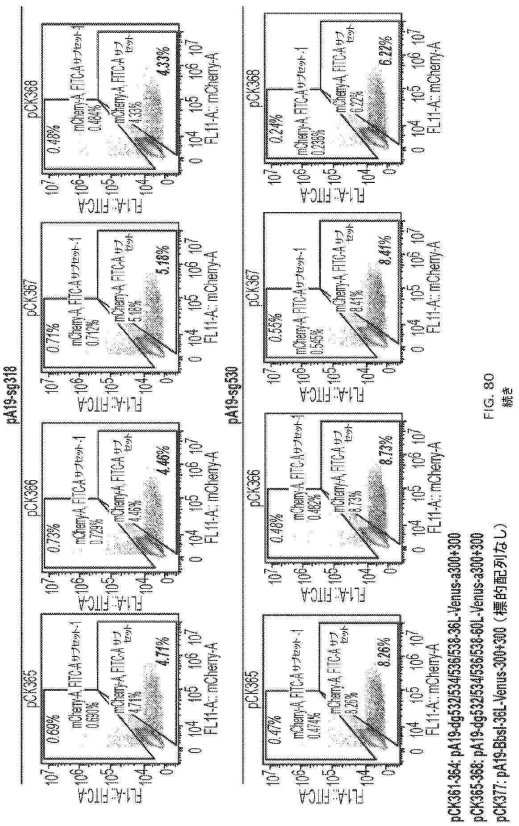


FIG. 80
続き

【図８１－１】

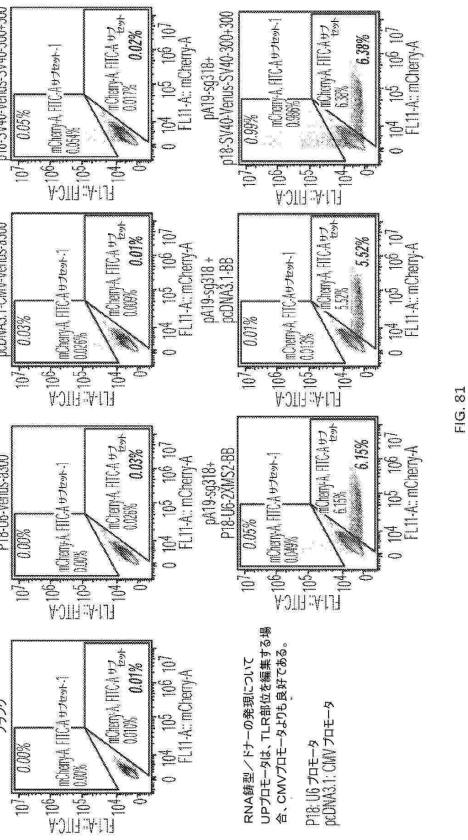


FIG. 81

【図８１－２】

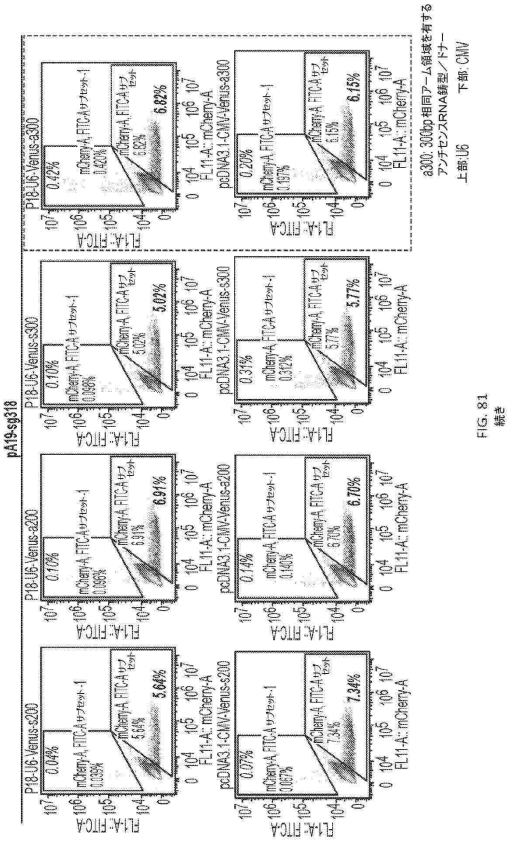


FIG. 81
続き

【図８２】

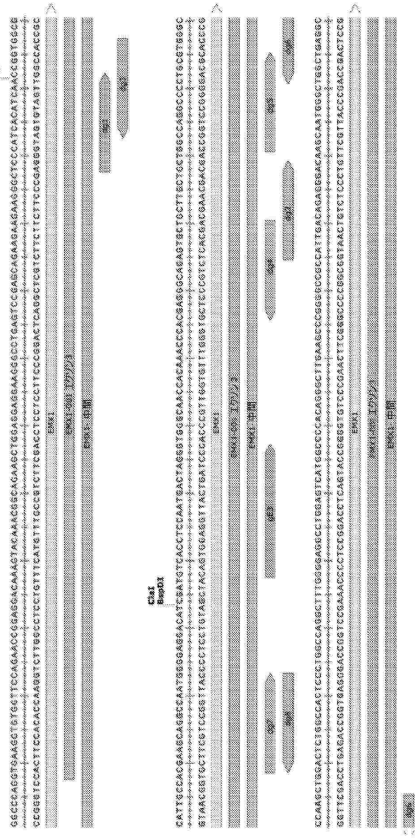


