

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

DNA 結合タンパク質又はこれをコードする核酸；

シトシン脱アミノ酵素から由来した第 1 分割体及び第 2 分割体又はこれをコードする核酸；及び

アデニン脱アミノ酵素又はこれをコードする核酸；を含み、

前記第 1 分割体及び第 2 分割体は、それぞれ前記 DNA 結合タンパク質に結合される形態である、植物細胞小器官 DNA のアデニン塩基校正用組成物。

【請求項 2】

前記第 1 分割体と第 2 分割体のそれぞれは、シトシン脱アミノ酵素活性を有さないことを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。 10

【請求項 3】

前記シトシン脱アミノ酵素は、二本鎖 DNA に作用する脱アミノ酵素 (DddA) 又はそのオルソログから由来したことを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記第 1 分割体は、配列番号 1 の配列のうち、N - 末端から G 3 3、G 4 4、A 5 4、N 6 8、G 8 2、N 9 8、及び G 1 0 8 からなる群から選ばれる一つ以上までの配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記第 2 分割体は、配列番号 1 の配列のうち、G 3 4、P 4 5、G 5 5、N 6 9、T 8 3、A 9 9、及び A 1 0 9 からなる群から選ばれる一つ以上から C - 末端までの配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。 20

【請求項 6】

前記 DNA 結合タンパク質は、ZF タンパク質 (zinc-finger protein)、又は TALE アレイ (transcription activator-like effector array) である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記 DNA 結合タンパク質は、2 個 ~ 4 0 個のアミノ酸残基を含むペプチドリンカーを介して連結されることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記リンカーは、次を含む、請求項 7 に記載の組成物：

2 a . a リンカー：G S；

5 a . a リンカー：T G E K Q；

1 0 a . a リンカー：S G A Q G S T L D F；

1 6 a . a リンカー：S G S E T P G T S E S A T P E S；

2 4 a . a リンカー：S G T P H E V G V Y T L S G T P H E V G V Y T L；又は

3 2 a . a リンカー：G S G G S S G G S S G S E T P G T S E S A T P E S S G G S S G G S。 30

【請求項 9】

前記 DNA 結合タンパク質は、ジンクフィンガータンパク質であって、前記第 1 分割体及び第 2 分割体のそれぞれは、前記ジンクフィンガータンパク質の N - 末端又は C - 末端に結合されている形態である、請求項 1 に記載の組成物。 40

【請求項 10】

前記 DNA 結合タンパク質は、TALE アレイであって、単一 TALE アレイが分割体の一端に結合された形態であるか、又は、第 1 TALE アレイ及び第 2 TALE アレイが第 1 分割体及び第 2 分割体に結合された形態である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記アデニン脱アミノ酵素は、DNA 結合タンパク質又はシトシン脱アミノ酵素の N 又は C - 末端に結合された、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記アデニン脱アミノ酵素は、TadA から由来したデオキシアデニン脱アミノ酵素である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 13】

葉緑体伝達ペプチド又はこれをコードする核酸を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 14】

ミトコンドリア伝達タンパク質 (Mitochondrial Targeting Signal、MTS) 又はこれをコードする核酸を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 15】

次を通じて植物細胞に伝達されることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物：

遺伝子銃を用いた注入 (Bombardment)；

PEG - 媒介原形質体トランスフェクション (Protoplast transfection、PEG - mediated)；

電気穿孔による原形質体トランスフェクション (Protoplast transfection、electroporation)；又は

微細注射による原形質体注射 (Protoplast injection、microinjection)。

【請求項 16】

前記核酸は、次を通じて植物細胞に伝達されることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物：

アグロバクテリウム、例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens)、アグロバクテリウム・リゾゲネス (Agrobacterium rhizogene) などを用いた形質転換；

ウイルストランスフェクション；

遺伝子銃を用いた注入 (Bombardment)；

PEG - 媒介原形質体トランスフェクション (Protoplast transfection、PEG - mediated)；

電気穿孔による原形質体トランスフェクション (Protoplast transfection、electroporation)；又は

微細注射による原形質体注射 (Protoplast injection、microinjection)。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物を植物細胞に処理する段階を含む植物細胞小器官 DNA のアデニンをグアニンに校正する方法。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の方法によって GTTGAAGAAGC 配列を含む葉緑体 psbA 遺伝子のアデニン塩基がグアニンに校正された、アトラジン除草剤抵抗性植物。

【請求項 19】

請求項 17 に記載の方法によって CGTCATCCTCA 配列を含む 16s rRNA のアデニン塩基がグアニンに校正された、スペクチノマイシン抵抗性植物。

【請求項 20】

請求項 17 に記載の方法によって ATG を含む psaA 遺伝子のアデニン塩基がグアニンに校正された、アルビノ表現型を有する植物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物細胞小器官 DNA の塩基校正用組成物、特に、植物細胞小器官 DNA のアデニンをグアニンに校正するための組成物及び校正方法に関する。

【0002】

【背景技術】

【0003】

10

20

30

40

50

DNA結合タンパク質と脱アミノ酵素とが連結された融合タンパク質は、DNA二本鎖切断(DSBs)を生成することなく、ゲノムで標的化されたヌクレオチド置換又は塩基校正(base editing)を行うか、遺伝的障害を誘発する点突然変異を校正するか、原核細胞、ヒト及び他の真核細胞に目的とする単一ヌクレオチド変異を導入するように標的化された方式(targeted manner)で単一ヌクレオチド転換を可能にする。

【0004】

ZFN(zinc-finger nuclease)、TALEN(transcription activator-like effector nuclease)、CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)システム、及び核酸分解効率がな
10
いクリスパー関連タンパク質9(Cas9)変異体及び塩基脱アミノ酵素タンパク質の塩基校正技術などのプログラム(設定)ゲノム校正道具は、塩基配列の変化を通じて植物の遺伝的研究及び作物形質の改善のために発展してきた。しかし、これらの道具は、ミトコンドリア及び葉緑体を含む植物器官のDNA配列を校正するのに適していないが、その主な理由は、ガイドRNAを小器官に伝達するか、二つの化合物を小器官で同時に発現することが難しいためである。植物細胞小器官は、光合成及び呼吸に必要な多くの必須な遺伝子を暗号化している。このような小器官の遺伝子を校正する方法や道具は、このような遺伝子の機能研究や作物生産性及び形質改善において非常に必要である。例えば、ミトコン
20
ドリアatp6遺伝子の標的突然変異が繁殖に有用な特性である雄性不妊を誘発し得ると共に、葉緑体ゲノムの16S rRNA遺伝子の特定の点突然変異が抗生剤耐性を誘発し得る。

【0005】

バクテリア毒素DddAtoxは、Burkholderia cenocepaciaから由来したバクテリア毒素の酵素機能を担当する部分であって、二重らせんDNAのシトシンを脱アミノ化することができる。脱アミノ酵素の例示として、DddAtoxが細胞に対して毒性を有するので、宿主細胞での毒性を避けるために、DddAtoxは、二つの非活性化された分割体(split)に分けて使用するが、それぞれの半体は、DNAに結合できるように考案されたDNA結合タンパク質に連結し、機能を備えたDdCBEペアとして使用することができる。
30

【0006】

このような技術的な背景の下で、植物細胞小器官DNAのアデニンをグアニンに校正できることを確認し、本発明を完成するに至った。

【0007】

【0008】

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、DNA結合タンパク質、分離された形態のシトシン脱アミノ酵素及びアデニン脱アミノ酵素又はこれをコードする核酸を含む植物細胞小器官DNAのアデニン
40
(adenine)塩基校正用組成物を提供することにある。

【0010】

本発明の目的は、植物細胞小器官DNAのアデニンをグアニン(guanine)に校正する方法を提供することにある。

【0011】

本発明の目的は、前記方法によって葉緑体psbA遺伝子のアデニン塩基がグアニンに校正された、除草剤抵抗性植物を提供することにある。

【0012】

本発明の目的は、前記方法によって16S rRNAのアデニン塩基がグアニンに校正された、スペクチノマイシン(Spectinomycin)抵抗性植物を提供するこ
50

とにある。

【 0 0 1 3 】

本発明の目的は、前記方法によって p s a A 遺伝子のアデニン塩基がグアニンに校正された、アルビノ表現型を有する植物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 4 】

前記目的を達成するために、本発明は、DNA 結合タンパク質又はこれをコードする核酸；シトシン脱アミノ酵素 (d e a m i n a s e) から由来した第 1 分割体及び第 2 分割体又はこれをコードする核酸；及びアデニン脱アミノ酵素又はこれをコードする核酸；を含み、前記第 1 分割体及び第 2 分割体は、それぞれ前記 DNA 結合タンパク質に結合される形態である、植物細胞小器官 DNA のアデニン塩基校正用組成物を提供する。

10

【 0 0 1 5 】

また、本発明は、前記組成物を植物細胞に処理する段階を含む植物細胞小器官 DNA のアデニンをグアニンに校正する方法を提供する。

【 0 0 1 6 】

また、本発明は、前記方法によって G T T G A A A G C 配列を含む葉緑体 p s b A 遺伝子のアデニン塩基がグアニンに校正された、アトラジン (A t r a z i n e) 除草剤抵抗性植物に関する。

【 0 0 1 7 】

本発明は、前記方法によって C G T C A T C C T C A 配列を含む 1 6 s r R N A のアデニン塩基がグアニンに校正された、スペクチノマイシン抵抗性植物に関する。

20

【 0 0 1 8 】

本発明は、前記方法によって A T G を含む p s a A 遺伝子のアデニン塩基がグアニンに校正された、アルビノ表現型を有する植物に関する。

【 0 0 1 9 】

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 0 】

【図 1】D d d A t o x とアデニン脱アミノ酵素 (A d e n i n e d e a m i n a s e) を T A L E に結合した校正器に対する模式図である。

【 0 0 2 1 】

【図 2】塩基校正しようとするレタス (L e t t u c e) の p s b A 位置を示した図である。

30

【 0 0 2 2 】

【図 3】m R N A を伝達し、培養を通じてカルス (C a l l u s) を確保した後、アデニン塩基校正効率を確認した結果を示した図である。

【 0 0 2 3 】

【図 4】レタスプロトプラスト (L e t t u c e p r o t o p l a s t) に試験管合成した m R N A を伝達し、7 日後にアデニン塩基校正効率を確認した結果を示した図である。