FIG. 82

【図８３】

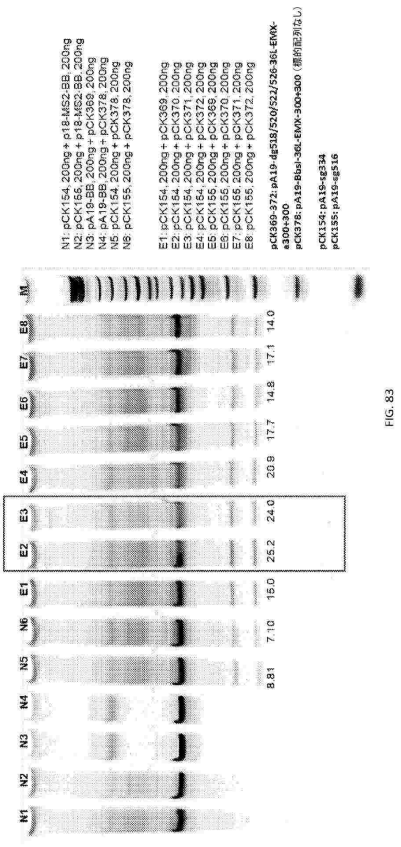


FIG. 83

【図８４】

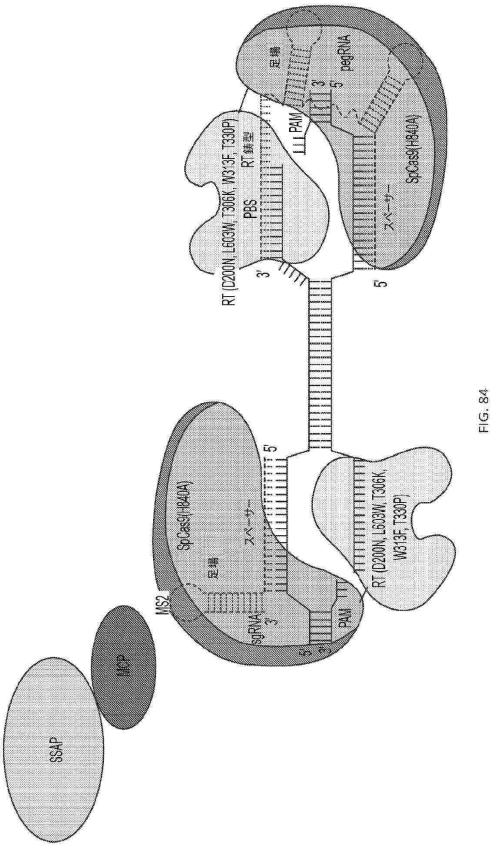


FIG. 84

【図８５－１】

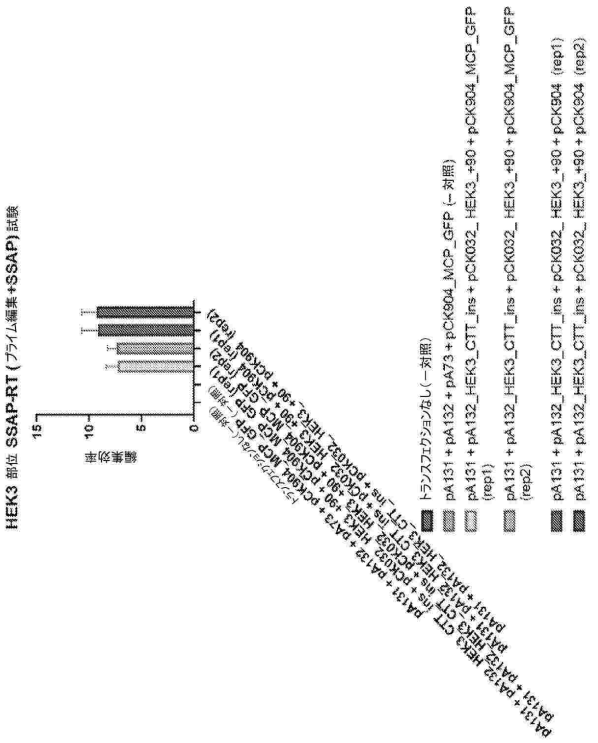


FIG. 85

【図８５－２】