【 0 0 2 4 】

【図 5】m R N A を伝達し、培養を通じてカルスを確保した後、アデニン塩基校正効率を確認した結果を示した図である。

40

【 0 0 2 5 】

【図 6】多くの植物の p s b A DNA シーケンス (s e q u e n c e) アライン結果を示した図である。

【 0 0 2 6 】

【 0 0 2 7 】

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 8 】

別の方式で定義されない限り、本明細書で使用された全ての技術的及び科学的用語は、

50

本発明の属する技術分野で熟練した専門家によって通常理解されるのと同じ意味を有する。一般に、本明細書における命名法は、本技術分野でよく知られており、通常使用されるものである。

【0029】

植物細胞の小器官DNAの塩基校正としては、DddAtoxをTALEと結合し、シトシンをチミンに校正する方法のみが存在していた。本発明に係る技術的課題は、DddAtoxとアデニン脱アミノ酵素をTALEに結合し、細胞小器官DNAのアデニンをグアニンに塩基校正しようとする。既存には不可能であった細胞小器官DNAのアデニンの塩基校正により、除草剤抵抗性を有する植物などの機能性植物を開発することができる。

【0030】

本出願の発明者等は、DNAに結合できるTALE又はZFPタンパク質にDddAtoxシトシン脱アミノ酵素とA-to-G転換(A to G conversion)を起こし得るアデニン脱アミノ酵素を連結し、A塩基を校正可能な塩基校正器(base editor)を製作した。

【0031】

既存のDddAtoxを活用した脱アミノ酵素(DdCBE)の場合、DNA結合モジュール(binding module)としてTALEリピート(repeat)を使用するシトシン脱アミノ酵素である。C-to-T転換のみを起こすDdCBEとは異なり、DdABEはA-to-G転換を起こし得るので、他の変異パターンを作り出すことができる。

【0032】

DdABEは、それ自体で二本鎖DNAを認識し、脱アミノ化を起こすので、RNAなどの付加的なコンポーネントがない。ミトコンドリア(mitochondria)や葉緑体(chloroplast)などの場合、RNAを伝達するメカニズムが知られていないので、クリスパーシステム(Crispr system)を適用することができなかった。しかし、このようなコンポーネントがないDdABEは、細胞内のゲノムDNAを標的化できるだけでなく、ミトコンドリアや葉緑体などの小器官のDNAを標的化し、特定のDNAのA-to-G転換を起こし得る。

【0033】

DdABEは、必要に応じて、分割体となったDddAtoxを使用することもでき、全長(full length)のDddAtox変異体(variant)を使用することもできるので互換性が高い。

【0034】

本明細書における「校正」は、「編集」と相互互換的に使用可能であり、特異的ゲノム標的の選択的欠失によって核酸配列を変更させる方法を意味する。このような特異的ゲノム標的は、染色体領域、遺伝子、プロモーター、オープンリーディングフレーム又は任意の核酸配列を含むが、これに制限されない。

【0035】

本明細書で使用される「単一塩基」は、核酸配列内の一つ、及びただ一つのスクレオチドを意味する。単一塩基校正の脈絡で使用されるとき、これは、核酸配列内の特異的位置の塩基が相違する塩基に置換されることを意味する。このような置換は、制限なしに置換又は変形を含む、多くのメカニズムによって起こり得る。

【0036】

本明細書で使用される「標的」又は「標的部位」は、任意の組成及び/又は長さの事前に確認された核酸配列を意味する。このような標的部位は、染色体領域、遺伝子、プロモーター、オープンリーディングフレーム又は任意の核酸配列を含むが、これに制限されない。

【0037】

本明細書で使用される「オン-ターゲット」は、プログラム可能なDNA結合領域及び/又は単一ガイドRNA配列と完全に相補的であり得る特異的ゲノム標的の下位配列を意

10

20

30

40

50

味する。

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用される「オフ - ターゲット」は、プログラム可能な DNA 結合領域及び / 又は単一ガイド RNA 配列と部分的に相補的であり得る特異的ゲノム標的の下位配列を意味する。

【 0 0 3 9 】

本発明は、シトシン脱アミノ酵素又はその変異体から由来する第 1 分割体及び第 2 分割体を含み、前記第 1 分割体及び第 2 分割体は、それぞれ前記 DNA 結合タンパク質に結合される形態を有する。

【 0 0 4 0 】

前記シトシン脱アミノ酵素は、アミノ基離脱酵素であって、シトシン (C) をウリジン (U) に転換させることができる。

【 0 0 4 1 】

前記シトシン脱アミノ酵素が使用され得る。前記シトシン脱アミノ酵素として、例えば、APOBEC1 (apolipoprotein B editing complex 1) 及びAID (activation-induced deaminase) の形態が存在するが、ほとんどのDNA脱アミノ酵素は、一本鎖DNAにのみ作動し、DNA結合タンパク質に連結して塩基校正するのに適していない場合がある。具体的には、前記シトシン脱アミノ酵素は、二本鎖DNAに作用する脱アミノ酵素 (DddA) 又はそのオルソログ (orthologue) から由来したものであり得る。さらに具体的には、前記シトシン脱アミノ酵素は、二本鎖DNA特異的バクテリアシトシン脱アミノ酵素であり得る。

【 0 0 4 2 】

前記シトシン脱アミノ酵素は、分割された形態であって、前記シトシン脱アミノ酵素は、分離された第 1 分割体及び第 2 分割体を含み、前記第 1 分割体と第 2 分割体のそれぞれは脱アミノ酵素活性を有さない。

【 0 0 4 3 】

全長シトシン脱アミノ酵素は、tox分割体に該当する配列番号 1 の配列を含むことができる。前記シトシン脱アミノ酵素は、第 1 分割体及び第 2 分割体を含み、前記第 1 分割体と第 2 分割体のそれぞれは脱アミノ酵素活性を有さない。

【 0 0 4 4 】

[配列番号 1]

【 0 0 4 5 】

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

【 0 0 4 6 】

一つの実施例において、前記シトシン脱アミノ酵素の第 1 分割体又は第 2 分割体は、配列番号 1 の配列のうち、N - 末端から G 3 3、G 4 4、A 5 4、N 6 8、G 8 2、N 9 8、及び G 1 0 8 からなる群から選ばれる一つ以上までの配列を含むことができる。前記シトシン脱アミノ酵素の第 1 分割体又は第 2 分割体は、配列番号 1 の配列のうち、G 3 4、P 4 5、G 5 5、N 6 9、T 8 3、A 9 9、及び A 1 0 9 からなる群から選ばれる一つ以上から C - 末端までの配列を含むことができる。

【 0 0 4 7 】

具体的には、前記シトシン脱アミノ酵素は、配列番号 2 の第 1 分割体 (G 1 3 3 3 - N) 及び配列番号 3 の第 2 分割体 (G 1 3 3 3 - C) を含むか、配列番号 4 の第 1 分割体 (G 1 3 9 7 - N) 及び配列番号 5 の第 2 分割体 (G 1 3 9 7 - C) を含むか、配列番号 2 の第 1 分割体 (G 1 3 3 3 - N) 及び配列番号 5 の第 2 分割体 (G 1 3 9 7 - C) を含むか、配列番号 4 の第 1 分割体 (G 1 3 9 7 - N) 及び配列番号 2 の第 2 分割体 (G 1 3 3

3 - C) を含むことができる。

【 0 0 4 8 】

(配列番号 2) W i l d - t y p e D d d A t o x G 1 3 3 3 - N

【 0 0 4 9 】

G S Y A L G P Y Q I S A P Q L P A Y N G Q T V G T F Y Y V N D A G G L E S K V
F S S G G

G G C T C T G G T T C C T A C G C C C T G G G T C C A T A T C A G A T T A G T
G C T C C C C A A C T C C C C G C C T A C A A C G G T C A G A C A G T G G G G A
C C T T T T A C T A T G T C A A C G A C G C C G G G G G A T T G G A A T C C A A
G G T T T T C T C T A G C G G T G G G

10

【 0 0 5 0 】

(配列番号 3) W i l d - t y p e G 1 3 3 3 - C

【 0 0 5 1 】

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

C C A A C A C C T T A T C C T A A C T A C G C T A A C G C C G G G C A C G T C
G A G G G G C A G T C A G C T C T T T T T A T G A G A G A T A A C G G C A T T A
G C G A A G G G C T T G T G T T C C A T A A T A A T C C T G A G G G C A C C T G
T G G C T T C T G T G T A A A T A T G A C C G A A A C A C T T C T G C C T G A G
A A C G C T A A A A T G A C T G T C G T A C C A C C C G A A G G C G C A A T C C
C A G T T A A A C G G G G C G C A A C C G G C G A A A C C A A A G T A T T C A C
C G G A A A C A G C A A T A G T C C A A A G T C C C C C A C C A A G G G A G G T
T G C

20

【 0 0 5 2 】

(配列番号 4) W i l d - t y p e D d d A t o x G 1 3 9 7 - N

【 0 0 5 3 】

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

30

G G T A G C T A C G C A C T T G G T C C T T A C C A G A T T A G C G C A C C C
C A A C T C C C C G C C T A T A A T G G T C A A A C C G T C G G G A C C T T T T
A C T A C G T A A A C G A T G C T G G T G G G C T G G A A T C C A A A G T A T T
C T C C T C A G G G G G C C C T A C A C C C T A C C C C A A C T A C G C C A A T
G C T G G T C A T G T A G A A G G G C A G T C A G C A C T G T T T A T G C G C G
A T A A T G G T A T A A G C G A G G G G T T G G T C T T C C A T A A C A A C C C
A G A G G G T A C T T G T G G C T T C T G T G T G A A T A T G A C T G A A A C C
C T T C T G C C C G A A A A T G C C A A G A T G A C T G T C G T C C C A C C T G
A A G G C

40

【 0 0 5 4 】

(配列番号 5) W i l d - t y p e D d d A t o x G 1 3 9 7 - C

【 0 0 5 5 】

A I P V K R G A T G E T K V F T G N S N S P K S P T K G G C
G C C A T A C C T G T G A A G C G G G G A G C A A C A G G G G A G A C A A A G
G T G T T C A C A G G C A A C T C T A A C A G T C C A A A G A G C C C C A C C A
A A G G C G G G T G T

【 0 0 5 6 】

組み合わされた G 1 3 3 3 N、G 1 3 3 3 C、G 1 3 9 7 N 及び G 1 3 9 7 C は、分割
形態の脱アミノ酵素として使用可能であり、具体的には、L e f t - G 1 3 3 3 - N + R
i g h t - G 1 3 3 3 - C、L e f t - G 1 3 9 7 - N + R i g h t - G 1 3 9 7 - C

50

、L e f t - G 1 3 9 7 - N + R i g h t - G 1 3 3 3 - C、又はL e f t - G 1 3 3 3 - N + R i g h t - G 1 3 9 7 - Cの形態で使用され得る。

【0057】

前記DNA結合タンパク質は、例えば、ジンクフィンガータンパク質(z i n c f i n g e r p r o t e i n)、T A L E (T r a n s c r i p t i o n a c t i v a t o r - l i k e e f f e c t o r)アレイ又はこれらの組み合わせであり得る。

【0058】

前記ジンクフィンガータンパク質のジンクフィンガーモチーフは、DNA結合ドメインを有し、フィンガーのc-末端部分は、DNA配列を特異的に認識する。3個～6個のジンクフィンガーモチーフを含むDNA結合タンパク質は、DNA配列を認識する。

10

【0059】

一つの実施例において、前記シトシン脱アミノ酵素の第1分割体及びシトシン脱アミノ酵素の第2分割体のそれぞれは、ジンクフィンガータンパク質のN-末端又はC-末端に結合することができる。

【0060】

シトシン脱アミノ酵素の第1分割体のN-末端にジンクフィンガータンパク質(Z F - L e f t)のC-末端が結合し、シトシン脱アミノ酵素の第2分割体N-末端にジンクフィンガータンパク質(Z F - R i g h t)のC-末端が結合(C C c o n f i g u r a t i o n)するか；

【0061】

シトシン脱アミノ酵素の第1分割体のC-末端にジンクフィンガータンパク質(Z F - L e f t)のN-末端が結合し、シトシン脱アミノ酵素の第2分割体のN-末端にジンクフィンガータンパク質(Z F - R i g h t)のC-末端が結合(N C c o n f i g u r a t i o n)するか；

20

【0062】

シトシン脱アミノ酵素の第1分割体のN-末端にジンクフィンガータンパク質(Z F - L e f t)のC-末端が結合し、シトシン脱アミノ酵素の第2分割体のC-末端にジンクフィンガータンパク質(Z F - R i g h t)のN-末端が結合(C N c o n f i g u r a t i o n)するか；又は

【0063】

シトシン脱アミノ酵素の第1分割体のC-末端にジンクフィンガータンパク質(Z F - L e f t)のN-末端が結合し、シトシン脱アミノ酵素の第2分割体のC-末端にジンクフィンガータンパク質(Z F - R i g h t)のN-末端が結合(N N c o n f i g u r a t i o n)することができる。

30

【0064】

前記Z F - L e f tは、次の配列を含むことができる：

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

40

前記Z F - R i g h tは、次の配列を含むことができる：

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

【0065】

Z Fは、DNAターゲットによって配列が変わり得る。Z Fは、DNAターゲット配列によってカスタマイズ製作され得る。Z Fは、DNA 3 b pを認識するので、普通、3個～6個のZ Fをつなぎ合わせ、9～18 b pのDNAを認識するZ F組み合わせを製作することができ、例えば、G N N、T N N、C N N又はA N Nなどのモジュールが含まれ

50

たライブラリを用いて製作することができる。

【0066】

場合に依じて、前記ジンクフィンガータンパク質は、リンカーを介して脱アミノ酵素と連結され得る。前記リンカーは、2個～40個のアミノ酸残基を含むペプチドリンカーであり得る。前記リンカーは、例えば、2aa、5aa、10aa、16aa、24aa又は32aaの長さのリンカーなどであり得るが、これに制限されるものではない。

【0067】

一つの実施例において、前記リンカーは、次を含むことができる：

【0068】

2aaリンカー：GS

10

【0069】

5aaリンカー：TGEKQ

【0070】

10aaリンカー：SGAQGSTLDF

【0071】

16aaリンカー：SGSETPTGTSESATPES

【0072】

24aaリンカー：SGTPHEVG VYTLSGTPHEVG VYT L、又は

【0073】

32aaリンカー：GSGGSSGGS SSGSETPTGTSESATPES SSGS SSGS。 20

【0074】

本発明に係る具体的な実施例において、分割脱アミノ酵素とジンクフィンガータンパク質とがリンカーを介して連結され得る。また、第1分割体を含む半分の脱アミノ酵素のN-末端にジンクフィンガータンパク質が結合し、第2分割体を含む半分の脱アミノ酵素のN-末端にジンクフィンガータンパク質が結合する。このとき、左側と右側のZFPが付く部分の間であるスペーサーでCからTへの塩基転換が起こり得る。左側と右側のZFPが、いずれも24aaリンカーを介して第1分割体を含む半分の脱アミノ酵素及び第2分割体を含む半分の脱アミノ酵素のそれぞれと連結される場合、高い校正効率を示すことを確認した。

30

【0075】

前記TALエフェクター(TALE)は、33個から34個のアミノ酸配列が繰り返された形態からなっており、約9個のドメイン(RVD、Repeated variant domain)が繰り返される。前記TALエフェクター(TALE)は、一つのドメイン当たり到一个のヌクレオチドを認知することができ、12番目～13番目のアミノ酸配列によって特異的なDNA配列と結合することができる(HD->Cytosine、NI->Adenine、NG->Thymine、NN->Guanine)。TALエフェクター(TALE)は、標的部位内の一本鎖DNAを認識する。標的部位の間の距離は、12-14ヌクレオチドであり得る。

【0076】

40

前記TALEDドメインは、一つ以上のTALE-リピートの組み合わせによって配列特異的方式でヌクレオチドに結合するタンパク質ドメインを意味する。少なくとも一つ以上のTALE-リピート、具体的には1個～30個のTALE-リピートを含むが、これに限定されない。TALE-リピートは、TALEDドメイン内の特定のヌクレオチド配列を認識する部位である。

【0077】

前記TALEDドメインには、バックボーン構造としてTALEのN-末端包含領域及びTALEのC-末端包含領域が含まれる。

【0078】

50

Name	Sequence
First TALE N- term	GATATAGCTGATTTGAGGACCCTCGGGTACTCACAGCAGCAACAAGAAAAATCA AACCAAAGGTACGTAGCACGGTTGCCCAACATCATGAAGCCCTAGTTGGTCACGG ATTTACTCATGCCCATATTGTTGCACTGAGTCAACACCCTGCTGCATTAGGCACAG TGGCTGTGAAATATCAAGATATGATTGCTGCTCTTCCTGAGGCCACACACGAGGCA ATTGTGGGTGTTGGAAAACAATGGTCTGGTGC GCGAGCGCTTGAAGCTCTCCTAA CCGTAGCTGGAGAGTTGAGAGGCCACCGCTTCAGCTTGACACAGGCGAGCTGTT GAAGATAGCAAAGAGGGGGGGTGTAACTGCTGTTGAAGCAGTCCATGCATGGAGA AATGCATTAAGTGGAGCTCCA
	DIADLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVK YQDMIAALPEATHEAIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIARG GVTAVEAVHAWRNALTGAP
Second TALE N- term	GATATTGCTGATCTTCGAACATTGGGTTATTCTCAGCAGCAACAAGAGAAAATCAA ACCGAAAGTCCGTTCAACCGTAGCTCAACATCATGAAGCCCTTGTGGTCATGGAT TTACTCATGCTCACATTGTTGCTCTAAGTCAGCACCCCTGCCGCGCTAGGCACAGTT GCCGTCAAGTATCAAGATATGATAGCTGCTTTACCTGAAGCAACCCACGAGGCAAT AGTGGGGGTTGGGAAGAGGGGTGCAGGCCAGGGCACTGGAGGCACTCTTAAC AGTAGCTGGAGAACTTCGGGGACCACCATTGCAGCTTGATACTGGACAACTCTTG AAGATCGCAAAAAGAGGGGGTGTGACTGCTGTGGAAGCTGTTTCATGCATGGAGAA ATGCTTTGACGGGAGCACCCCTG
	DIADLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVK YQDMIAALPEATHEAIVGVGKRGAGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIARG GVTAVEAVHAWRNALTGAPL

10

20

30

【 0 0 7 9 】

First TALE C- term	AGCATAGTTGCTCAGCTAAGTAGACCTGATCCAGCACTTGCTGCATTGACGAACGA TCATCTCGTAGCGCTGGCTTGTGTTGGGCGGCAGGCCAGCCTTGGACGCCGTGAAG AAAGGATTAGGT
	SIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLG
Second TALE C- term	TCGATAGTAGCACAATTAAGCAGGCCTGACCCTGCACTTGCTGCTCTTACAAATGA TCATCTGTGCTCTGGCTGTTTGGGTGGGCGTCCCGCTTGGATGCTGTAAAG AAAGGACTTGGT
	SIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLG

40

【 0 0 8 0 】

切断部位を基準にして前記 T A L E ドメインが結合する位置によって、単一 T A L E アレイ又は第 1 T A L E アレイ及び第 2 T A L E アレイがそれぞれ結合することができる。

【 0 0 8 1 】

前記シトシン脱アミノ酵素の第 1 分割体に第 1 T A L E が結合 (l e f t T A L E) し、前記シトシン脱アミノ酵素の第 2 分割体に第 2 T A L E (r i g h t T A L E) が

50

結合することができ、それぞれ N' - T A L E - 第 1 分割体 - C' 及び N' - T A L E - 第 2 分割体 - C' 構造を有する。

【 0 0 8 2 】

T A L E アレイは、ターゲット D N A 配列によってカスタマイズ製作することができる。T A L E アレイは、33 個 ~ 35 個のアミノ酸残基で構成されたモジュールが繰り返し配列されて構成されるが、これらは、植物病原菌キサントモナス (X a n t h m o n a s) から由来したものであって、一つのモジュールは、A、C、G、T 塩基をそれぞれ一つずつ認識してから D N A に結合する。それぞれのモジュールの塩基特異性は、12 番目及び 13 番目のアミノ酸残基によって決定されるが、これらを R V D (r e p e a t v a r i a b l e d i - r e s i d u e) という。例えば、R V D が N N であるモジュールは G を認識し、N I は A を認識し、H D は C を認識し、N G は T を認識する。T A L E アレイは、最小 14 個から最大 18 個以上のモジュールで構成され、ターゲット D N A 配列 15 b p ~ 20 b p を認識できるように設計することができる。

10

【 0 0 8 3 】

C a s タンパク質は、変異された形態で含むことができ、D N A 二本鎖を切断するエンドヌクレアーゼ活性を喪失するように変異されたものを意味することができ、例えば、エンドヌクレアーゼ活性を喪失し、ニッカーゼ活性を有するように変異された変異標的特異的ヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼ活性とニッカーゼ活性を全て喪失するように変異された形態のうち 1 種以上であり得る。