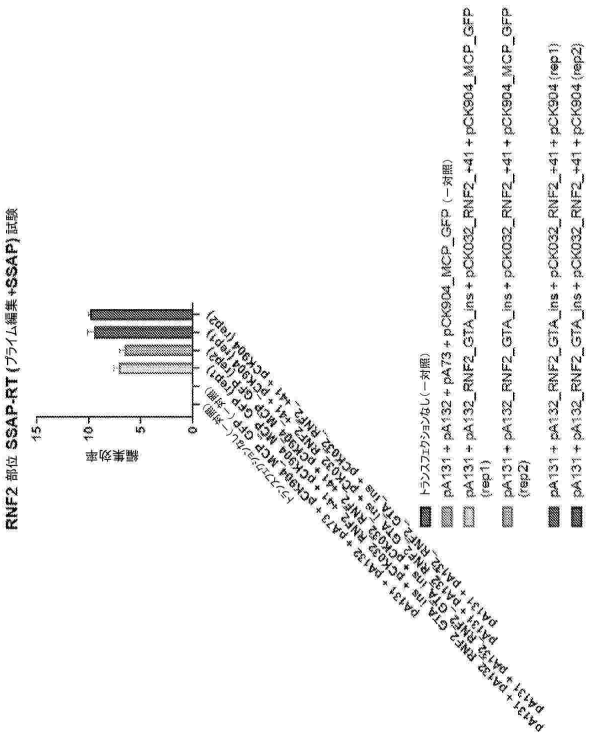


FIG. 85 続き

【図８６－１】

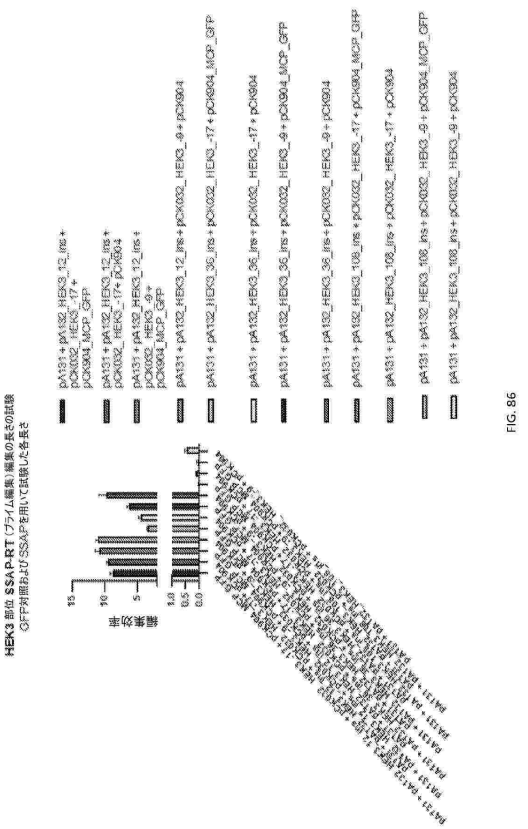


FIG. 86

【図８６－２】



FIG. 86 続き

【図８７】

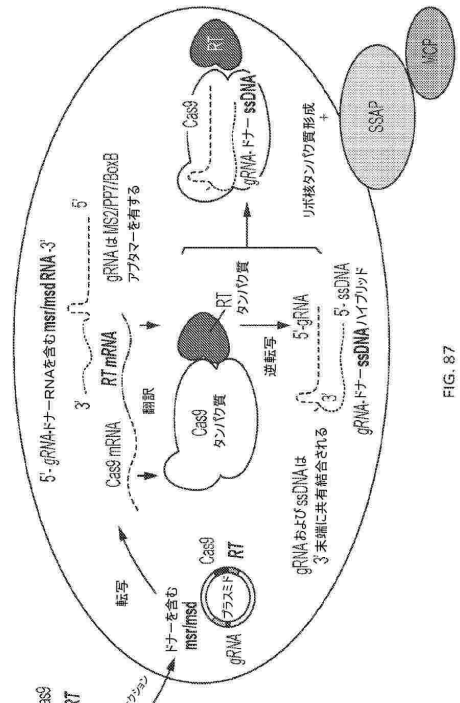
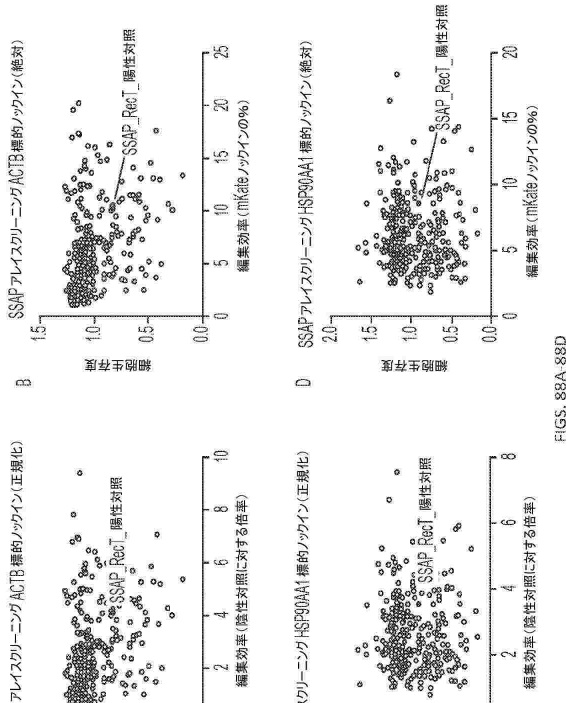