【 0 0 8 4 】

20

ニッカーゼ活性を有する場合、前記シトシン脱アミノ酵素による塩基変換 (例えば、シトシンがウラジンに変換) と同時に又は順序に関係なく順次的に、前記塩基変換が起こった鎖又はその逆鎖 (例えば、塩基変換が起こった鎖の逆鎖) で n i c k が導入され得る (例えば、P A M が位置する鎖の逆鎖で、P A M 配列の 5' 末端方向に 3 番目のヌクレオチドと 4 番目のヌクレオチドとの間に該当する位置に n i c k が導入される)。このような変異 (例えば、アミノ酸置換など) は、触媒活性ドメイン (例えば、C a s 9 の場合、R u v C 触媒ドメイン) で起こるものであり得る。ストレプトコッカス・ピオゲネスから由来した C a s 9 の場合、変異は、触媒活性を有するアスパラギン酸残基 (c a t a l y t i c a s p a r t a t e r e s i d u e ; 10 番目の位置のアスパラギン酸 (D 10) など)、762 番目の位置のグルタミン酸 (E 762)、840 番目の位置のヒスチジン (H 840)、854 番目の位置のアスパラギン (N 854)、863 番目の位置のアスパラギン (N 863)、986 番目の位置のアスパラギン酸 (D 986) などからなる群から選ばれた一つ以上の任意の他のアミノ酸に置換された突然変異を含むことができる。このとき、置換される任意の他のアミノ酸はアラニン (a l a n i n e) であり得るが、これに制限されない。

30

【 0 0 8 5 】

場合に応じて、ストレプトコッカス・ピオゲネスから由来した C a s 9 タンパク質の 1135 番目の位置のアスパラギン酸 (D 1135)、1335 番目の位置のアルギニン (R 1335)、及び 1337 番目の位置のトレオニン (T 1337) のうち一つ以上、例えば、3 個がいずれも他のアミノ酸に置換され、野生型 C a s 9 の P A M 配列 (N G G) と相違する N G A (N は、A、T、G、及び C から選ばれた任意の塩基である。) を認識するように変異されたものであり得る。

40

【 0 0 8 6 】

例えば、ストレプトコッカス・ピオゲネスから由来した C a s 9 タンパク質のアミノ酸配列のうち、

【 0 0 8 7 】

(1) D 10、H 840、又は D 10 + H 840 ;

【 0 0 8 8 】

(2) D 1135、R 1335、T 1337、又は D 1135 + R 1335 + T 1337 ; 又は

50

【 0 0 8 9 】

(3) (1) と (2) の残基の全てにおいてアミノ酸置換が起こったものであり得る。

【 0 0 9 0 】

前記「他のアミノ酸」は、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、バリン、アスパラギン、システイン、グルタミン、グリシン、セリン、トレオニン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、リシン、及び前記各アミノ酸の公知となった全ての変形体のうち、野生型タンパク質が元の変異位置で有するアミノ酸を除いた各アミノ酸から選ばれたアミノ酸を意味する。一例において、前記「他のアミノ酸」は、アラニン、バリン、グルタミン、又はアルギニンであり得る。

10

【 0 0 9 1 】

場合に応じて、ガイドRNAをさらに含むことができる。前記ガイドRNAは、例えば、CRISPR RNA (crRNA)、tracrRNA (trans - activating crRNA)、及び単一ガイドRNA (single guide RNA ; sgRNA) からなる群から選ばれた1種以上であり得、具体的には、crRNAとtracrRNAとが互いに結合した二本鎖crRNA : tracrRNA複合体、又はcrRNA又はその一部とtracrRNA又はその一部とがオリゴヌクレオチドリンカーで連結された一本鎖ガイドRNA (sgRNA) であり得る。

【 0 0 9 2 】

本発明は、アデニン脱アミノ酵素を含む。前記アデニン脱アミノ酵素は、例えば、APOBEC1 (apolipoprotein B editing complex 1)、AID (activation - induced deaminase) 及びtadA (tRNA - specific adenosine deaminase) からなる群から選択可能であり、具体的には、tadA (tRNA - specific adenosine deaminase) であり得る。前記アデニン脱アミノ酵素は、例えば、大腸菌TadAの変異体としてデオキシアデニン脱アミノ酵素 (deoxy - adenine deaminase) であり得る。

20

【 0 0 9 3 】

前記シトシン脱アミノ酵素が分割形態で含まれ、前記DNA結合タンパク質がジンクフィンガータンパク質で、シトシン脱アミノ酵素の第1分割体のC - 末端にジンクフィンガータンパク質 (ZF - Left) のN - 末端が結合し、シトシン脱アミノ酵素の第2分割体のN - 末端にジンクフィンガータンパク質 (ZF - Right) のC - 末端が結合 (NC configuration) した構造において、アデニン脱アミノ酵素は、ジンクフィンガータンパク質 (ZF - Left) のC - 末端、シトシン脱アミノ酵素の第1分割体のN - 末端又はC - 末端、ジンクフィンガータンパク質 (ZF - Right) のN - 末端、シトシン脱アミノ酵素の第2分割体のN - 末端又はC - 末端に結合することができる。

30

【 0 0 9 4 】

アデニン脱アミノ酵素は、シトシン脱アミノ酵素の第1分割体のN - 末端にジンクフィンガータンパク質 (ZF - Left) のC - 末端が結合し、シトシン脱アミノ酵素の第2分割体のN - 末端にジンクフィンガータンパク質 (ZF - Right) のC - 末端が結合 (CC configuration) するか；シトシン脱アミノ酵素の第1分割体のN - 末端にジンクフィンガータンパク質 (ZF - Left) のC - 末端が結合し、シトシン脱アミノ酵素の第2分割体のC - 末端にジンクフィンガータンパク質 (ZF - Right) のN - 末端が結合 (CN configuration) するか；又は、シトシン脱アミノ酵素の第1分割体のC - 末端にジンクフィンガータンパク質 (ZF - Left) のN - 末端が結合し、シトシン脱アミノ酵素の第2分割体のC - 末端にジンクフィンガータンパク質 (ZF - Right) のN - 末端が結合 (NN configuration) した構造においても、ジンクフィンガータンパク質 (ZF - Left) のC - 末端、シトシン脱アミノ酵素の第1分割体のN - 末端又はC - 末端、ジンクフィンガータンパク質 (Z

40

50

F - R i g h t) の N - 末端、シトシン脱アミノ酵素の第 2 分割体の N - 末端又は C - 末端に結合することができる。

【 0 0 9 5 】

前記シトシン脱アミノ酵素が分割形態で含まれ、前記 DNA 結合タンパク質が T A L E である場合、前記シトシン脱アミノ酵素の第 1 分割体に第 1 T A L E が結合し、前記シトシン脱アミノ酵素の第 2 分割体に第 2 T A L E が結合することができ、それぞれ N' - T A L E - 第 1 分割体 D D D A - C' 及び N' - T A L E - 第 2 分割体 D D D A - C' 構造を有する。アデニン脱アミノ酵素は、シトシン脱アミノ酵素の第 1 分割体の N - 末端又は C - 末端、又はシトシン脱アミノ酵素の第 2 分割体の N - 末端又は C - 末端に結合することができる。

10

【 0 0 9 6 】

本発明は、1) DNA 結合タンパク質、2) 分割された二本鎖 DNA 特異的バクテリアシトシン脱アミノ酵素、及び 3) E . c o l i T a d A から由来したデオキシアデニン脱アミノ酵素を含む植物細胞小器官 DNA の A - t o - G 塩基校正用組成物 (U G I なし) であって、前記 DNA 結合タンパク質は、ジンクフィンガータンパク質 (Z F P) 又は転写活性化因子様エフェクター (T A L E) アレイで；分割された二本鎖 DNA 特異的バクテリアシトシン脱アミノ酵素であるパークホルデリア・セノセパシア (B u r k h o l d e r i a c e n o c e p a c i a) から由来した D d d A t o x である組成物である。

【 0 0 9 7 】

20

前記シトシン脱アミノ酵素が分割形態で含まれ、前記 DNA 結合タンパク質がジンクフィンガータンパク質で、シトシン脱アミノ酵素の第 1 分割体の C - 末端にジンクフィンガータンパク質 (Z F - L e f t) の N - 末端が結合し、シトシン脱アミノ酵素の第 2 分割体の N - 末端にジンクフィンガータンパク質 (Z F - R i g h t) の C - 末端が結合 (N C c o n f i g u r a t i o n) した構造において、アデニン脱アミノ酵素は、ジンクフィンガータンパク質 (Z F - L e f t) の C - 末端、シトシン脱アミノ酵素の第 1 分割体の N - 末端又は C - 末端、ジンクフィンガータンパク質 (Z F - R i g h t) の N - 末端、シトシン脱アミノ酵素の第 2 分割体の N - 末端又は C - 末端に結合することができる。

【 0 0 9 8 】

30

アデニン脱アミノ酵素は、シトシン脱アミノ酵素の第 1 分割体の N - 末端にジンクフィンガータンパク質 (Z F - L e f t) の C - 末端が結合し、シトシン脱アミノ酵素の第 2 分割体の N - 末端にジンクフィンガータンパク質 (Z F - R i g h t) の C - 末端が結合 (C C c o n f i g u r a t i o n) するか；シトシン脱アミノ酵素の第 1 分割体の N - 末端にジンクフィンガータンパク質 (Z F - L e f t) の C - 末端が結合し、シトシン脱アミノ酵素の第 2 分割体の C - 末端にジンクフィンガータンパク質 (Z F - R i g h t) の N - 末端が結合 (C N c o n f i g u r a t i o n) するか；又は、シトシン脱アミノ酵素の第 1 分割体の C - 末端にジンクフィンガータンパク質 (Z F - L e f t) の N - 末端が結合し、シトシン脱アミノ酵素の第 2 分割体の C - 末端にジンクフィンガータンパク質 (Z F - R i g h t) の N - 末端が結合 (N N c o n f i g u r a t i o n) した構造においても、ジンクフィンガータンパク質 (Z F - L e f t) の C - 末端、シトシン脱アミノ酵素の第 1 分割体の N - 末端又は C - 末端、ジンクフィンガータンパク質 (Z F - R i g h t) の N - 末端、シトシン脱アミノ酵素の第 2 分割体の N - 末端又は C - 末端に結合することができる。

40

【 0 0 9 9 】

前記シトシン脱アミノ酵素が分割形態で含まれ、前記 DNA 結合タンパク質が T A L E である場合、前記シトシン脱アミノ酵素の第 1 分割体に第 1 T A L E が結合し、前記シトシン脱アミノ酵素の第 2 分割体に第 2 T A L E が結合することができ、それぞれ N' - T A L E - 第 1 分割体 D D D A - C' 及び N' - T A L E - 第 2 分割体 D D D A - C' 構造を有する。アデニン脱アミノ酵素は、シトシン脱アミノ酵素の第 1 分割体の N - 末端又は C

50

- 末端、又はシトシン脱アミノ酵素の第 2 分割体の N - 末端又は C - 末端に結合することができる。

【 0 1 0 0 】

本発明は、植物細胞小器官 A - t o - G 塩基校正用組成物であって、前記 DNA 結合タンパク質は、ジンクフィンガータンパク質又は T A L E アレイで、前記シトシン脱アミノ酵素から由来した第 1 分割体及び第 2 分割体は、バクテリアから由来し、二本鎖 DNA 特異的であることを特徴とする組成物に関する。

【 0 1 0 1 】

本発明は、植物細胞小器官 A - t o - G 塩基校正用組成物であって、前記 DNA 結合タンパク質は、ジンクフィンガータンパク質又は T A L E アレイで、前記シトシン脱アミノ酵素から由来した第 1 分割体及び第 2 分割体は、バクテリアから由来し、二本鎖 DNA 特異的であり、前記第 1 分割体の N - 末端に DNA 結合タンパク質が結合しており、アデニン脱アミノ酵素の C - 末端に DNA 結合タンパク質が結合している、組成物に関する。

【 0 1 0 2 】

本発明は、1) DNA 結合タンパク質、2) 分割された二本鎖 DNA 特異的バクテリアシトシン脱アミノ酵素、及び 3) E . c o l i T a d A から由来したデオキシアデニン脱アミノ酵素を含む植物細胞小器官 A - t o - G 塩基校正用組成物であって、U G I を含まなく、前記 DNA 結合タンパク質は、ジンクフィンガータンパク質 (Z F P) 又は転写活性化因子様エフェクター (T A L E) アレイで；分割された二本鎖 DNA 特異的バクテリアシトシン脱アミノ酵素であるバークホルデリア・セノセパシア (B u r k h o l d e r i a c e n o c e p a c i a) から由来した D d d A t o x である組成物である。

【 0 1 0 3 】

本発明は、植物細胞小器官 A - t o - G 塩基校正方法であって、DNA 結合タンパク質又はこれをコードする核酸；シトシン脱アミノ酵素から由来した第 1 分割体及び第 2 分割体又はこれをコードする核酸；及びアデニン脱アミノ酵素又はこれをコードする核酸を植物細胞に処理する段階を含み、前記 DNA 結合タンパク質は、ジンクフィンガータンパク質又は T A L E アレイで、前記シトシン脱アミノ酵素から由来した第 1 分割体及び第 2 分割体は、バクテリアから由来し、二本鎖 DNA 特異的であることを特徴とする方法に関する。

【 0 1 0 4 】

本発明は、植物細胞小器官 A - t o - G 塩基校正方法であって、DNA 結合タンパク質又はこれをコードする核酸；シトシン脱アミノ酵素から由来した第 1 分割体及び第 2 分割体又はこれをコードする核酸；及びアデニン脱アミノ酵素又はこれをコードする核酸を植物細胞に処理する段階を含み、前記 DNA 結合タンパク質は、ジンクフィンガータンパク質又は T A L E アレイで、前記シトシン脱アミノ酵素から由来した第 1 分割体及び第 2 分割体は、バクテリアから由来し、二本鎖 DNA 特異的であり、前記第 1 分割体の N - 末端に DNA 結合タンパク質が結合しており、アデニン脱アミノ酵素の C - 末端に DNA 結合タンパク質が結合している、方法に関する。

【 0 1 0 5 】

本発明は、植物細胞小器官 A - t o - G 塩基校正方法であって、DNA 結合タンパク質又はこれをコードする核酸；シトシン脱アミノ酵素から由来した第 1 分割体及び第 2 分割体又はこれをコードする核酸；及びアデニン脱アミノ酵素又はこれをコードする核酸を植物細胞に処理する段階を含み、1) DNA 結合タンパク質、2) 分割された二本鎖 DNA 特異的バクテリアシトシン脱アミノ酵素、及び 3) E . c o l i T a d A から由来したデオキシアデニン脱アミノ酵素を含む植物細胞小器官 A - t o - G 塩基校正用組成物であって、U G I を含まなく、前記 DNA 結合タンパク質は、ジンクフィンガータンパク質 (Z F P) 又は転写活性化因子様エフェクター (T A L E) アレイで；分割された二本鎖 DNA 特異的バクテリアシトシン脱アミノ酵素である B u r k h o l d e r i a c e n o c e p a c i a から由来した D d d A t o x である方法である。

【 0 1 0 6 】

本発明は、葉緑体伝達ペプチド (chloroplast transit peptide) 又はミトコンドリア伝達タンパク質 (Mitochondrial Targeting Signal、MTS) をさらに含むことができる。

【0107】

例えば、葉緑体伝達タンパク質 (Chloroplast Transit Peptide、CTP) 又はミトコンドリア伝達信号タンパク質 (Mitochondrial Targeting Signal、MTS) は、結合によって植物細胞内葉緑体とミトコンドリアに伝達される。葉緑体とミトコンドリアに伝達されるとき、N-末端のCTP又はMTSタンパク質を除いた残りの部分は、前タンパク質 (preprotein) 形態で葉緑体とミトコンドリアの内部に伝達される。葉緑体とミトコンドリアの内部への進入過程で伝達タンパク質部分が分離され、葉緑体とミトコンドリアのターゲティングによって特定の部分を塩基校正することができる。

【0108】

前記核酸と関連して、「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、及び「オリゴヌクレオチド」は、相互交換的に使用される。任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド、又はこれらの類似体を含むことができる。ポリヌクレオチドは、任意の3次元構造を有することができ、公知又は非公知の任意の機能を行うことができる。ポリヌクレオチドは、一つ以上の変形したヌクレオチド、例えば、メチル化されたヌクレオチド及びヌクレオチド類似体を含むことができる。ヌクレオチド構造に対する変形は、ポリマーのアセンブリ前後に行うことができる。

【0109】

前記ポリヌクレオチドは、RNA配列、DNA配列、又はその組み合わせ (RNA-DNA組み合わせ配列) であり得る。

【0110】

前記融合タンパク質を発現させるための手段として、プラスミドベクター、コスミドベクター、バクテリオファージベクターなどの公知の発現ベクターを使用することができ、ベクターは、DNA組換え技術を用いた任意の公知の方法によって当業者が容易に製造することができる。

【0111】

前記ベクターは、プラスミドベクター又はウイルスベクターであり得、前記ウイルスベクターは、具体的には、アデノウイルス (Adenovirus)、アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus)、レンチウイルス (Lentivirus)、及びレトロウイルス (Retrovirus) ベクターであり得るが、これに限定されたものではない。

【0112】

組換え発現ベクターは、宿主細胞で核酸の発現に適した形態で核酸を含むことができ、これは、組換え発現ベクターが発現のために使用されるように、すなわち、発現される核酸配列に作動可能に連結されるように宿主細胞をベースにして選ばれ得る一つ以上の調節要素を含むことを意味する。

【0113】

組換え発現ベクター内で「作動可能に連結された」とは、関心ヌクレオチド配列がヌクレオチド配列の発現を許容する方式で (例えば、試験管内転写 / 翻訳システムで、又はベクターが宿主細胞内に導入される場合は宿主細胞で) 調節要素に連結されることを意味する。

【0114】

組換え発現ベクターは、T7プロモーターを含み、メッセンジャーRNA合成に適した形態を含むことができ、これは、機内でmRNA合成を行えるように、すなわち、T7ポリメラーゼ (polymerase) によってメッセンジャーRNAが合成され得る一つ以上の調節要素を含むことを意味する。

10

20

30

40

50

【0115】

「調節要素」は、プロモーター、エンハンサー、内部リボソーム進入部位（IRES）、及びその他の発現調整要素（例えば、転写終決信号、例えば、ポリアデニル化信号及びポリ-U配列）を含むことができる。調節要素は、多くの種類の宿主細胞でヌクレオチド配列を誘導するか、又は常に発現を指示する要素及び特定の宿主細胞でのみヌクレオチド配列の発現を指示する要素（例えば、組織特異的調節配列）を含む。組織特異的プロモーターは、所望の関心組織、例えば、筋肉、ニューロン、骨、皮膚、血液、特定の器官（例えば、肝臓、脾臓）、又は特定の細胞類型（例えば、リンパ球）で主に発現を指示することができる。また、調節要素は、組織又は細胞類型特異的であるか、又は組織又は細胞類型特異的でない細胞周期依存性又は発達段階依存的方式などの一時的・依存的方式で発現を指示することができる。 10

【0116】

場合に依じて、ベクターは、一つ以上のpol I I Iプロモーター、一つ以上のpol I I Iプロモーター、一つ以上のpol I Iプロモーター、又はこれらの組み合わせを含む。pol I I I Iプロモーターの例は、非制限的にU6及びH1プロモーターを含む。pol I I I Iプロモーターの例は、非制限的に、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター（任意にRSVエンハンサーを有する）、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター（選択的にCMVエンハンサーを有する）（例えば、Bosch et al (1985) Cell 41: 521-530）、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸還元酵素プロモーター、 β -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）プロモーター及びEF1 α プロモーターを含む。 20

【0117】

「調節要素」には、エンハンサー、例えば、WPRE；CMVエンハンサー；HTLV-IのLTRでのR-U5'セグメント；SV40エンハンサー；及びウサギ β -グロビンのエキソン2と3との間のイントロン配列などが含まれ得る。発現ベクターのデザインは、形質転換される宿主細胞の選択、所望の発現レベルなどの因子に左右され得ることが当業者によって認識され得る。ベクターは、宿主細胞内に導入され、本願に記載された核酸によってエンコードされる融合タンパク質又はペプチドを含む転写物、タンパク質又はペプチドを生成することができる（例えば、クラスタリングされた規則的間隔の短い回文反復部（CRISPR）転写物、タンパク質、酵素、その突然変異体、その融合タンパク質など）。有益なベクターは、レンチウイルス及びアデノ随伴ウイルスを含み、また、このようなベクターの類型は、特定の種類の細胞を標的化するために選択され得る。 30

【0118】

前記ベクターは、それぞれ局所注入法（例えば、病変又は標的部位直接注入）、電気穿孔法（electroporation）、リポフェクション、ウイルスベクター、ナノ粒子（nanoparticles）のみならず、PTD（Protein translocation domain）融合タンパク質方法などを通じて生体内又は細胞内に伝達され得る。