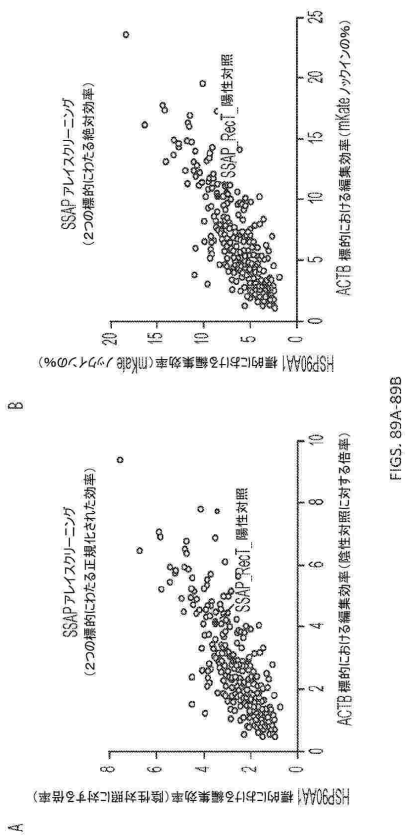
FIG. 87

【図８８】



FIGS. 88A-88D

【図８９－１】



FIGS. 89A-89B

【図８９－２】

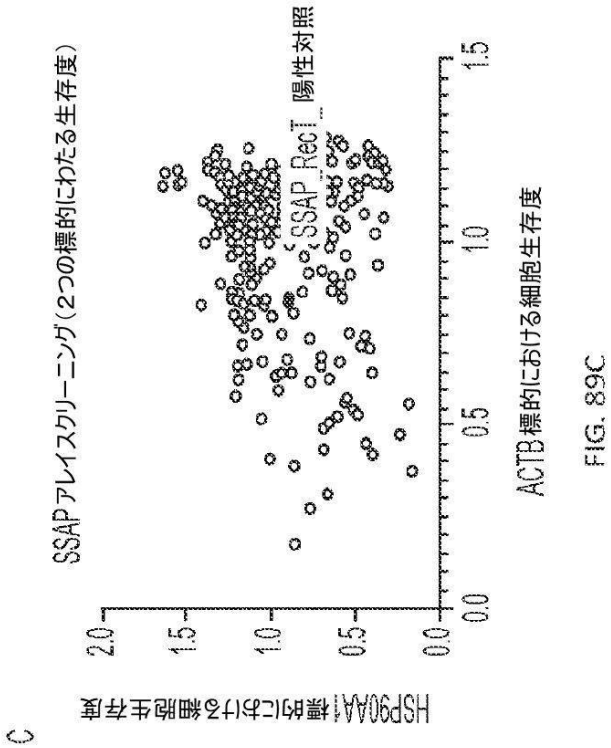


FIG. 89C

【図９０－１】

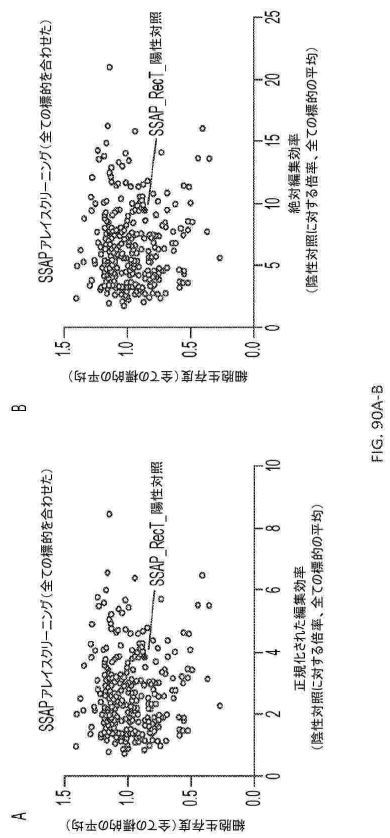


FIG. 90A-B

【図９０－２】

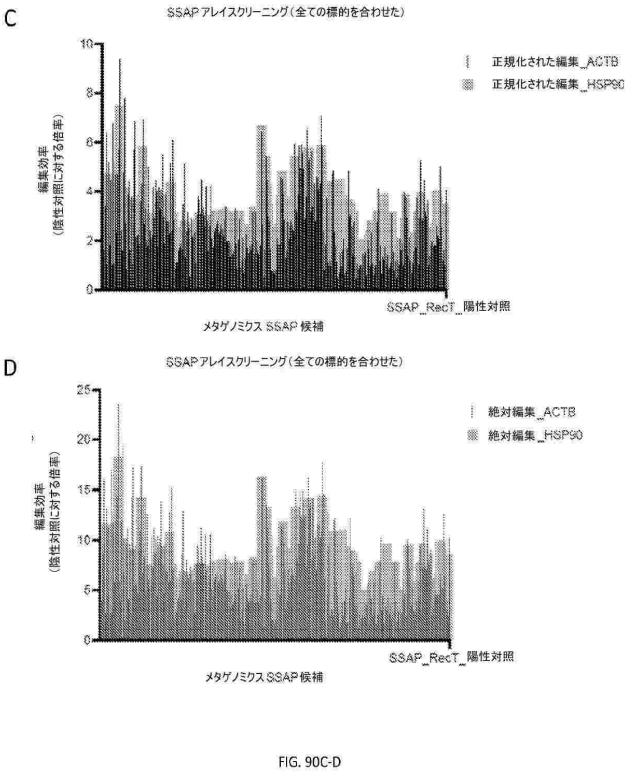


FIG. 90C-D

【図９１】

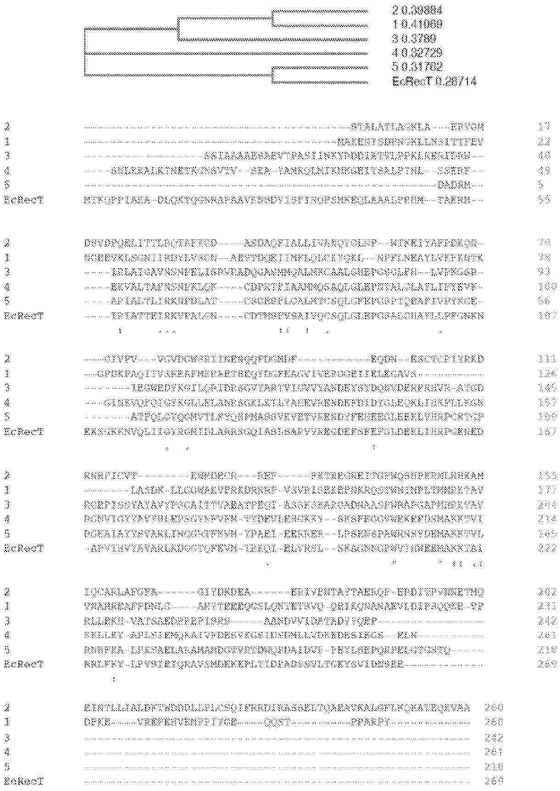


FIG. 91

【図９２－１】

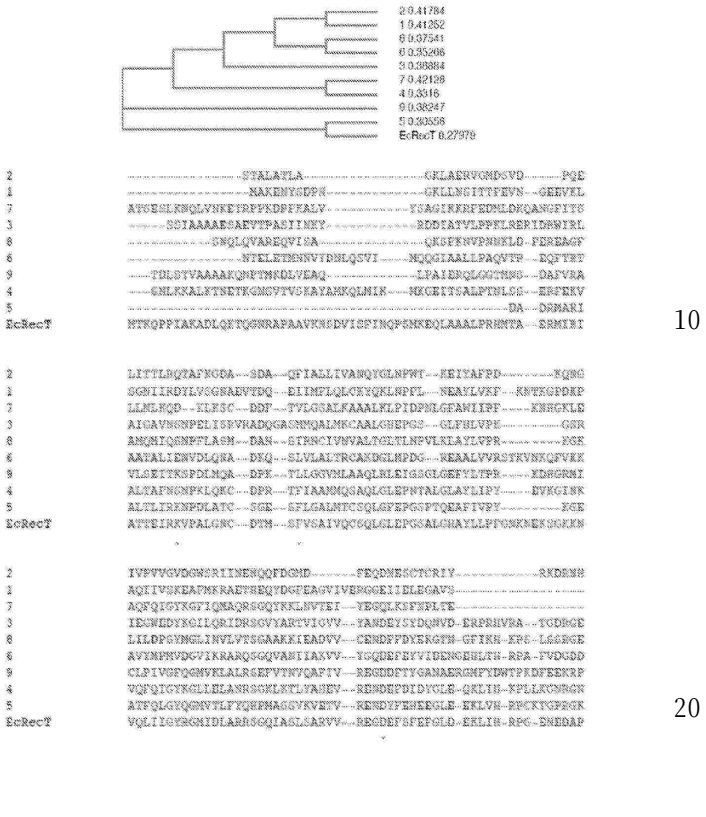


FIG. 92

【図９２－２】



FIG. 92（続き）

【図９３】

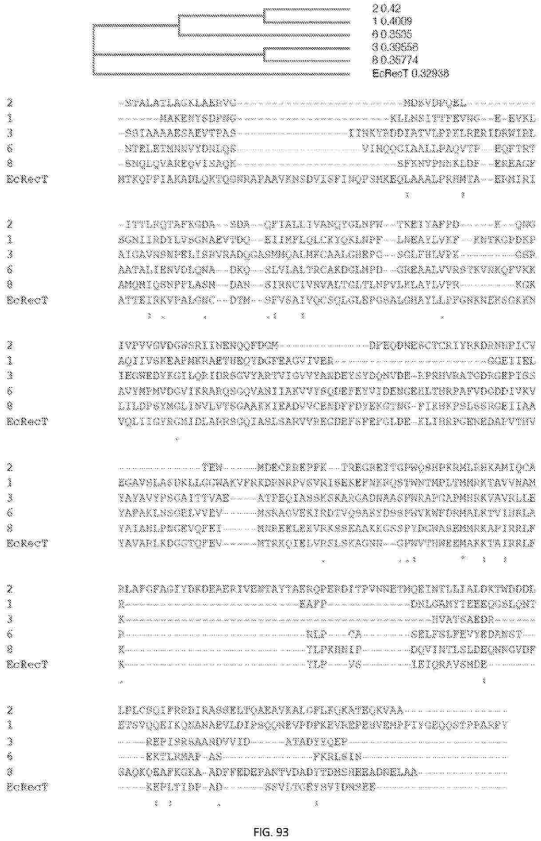


FIG. 93

【図９４－１】

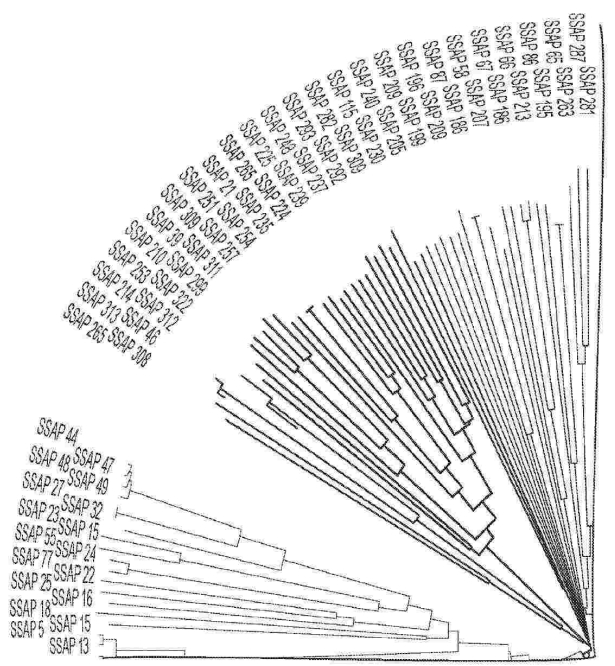


FIG. 94

【図９４－２】

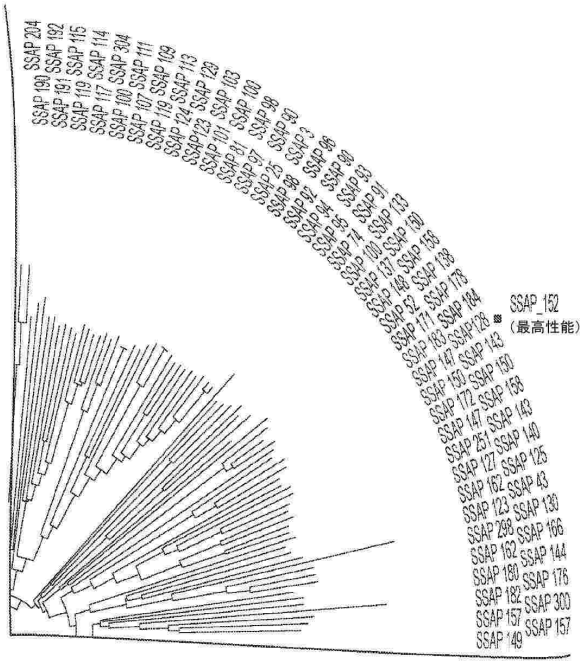


FIG. 94
続き

【図９４－３】

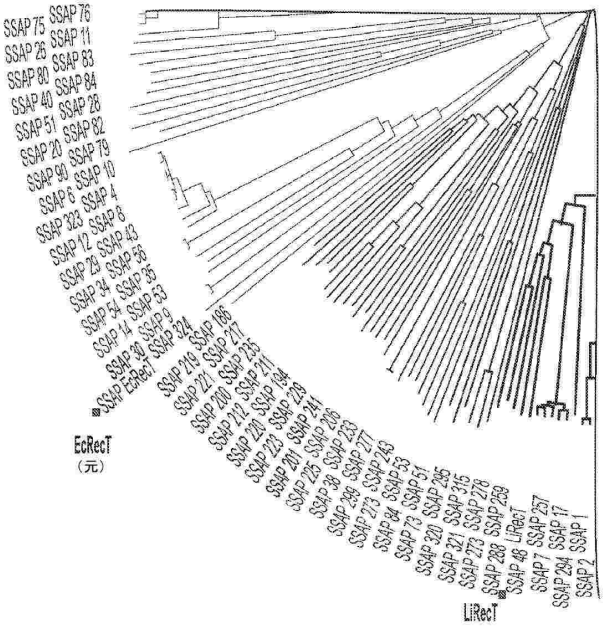


FIG. 94
続き

【図９４－４】

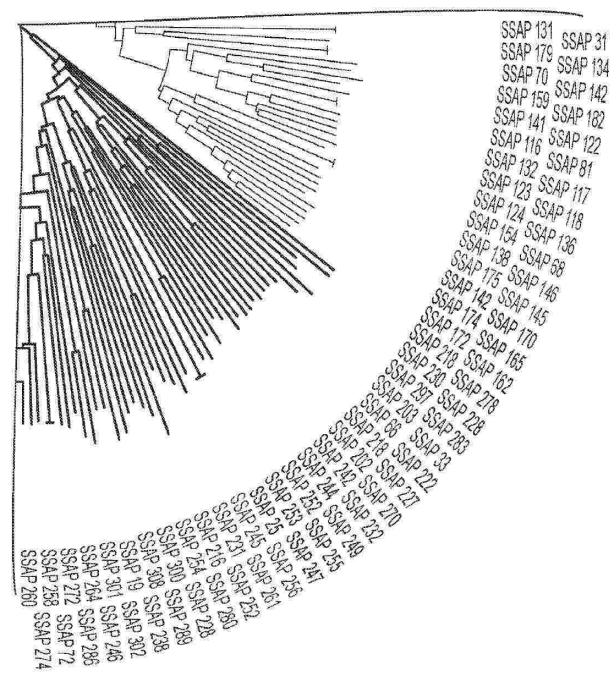


FIG. 94
続き

【図９５】

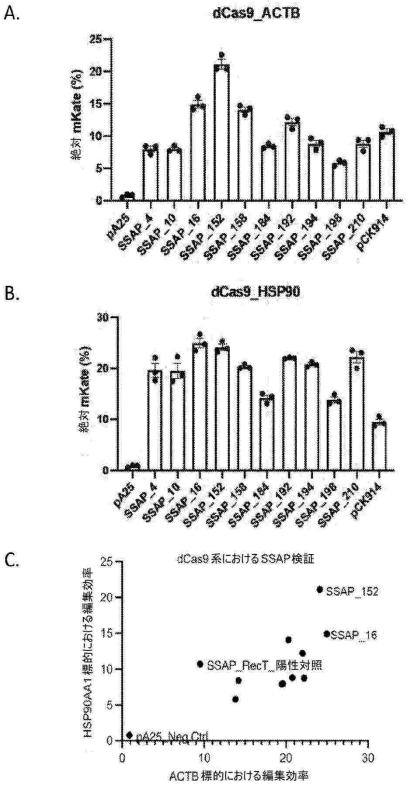


FIG. 95

【図９６】

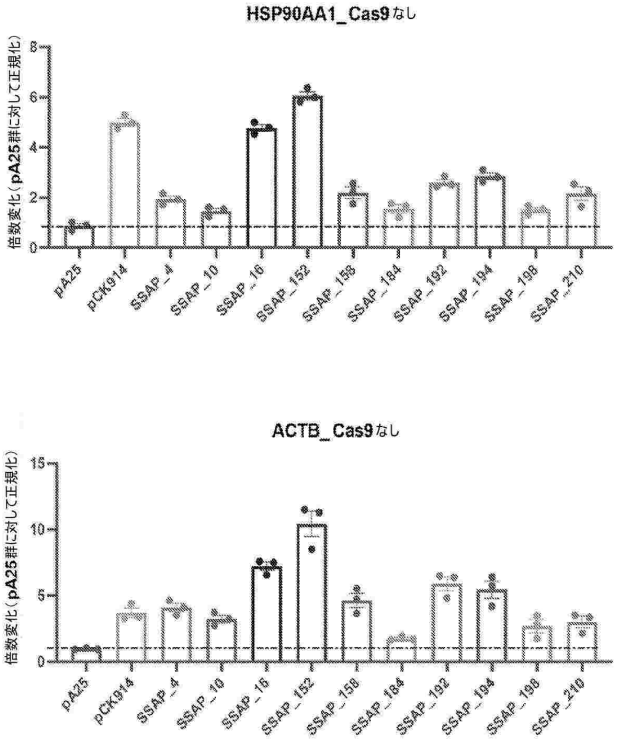


FIG. 96

【図９７】

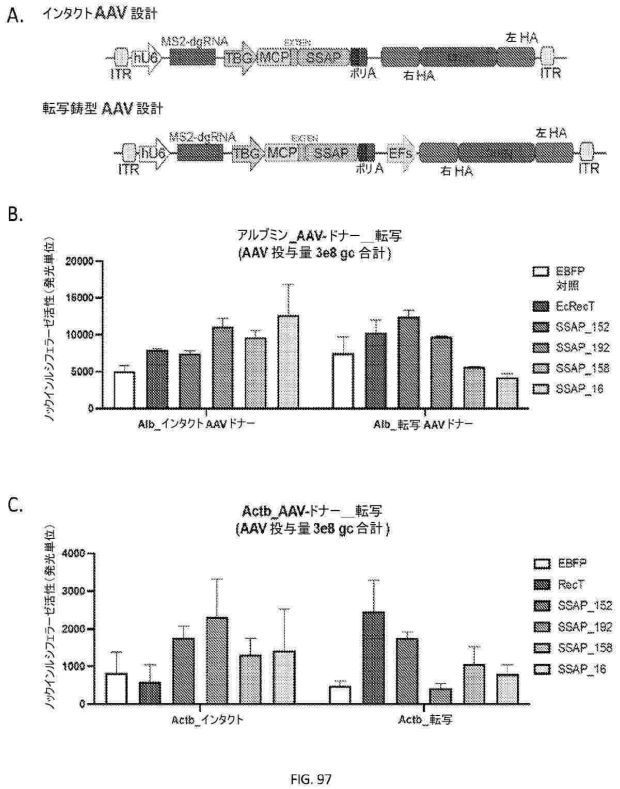


FIG. 97

【図９８】

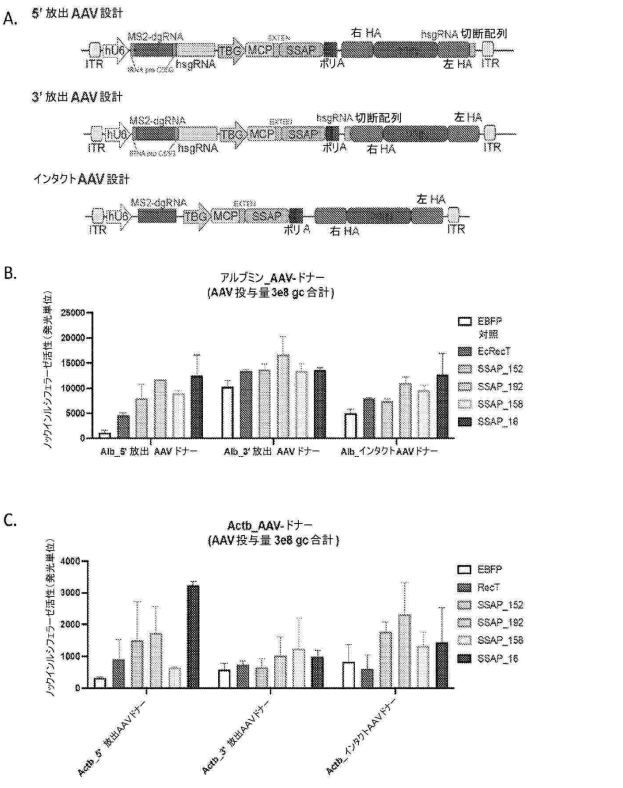


FIG. 98A-98C

【図９９】

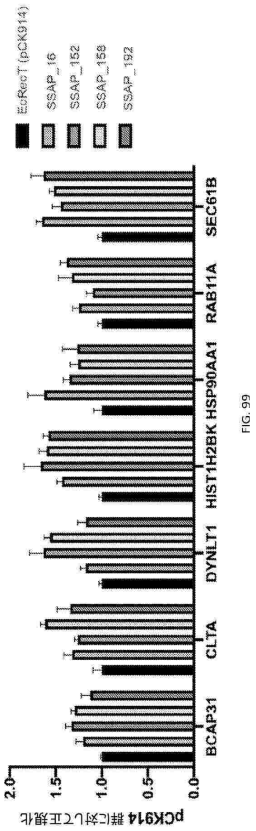


FIG. 99

【図１００】

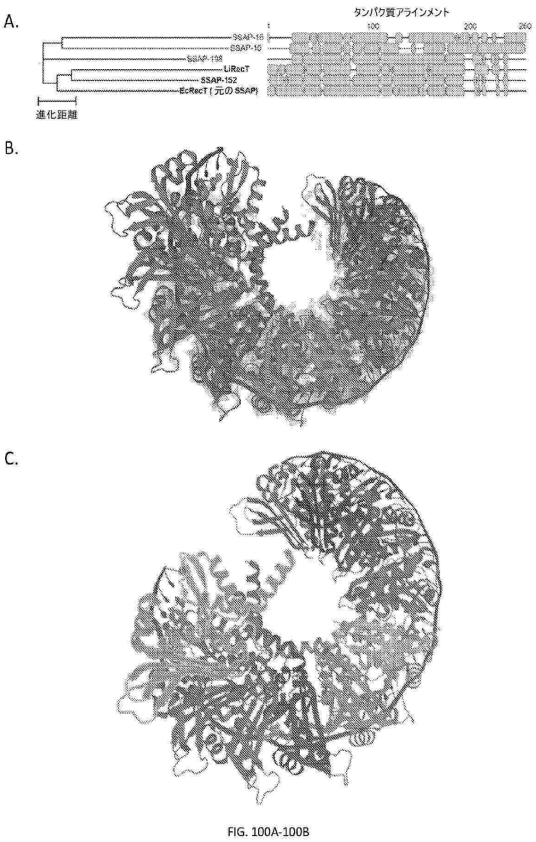


FIG. 100A-100B

【図１０１】

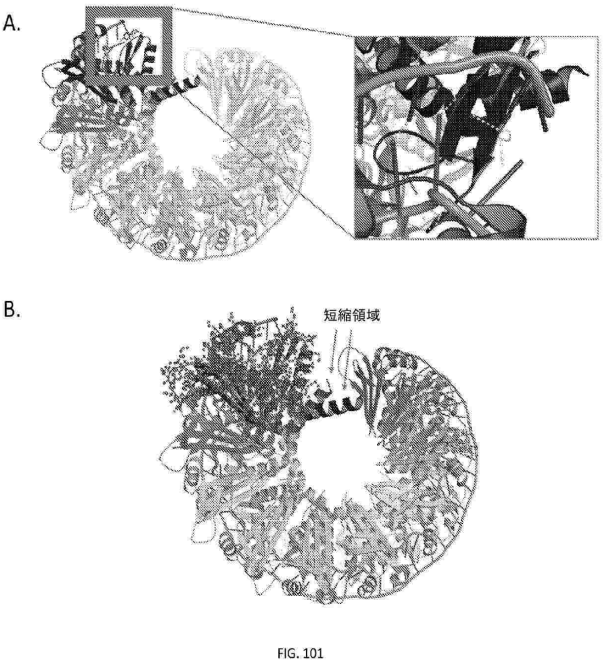


FIG. 101

【配列表】

<u>20255057320000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/62406

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C12N 9/22; C12N 15/11; C12N 15/63; C12N 15/85 (2023.01)
ADD.

CPC - INV. C12N 9/22; C12N 15/111; C12N 15/115; C12N 15/63; C12N 15/85
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)
See Search History document

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

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2019/0233814 A1 (Zhang, F., et al.) 01 August 2019; abstract; paragraphs [0006], [0007], [0009], [0010], [0019], [0040], [0045], [0140], [0144], [0159], [0191], [0209], [0211], [0212], [0222], [0223], [0372], [0447], [0655], [0704], [0707], [0718], [0748], [0810]; [1134], [1140], [1258], claims 1, 22, 42	1-6, 43-48, 51-53, 97-99
A	WO 2018/081535 A2 (Massachusetts Institute of Technology) 03 May 2018; entire document	1-6, 43-48, 51-53, 97-99
A	US 2020/0332307 A1 (KWS SAAT SE & Co. KGaA) 22 October 2020; entire document	1-6, 43-48, 51-53, 97-99