【0119】

前記核酸は、リボ核酸、例えば、メッセンジャーリボ核酸mRNA形態で注入し、細胞の遺伝子塩基校正、例えば、動物細胞又は植物細胞に制限なく遺伝子塩基校正を行うことができる。 40

【0120】

本発明に係る核酸は、mRNA形態であり得、mRNA形態で伝達する場合、DNAを用いたベクター形態で伝達する場合に比べて、mRNAへの転写過程が不必要であり、遺伝子校正の開始が速くなり得る。一時的タンパク質発現（transient protein expression）の可能性が高い。

【0121】

本出願の発明者等は、植物細胞小器官遺伝子校正のために、シトシン塩基校正器（cytosine base editor）をリボ核酸、例えば、メッセンジャーリボ核酸 50

形態で植物細胞に注入したとき、プラスミドに伝達する場合に比べて非標的効果が減少することを確認した。植物細胞小器官遺伝子校正において、シトシン塩基校正器をmRNA形態で植物細胞に形質転換したとき、プラスミドに比べて非標的効果の面で長所を有することを最初に立証した。

【0122】

前記mRNAは、直接伝達されるか、キャリアを介して伝達され得る。場合に応じて、核酸切断酵素及び/又は切断因子のmRNAは、化学変形(chemical modification)するか、合成自己複製RNA(synthetic self-replicative RNA)形態で直接伝達することができる。

【0123】

細胞にmRNAを伝達する方法、又は生体内でmRNAをヒト、動物などの有機体の細胞に伝達する方法を含み、試験管内又は生体内でmRNA分子を細胞に伝達できる方法を考慮することができる。例えば、脂質(例えば、リポソーム、マイセルなど)を含むか、ナノ粒子又はナノチューブを含むか、陽イオン性化合物(例えば、ポリエチレンジアミン又はPEI)を含むか、陽イオン性化合物(例えば、ポリエチレンジアミン又はPEI)を含み、mRNA分子を細胞に伝達することができる。場合に応じて、mRNAを細胞に伝達するために、遺伝子銃又はバイオリステック(biolytic)粒子伝達システムなどのバイオリステック方法(biolytic method)を使用することができる。

【0124】

前記キャリアは、例えば、細胞透過性ペプチド(CPP)、ナノ粒子、又は重合体を含み得るが、これに制限されるものではない。

【0125】

前記CPPは、多様な分子カーゴ(ナノサイズの粒子から小さい化学分子及びDNAの大きい断片まで)の細胞吸収を容易にする短いペプチドである。

【0126】

前記ナノ粒子と関連して、本発明に係る組成物は、高分子ナノ粒子、金属ナノ粒子、金属/無機ナノ粒子又は脂質ナノ粒子を介して伝達され得る。前記高分子ナノ粒子は、例えば、ローリングサークル増幅によって合成されたDNAナノクリュー(nanoclew)、糸状DNAナノ粒子であり得る。DNAナノクリュー及び糸状DNAナノ粒子にmRNAをローディングし、エンドソーム脱出能を向上させるためにPEIをコーティングすることができる。このような複合体は、細胞膜に結合して内在化された後、エンドソーム脱出を通じて核に移動しながら伝達され得る。

【0127】

前記金属ナノ粒子と関連して、金粒子を連結させ、陽イオン性エンドソーム脱出ポリマー(endosomal disruptive polymer)と複合体を形成しながら細胞に伝達することができる。前記陽イオン性エンドソーム脱出ポリマーは、例えば、ポリエチレンジアミン、ポリ(アルギニン)、ポリ(リシン)、ポリ(ヒスチジン)、ポリ-[2-{(2-アミノエチル)アミノ}-エチル-アスパルトアミド](pAsp(DET))、ポリ(エチレングリコール)(PEG)とポリ(アルギニン)のブロックコポリマー、PEGとポリ(リシン)のブロックコポリマー、又はPEGとポリ{N-[N-(2-アミノエチル)-2-アミノエチル]アスパルトアミド}(PEG-pAsp(DET))のブロックコポリマーであり得る。

【0128】

前記金属/無機ナノ粒子と関連して、例えば、ZIF-8(zeolitic imidazolate framework-8)を通じてmRNAをカプセル化することができる。

【0129】

場合に応じて、前記mRNAは、陰イオンを帯び(negatively charged)、陽イオンを帯びる(cationic)各物質と結合しながらナノ粒子を形成す

10

20

30

40

50

ることができ、これは、細胞に受容体媒介エンドサイトーシス (receptor-mediated endocytosis) 或いはファゴサイトーシス (phagocytosis) などを介して浸透し得る。

【0130】

陽イオン性重合体として、ポリアリルアミン (PAH) ; ポリエチレンイミン (PEI) ; ポリ (L-リシン) (PLL) ; ポリ (L-アルギニン) (PLA) ; ポリビニルアミン単一又は共重合体 ; ポリ (ビニルベンジル-トリ-C1-C4-アルキルアンモニウム塩) ; 脂肪族又は芳香脂肪族ジハロゲン化物及び脂肪族N, N, N', N'-テトラ-C1-C4-アルキル-アルキレンジアミンの重合体 ; ポリ (ビニルピリジン) 又はポリ (ビニルピリジニウム塩) ; ポリ (N, N-ジアリル-N, N-ジ-C1-C4-アルキル-アンモニウムハロゲン化物) ; 四級化ジ-C1-C4-アルキル-アミノエチルアクリレート又はメタクリレートの単一又は共重合体 ; POLYQUADTM ; ポリアミノアミドなどが含まれ得る。

【0131】

陽イオン性脂質として、陽イオン性リボソーム製剤を含むことができる。リボソームの脂質二重層は、カプセル化された核酸を分解から保護し、核酸に結合できる抗体による特異的中和を防止することができる。エンドソームの成熟の間にエンドソームメンブレンとリボソームとが融合され、陽イオン性脂質-核酸切断酵素の効率的なエンドソーム脱出が可能である。陽イオン性脂質として、ポリエチレンイミン、ポリアミドアミン (PAMAM) デンドリマー、リボフェクチン (DOTMAとDOPEとの組み合わせ)、リボフェクターゼ、リボフェクタミン (LIPOFECTAMINE) (登録商標) (例えば、リボフェクタミン (登録商標) 2000、リボフェクタミン (登録商標) 3000、リボフェクタミン (登録商標) RNAiMAX、リボフェクタミン (登録商標) LTX)、SAINT-RED (Synvolux Therapeutics社、オランダのグローニンゲン所在)、DOPE、シトペクチン (Gilead Sciences社、カリフォルニアのフォスターシティ所在)、及びユベクチン (JBL社、カリフォルニアのサンルイスオビスポ所在) が含まれ得る。代表的な陽イオン性リボソームは、N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)-プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N-[1-(2, 3-ジオレイルオキシ)-プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウムメチルスルフェート (DOTAP)、3β-[N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール (DC-Chol)、2, 3-ジオレイルオキシ-N-[2(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N, N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロ酢酸 (DOSPA)、1, 2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド ; 又はジメチルジオキタデシルアンモニウムブロミド (DDAB) から製造され得る。

【0132】

脂質ナノ粒子と関連して、キャリアとしてリボソームを用いて伝達することができる。リボソームは、内部水性区画を取り囲む単一又は多重ラメラ脂質二重層、及び相対的に不透過性である外側親脂性リン脂質二重層で構成された球体小囊構造である。リボソーム剤形は、主に、天然リン脂質及び脂質、例えば、1, 2-ジステアロイル-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、ホスファチジルコリン又はモノシアロガングリオシドなどを含むことができる。場合に応じて、血漿内の不安定性を解消するために、脂質膜にコレステロール又は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) を追加することができる。コレステロールの添加は、カプセル化された生活性化合物の血漿内への迅速な放出を減少させるか、又は、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。

【0133】

前記組成物は、次を通じて植物細胞に伝達され得る :

【0134】

10

20

30

40

50

遺伝子銃 (Gene gun) を用いた注入 (Bombardment) ;

【0135】

PEG - 媒介原形質体トランスフェクション (Protoplast transfection、PEG-mediated) ;

【0136】

電気穿孔による原形質体トランスフェクション (Protoplast transfection、electroporation) ; 又は

【0137】

微細注射による原形質体注射 (Protoplast injection、microinjection) 。

10

【0138】

本発明に係る融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、RNA配列、DNA配列、又はその組み合わせ (RNA-DNA組み合わせ配列) であり得る。

【0139】

前記核酸は、次を通じて植物細胞に伝達され得る :

【0140】

アグロバクテリウム (Agrobacterium)、例えば、Agrobacterium tumefaciens、Agrobacterium rhizogeneなどを用いた形質転換

【0141】

- バイナリーベクター (binary vector)、

20

【0142】

- ウイルスベクター (Viral vector) : ジェミニウイルス (Gemini virus)、TRV (tobacco rattle virus)、ToMV (tomato mosaic virus)、FoMV (foxtail mosaic virus)、BYSMV (barley yellow striate mosaic virus)、SYNV (Sonchus yellow net rhabdovirus) など ;

【0143】

ウイルスを用いたトランスフェクション ;

30

【0144】

注入 (Bombardment、Gene gun) ;

【0145】

PEG - 媒介原形質体トランスフェクション (Protoplast transfection、PEG-mediated) ;

【0146】

電気穿孔による原形質体トランスフェクション (Protoplast transfection、electroporation) ; 又は

【0147】

微細注射による原形質体注射 (Protoplast injection、microinjection) 。

40

【0148】

前記ウイルスとしては、例えば、ウイルスベクター : ジェミニウイルス、TRV (tobacco rattle virus)、ToMV (tomato mosaic virus)、FoMV (foxtail mosaic virus)、BYSMV (barley yellow striate mosaic virus)、SYNV (Sonchus yellow net rhabdovirus) などを挙げることができる。

【0149】

前記ベクターは、それぞれ局所注入法 (例えば、病変又は標的部位直接注入)、電気穿

50

孔法、リポフェクション、ウイルスベクター、ナノ粒子のみならず、P T D (P r o t e i n t r a n s l o c a t i o n d o m a i n) 融合タンパク質方法などを通じて細胞内に伝達され得る。

【0150】

本発明は、前記組成物を植物細胞に処理する段階を含む植物細胞小器官DNAのアデニンをグアニンに校正する方法に関する。

【0151】

本発明は、前記方法によってG T T G A A A G C 配列を含む葉緑体 p s b A 遺伝子のアデニン塩基がグアニンに校正された、アトラジン除草剤抵抗性植物に関する。

【0152】

本発明は、前記方法によってC G T C A T C C T C A 配列を含む16s rRNAのアデニン塩基がグアニンに校正された、スペクチノマイシン抵抗性植物に関する。

【0153】

本発明は、前記方法によってA T G を含む p s a A 遺伝子のアデニン塩基がグアニンに校正された、アルビノ表現型を有する植物に関する。

【0154】

葉緑体DNAのうちp s b A の295番目のアミノ酸であるフェニルアラニン (P h e n y l a l a n i n e) をセリン (S e r i n e) に塩基校正することによって、除草剤のうち一つであるアトラジンに抵抗性を有する植物を開発することができる。葉緑体の p s b A のみならず、16s rRNA、p s a A のアデニン塩基校正を通じてスペクチノマイシン抵抗性植物及びアルビノ形態の植物を開発することができる。

【0155】

本発明は、前記方法によって葉緑体ルビスコ (r u b i s c o : r i b u l o s e b i s p h o s p h a t e c a r b o x y l a s e) コーディング遺伝子のアデニン塩基がグアニンに校正された植物に関する。光合成に参与するルビスコのラージユニット (r u b i s c o L a r g e u n i t) の塩基校正が可能になり、光合成効率を調節し、植物の生産量増大を期待することができる。

【0156】

葉緑体の塩基配列は、植物間の相同関係 (h o m o l o g y) が高いので、本発明に使用したレタス (L a c t u c a s a t i v a c v . C h e o n g c h i m a) のみならず、イネ、コムギ、ジャガイモ、トマトなどの植物も、アトラジンに抵抗性を有する植物を開発することができる。

【0157】

【0158】

【実施例】

【0159】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明する。これらの実施例は、本発明を例示するためのものに過ぎなく、本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されると解釈されないことは、当業界で通常の知識を有する者にとって自明であろう。

【0160】

実施例1.

【0161】

S c i e n t i f i c R e p o r t s 8 : 5 1 7 9 (2 0 1 8) に発表された論文によると、E . c o l i の16s rRNAの1183番目及び1189番目のウラシル (U r a c i l) をそれぞれ又は同時にシトシン (c y t o s i n e) に置換することによって、E . c o l i がスペクチノマイシンに抵抗性を有することを報告した。植物の葉緑体に存在する16s rRNAの1183、1189のアデニンをグアニンに置換すると、スペクチノマイシンに抵抗性を有する植物の開発が可能である。

【0162】

実施例で使用されたアデニン塩基校正器の各構成に対する配列は、次の通りである。図

10

20

30

40

50

1 は、D d d A t o x とアデニン脱アミノ酵素を T A L E に結合した模式図である。

【 0 1 6 3 】

```

C T S
M D S Q L V L S L K L N P S F T P L S P L F P F T P C S S F S P S L R F S S C
Y S R R L Y S P V T V Y A A K
N T D
D L R T L G Y S Q Q Q Q E K I K P K V R S T V A Q H H E A L V G H G F T H A H
I V A L S Q H P A A L G T V A V K Y Q D M I A A L P E A T H E A I V G V G K Q W
S G A R A L E A L L T V A G E L R G P P L Q L D T G Q L L K I A K R G G V T A V
E A V H A W R N A L T G A P L N
C T D
L T P E Q V V A I A S N G G G K Q A L E S I V A Q L S R P D P A L A A L T N D
H L V A L A C L G G R P A L D A V K K G L G
A D
S E V E F S H E Y W M R H A L T L A K R A R D E R E V P V G A V L V L N N R V
I G E G W N R A I G L H D P T A H A E I M A L R Q G G L V M Q N Y R L I D A T L
Y V T F E P C V M C A G A M I H S R I G R V V F G V R N S K R G A A G S L M N V
L N Y P G M N H R V E I T E G I L A D E C A A L L C D F Y R M P R Q V F N A Q K
K A Q S S I N
L i n k e r   1 ( T A L E   a r r a y - L i n k e r   1 - D d d A t o x )
G S
L i n k e r   2 ( D d d A t o x - L i n k e r   2 - A D )
S G S E T P G T S E S A T P E S
D d d A t o x   G 1 3 4 7 N
G S G S Y A L G P Y Q I S A P Q L P A Y N G Q T V G T F Y Y V N D A G G L E S
K V F S S G G P T P Y P N Y A N A G H V E G Q S A L F M R D N G I S E G L V F H
N N P E G T C G F C V N M T E T L L P E N A K M T V V P P E G
D d d A t o x   G 1 3 9 7 C
G S A I P V K R G A T G E T K V F T G N S N S P K S P T K G G C
p s b A   L e f t   T A L E   r e p e a t
L T P A Q V V A I A S N G G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P A Q
V V A I A S N N G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P A Q V V A I A S
N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A S N I G G K Q
A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P D Q V V A I A S N I G G K Q A L E T V Q
R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A S N G G G K Q A L E T V Q R L L P V L
C Q A H G L T P A Q V V A I A S N G G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L
T P A Q V V A I A S N N G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P A Q V V
A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P D Q V V A I A S N I
G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P D Q V V A I A S N I G G K Q A L
E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P A Q V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L
L P V L C Q A H G L T P A Q V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q
D H G L T P D Q V V A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P
A Q V V A I A S N G G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P E Q V V A I
A S N G G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P D Q V V A I A S N G G G
K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G

```

【 0 1 6 4 】

```

p s b A   R i g h t   T A L E   r e p e a t
L T P D Q V V A I A S N N G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P A Q
V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q D H G L T P D Q V V A I A S
N G G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G L T P E Q V V A I A S N G G G K Q

```

10

20

30

40

50

LTPAQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPAQ
VVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIAS 50

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

p s a A R i g h t T A L E r e p e a t

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

【 0 1 6 6 】

レタスプロトプラストに試験管合成した mRNA をそれぞれ 30 μ g 伝達し、7 日後に
 アデニン塩基校正効率を確認した結果を図 2 a ~ 図 2 c に示した。図 2 a は、青色となっ
 ている DNA シーケンスに左側及び右側の T A L E アレイが結合することを示す。赤色で
 表示された A 5 及び A 1 1 は、16 s RNA の標的アデニン (T a r g e t A d e n i
 n e) である。図 2 b によると、A 5 の塩基校正比率は 17 . 27 % 及び 6 . 91 % で、
 A 1 1 の塩基校正比率は 18 . 17 % 及び 7 . 7 % である。図 2 c において、W T に標的
 化するアデニンが青色で表示されており、標的が変わる A l l e l e としては、A l l e
 l e - 3、A l l e l e - 4、A l l e l e - 9 がある。

【 0 1 6 7 】

mRNA を伝達し、培養を通じてカルスを確保した後、アデニン塩基校正効率を確認し
 た。図 3 a によると、A 5 の塩基校正比率は 9 . 7 % 及び 2 . 9 % で、A 1 1 の塩基校正
 比率は 9 . 15 % 及び 3 . 06 % である。図 3 b によると、W T に標的化するアデニンが
 青色で表示されており、標的が変わる A l l e l e としては、A l l e l e - 1、A l l
 e l e - 4、A l l e l e - 6 がある。

【 0 1 6 8 】

【 0 1 6 9 】

実施例 2 .

【 0 1 7 0 】

10

20

30

40

50

葉緑体にある *p s a A* の突然変異は、アルビノ表現型を有する植物になる。本発明では、*p s a A* の開始コドン (*s t a r t c o d o n*) が *A T G* を破壊することによって、アルビノ表現型を有する植物の開発が可能である。

【0171】

レタスプロトプラストに試験管合成した *m R N A* をそれぞれ $30 \mu g$ 伝達し、7日後にアデニン塩基校正効率を確認した結果を図4に示した。図4aによると、青色となっている *D N A* シーケンスに左側及び右側の *T A L E* アレイが結合することを示す。*A 5* 及び *A 6* が開始コドンの標的アデニンである。図4bによると、*A 5* の塩基校正比率は 10.67% 及び 7.68% で、*A 6* の塩基校正比率は 14.66% 及び 12.27% である。図4cによると、*W T* に標的化するアデニンが青色で表示されており、標的が変わる *A l l e l e* としては、*A l l e l e - 3*、*A l l e l e - 5*、*A l l e l e - 6*、*A l l e l e - 9* がある。

10

【0172】

m R N A を伝達し、培養を通じてカルスを確保した後、アデニン塩基校正効率を確認した。図5aによると、*A 5* の塩基校正比率は 8.4% 及び 7.5% で、*A 6* の塩基校正比率は 12.2% 及び 10.0% である。図5bによると、*W T* に標的化するアデニンが青色で表示されており、標的が変わる *A l l e l e* としては、*A l l e l e - 4*、*A l l e l e - 8* がある。

【0173】

【0174】

20

実施例3.

【0175】

植物の葉緑体 *D N A* は、高い相同性を有している。図6に示したものは、多くの植物の *p s b A* *D N A* シーケンスであって、赤色 *a* が標的位置である。*m R N A* 伝達、*R N P*、アグロバクテリウムを用いた方法により、商業的に高い価値を有しているトウモロコシ (*M a i z e*)、トマト (*t o m a t o*)、ジャガイモ (*p o t a t o*)、コメ (*r i c e*)、コムギ (*w h e a t*) などの葉緑体 *D N A* 塩基校正を通じて除草剤抵抗性植物を開発することができる。*Z e a m a y s - N C _ 0 0 1 6 6 . 2*、*O r y z a s a t i v a J a p o n i c a - N C _ 0 0 1 3 2 0 . 1*、*C u c u m i s s a t i v u s - N C _ 0 0 7 1 4 4*、*T r i t i c u m a e s t i v u m - N C _ 0 0 2 7 6 2 . 1*、*S o l a n u m t u b e r o s u m - N C _ 0 0 8 0 9 6*、*S o o l a n u m l y c o p e r s i c u m - N C _ 0 0 7 8 9 8*、*A r a b i d o p s i s T h a l i a n a - A P 0 0 0 4 2 3*、*L e t t u c e s a t i v a - A P 0 0 7 2 3 2 . 1* のシーケンスを用いた。

30

【0176】

【産業上の利用可能性】

【0177】

植物細胞小器官 *D N A* の塩基校正としては、*D d d A t o x* を用いたシトシンをチミン (*t h y m i n e*) に脱アミノ化 (*d e a m i n a t i o n*) する塩基校正のみが存在していたが、本発明でアデニンをグアニンに塩基校正することによって、小器官 *D N A* 塩基校正の範囲が広がった。

40

【0178】

現在まで、除草剤抵抗性植物の開発は、核にある *D N A* の塩基校正を通じて開発されたが、葉緑体の *p s b A* の塩基校正で新しい除草剤抵抗性植物の開発が可能になった。