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 April 2023 (29.04.2023)	JUL 05 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/62406

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:
An "Invitation to Furnish Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Listing and to Pay, Where Applicable, Late Furnishing Fee" (Form PCT/ISA/225), was mailed on 01 March 2023 (01.03.2023). The sequence listing filed with the ISA/US on 31 March 2023 (31.03.2023) in response to the Form PCT/ISA/225 was defective. Therefore, the International search was carried out only to the extent possible without a sequence listing.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/62406

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.: 7-42, 49-50, 54-96, 100-143
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

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

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

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

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

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K	*4/00 (2006.01)*	C07K	4/00		
C07K	*14/00 (2006.01)*	C07K	14/00		
C12N	*1/15 (2006.01)*	C12N	1/15		
C12N	*1/19 (2006.01)*	C12N	1/19		
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10		
C07K	*19/00 (2006.01)*	C07K	19/00		
C12N	*15/62 (2006.01)*	C12N	15/62	Z	
C12Q	*1/02 (2006.01)*	C12Q	1/02		
C07K	*14/01 (2006.01)*	C07K	14/01		
C07K	*14/08 (2006.01)*	C07K	14/08		
C12N	*5/071(2010.01)*	C12N	15/09	110	
C12N	*5/0735(2010.01)*	C12N	5/071		
A01K	*67/0275(2024.01)*	C12N	5/0735		
A01K	*67/60 (2025.01)*	A01K	67/0275		
C12N	*9/00 (2006.01)*	A01K	67/033	501	
C12N	*9/22 (2006.01)*	C12N	9/00		
A61K	*48/00 (2006.01)*	C12N	9/22		
A61K	*31/7088(2006.01)*	A61K	48/00		
A61K	*31/7105(2006.01)*	A61K	31/7088		
A61K	*38/16 (2006.01)*	A61K	31/7105		
A61K	*38/43 (2006.01)*	A61K	38/16		
C12N	*15/12 (2006.01)*	A61K	38/43		
		C12N	15/12		

(32)優先日　令和4年2月10日(2022.2.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　PCT/US2022/075850
(32)優先日　令和4年9月1日(2022.9.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,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,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332
弁護士　山本 健策
(72)発明者　コン， リー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４３０５－２０３８， スタンフォード， メイン クワッド， ビルディング １７０， ３アールディー フロア， ピー．オー． ボックス ２０３８６， オフィス オブ ザ ゼネラル カウンセル， ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ レランド スタンフォード ジュニア ユニバーシティー 気付
(72)発明者　ワン， チェンクン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４３０５－２０３８， スタンフォード， メイン クワッド， ビルディング １７０， ３アールディー フロア， ピー．オー． ボックス ２０３８６， オフィ

ス オブ ザ ゼネラル カウンセル， ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ レランド スタンフォード ジュニア ユニバーシティー 気付
(72)発明者 チュ， ユアンハオ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４３０５－２０３８， スタンフォード， メイン クワッド， ビルディング １７０， ３アールディー フロア， ピー．オー． ボックス ２０３８６， オフィス オブ ザ ゼネラル カウンセル， ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ レランド スタンフォード ジュニア ユニバーシティー 気付

Ｆターム（参考） 4B063 QA01 QA20 QQ07 QQ08 QQ42 QQ52 QR10 QR20 QR32 QR35 QR76 QR77 QS34
4B065 AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA44 CA46
4C084 AA02 AA13 BA03 BA41 CA53 DC01 MA02 NA05 NA06 NA14 ZA361 ZA362 ZA891 ZA892 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262 ZB321 ZB322
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA04 NA05 NA06 NA14 ZA36 ZA89 ZB11 ZB26 ZB32
4H045 AA10 AA30 BA09 BA41 CA01 CA40 EA20 EA50 FA74