【0179】

葉緑体の *p s b A* のみならず、他の葉緑体遺伝子の校正を通じて新しい形質の植物開発が可能である。

【0180】

光合成に關与するルビスコのラージユニットの塩基校正が可能になり、光合成効率を調節し、植物の生産量増大を期待することができる。

50

【 0 1 8 1 】

CTSの代わりにMTS (Mitochondrial Target Signal) を使用すると、植物ミトコンドリアDNAのアデニンが校正可能である。

【 0 1 8 2 】

【 0 1 8 3 】

【 0 1 8 4 】

以上では、本発明の内容における特定の部分を詳細に記述したが、当業界で通常の知識を有する者にとって、このような具体的な記述は好適な実施形態に過ぎなく、これによって本発明の範囲が制限されないことは明白であろう。よって、本発明の実質的な範囲は、添付の特許請求の範囲とそれらの等価物によって定義されると言えるだろう。

10

【 0 1 8 5 】

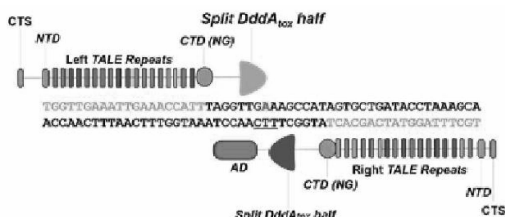
【 配列表フリーテキスト 】

【 0 1 8 6 】

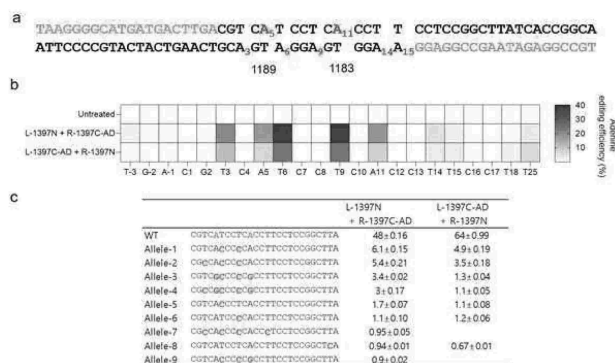
電子ファイルを添付した。

【 図面 】

【 図 1 】

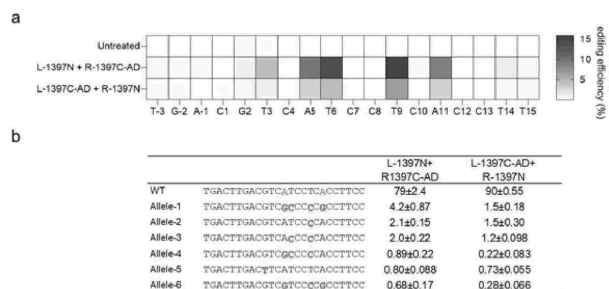


【 図 2 】

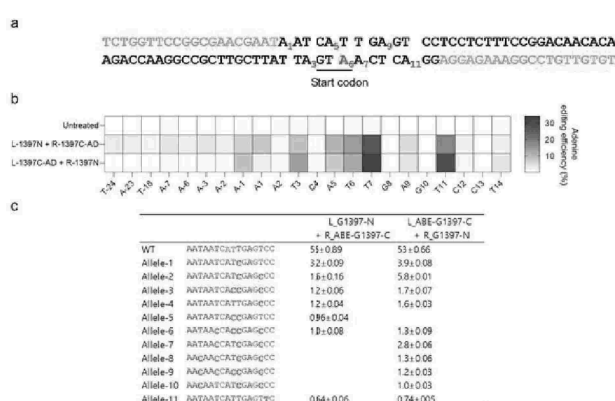


20

【 図 3 】



【 図 4 】

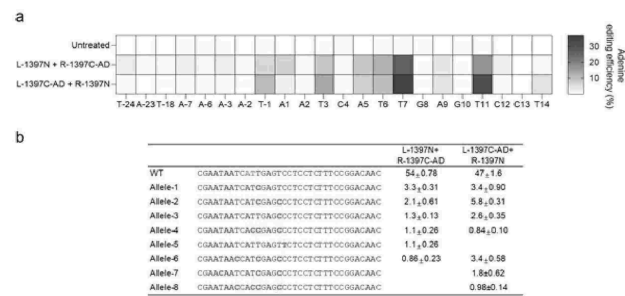


30

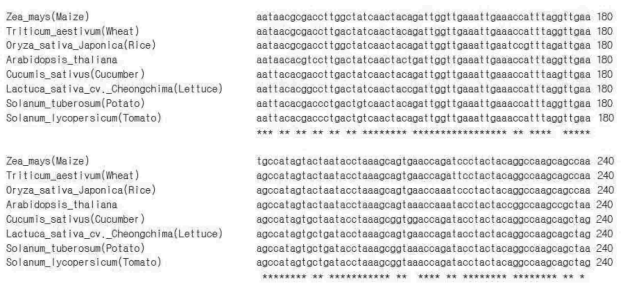
40

50

【 図 5 】



【 図 6 】



【 配 列 表 】

202551023900001.xml

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2023/003940
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/82(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/82(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 9/78(2006.01); C12Q 1/6895(2018.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: DNA 결합 단백질(DNA binding protein), 시토신 탈아미노효소(cytosine deaminase), 분할체(split), 아데닌 탈아미노효소(adenine deaminase), 식물세포(plant cell), 엽록체(chloroplast), 염기 교정(base editing), 핵산(nucleic acid)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022-060185 A1 (INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE) 24 March 2022 (2022-03-24) See claims 1, 3-6, 14-21, 28-29, 31-33, 37 and 49; paragraphs [0021], [0102]-[0103], [0148], [0560], [0848]-[0850], [0902] and [1049]-[1053]; and figures 43-44 and 68.	1-17,19
Y		18,20
Y	KR 10-2020-0008137 A (INSTITUTE OF GENETICS AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES et al.) 23 January 2020 (2020-01-23) See claims 1-2; and paragraph [0042].	18
Y	LL, R. et al. High-efficiency plastome base editing in rice with TAL cytosine deaminase. Molecular Plant. 06 September 2021, vol. 14, pp. 1412-1414. See abstract; and page 1412, right column, third paragraph.	20
A	MOK, B. Y. et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. Nature. July 2020, vol. 583, pp. 631-637 (HHS Public Access Author manuscript version, pp. 1-43). See entire document.	1-20
☒ 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 28 June 2023		Date of mailing of the international search report 28 June 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/003940**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2019-0034628 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 02 April 2019 (2019-04-02) See entire document.	1-20
A	JP 2021-536229 A (SANGAMO THERAPEUTICS, INC.) 27 December 2021 (2021-12-27) See entire document.	1-20
PX	MOK, Y. G. et al. Targeted A-to-G base editing of chloroplast DNA in plants. Nature Plants. (electronic publication) 01 December 2022, vol. 8, pp. 1378-1384, Extended Data. See abstract; pages 1378-1382; figures 1-2 and 4; extended data figure 1; and the supplementary sequences.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2023/003940
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		10
		20
		30
		40
		50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/003940

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
WO	2022-060185	A1	24 March 2022	KR	10-2023-0068402	A	17 May 2023
KR	10-2020-0008137	A	23 January 2020	AU	2018-264457	A1	19 December 2019
				CN	108866092	A	23 November 2018
				CN	108866092	B	27 December 2022
				CN	115927437	A	07 April 2023
				EP	3622061	A1	18 March 2020
				JP	2020-519310	A	02 July 2020
				US	11345924	B2	31 May 2022
				US	2021-0189416	A1	24 June 2021
				US	2022-0267788	A1	25 August 2022
				WO	2018-205995	A1	15 November 2018
KR	10-2019-0034628	A	02 April 2019	AU	2017-306676	A1	28 February 2019
				CN	110214183	A	06 September 2019
				EP	3494215	A1	12 June 2019
				JP	2019-536425	A	19 December 2019
				JP	2023-039948	A	22 March 2023
				JP	7231935	B2	08 March 2023
				US	10113163	B2	30 October 2018
				US	10947530	B2	16 March 2021
				US	2018-0073012	A1	15 March 2018
				US	2019-0093099	A1	28 March 2019
				US	2021-0317440	A1	14 October 2021
				WO	2018-027078	A1	08 February 2018
				WO	2018-027078	A8	06 December 2018
JP	2021-536229	A	27 December 2021	AU	2019-326408	A1	11 March 2021
				CN	112867792	A	28 May 2021
				EP	3841204	A1	30 June 2021
				KR	10-2021-0049124	A	04 May 2021
				US	2020-0063114	A1	27 February 2020
				WO	2020-041249	A1	27 February 2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2023/003940

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/82(2006.01)i		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/82(2006.01); C12N 15/09(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 9/78(2006.01); C12Q 1/6895(2018.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: DNA 결합 단백질(DNA binding protein), 시토신 탈아미노효소(cytosine deaminase), 분할체(split), 아데닌 탈아미노효소(adenine deaminase), 식물세포(plant cell), 엽록체(chloroplast), 염기 교정(base editing), 핵산(nucleic acid)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2022-060185 A1 (INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE) 2022.03.24 청구항 1, 3-6, 14-21, 28-29, 31-33, 37, 49; 단락 [0021], [0102]-[0103], [0148], [0560], [0848]-[0850], [0902], [1049]-[1053]; 도면 43-44, 68	1-17,19
Y		18,20
Y	KR 10-2020-0008137 A (인스티튜트 오브 제네틱스 앤드 디펜스 바이오텍놀로지, 차이니스 아카데미 오브 사이언스 등) 2020.01.23 청구항 1-2; 단락 [0042]	18
Y	LL R. 등, 'High-efficiency plastome base editing in rice with TAL cytosine deaminase', Molecular Plant, 2021.09.06, 14권, 1412-1414 페이지 초록; 페이지 1412, 우결립, 3번째 단락	20
A	MOK, B. Y. 등, 'A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing', Nature, 2020.07, 583권, 631-637 페이지 (HHS Public Access Author manuscript 버전, 1-43 페이지) 전체 문헌	1-20
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "I" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년06월28일(28.06.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년06월28일(28.06.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 히주형 전화번호 +82-42-481-5373

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2022년 7월)

10

20

30

40

50

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2023/003940

제1기 재판 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
- b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
- ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

10

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

20

30

40

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2023/003940

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2022-060185 A1	2022/03/24	KR 10-2023-0068402 A	2023/05/17
KR 10-2020-0008137 A	2020/01/23	AU 2018-264457 A1	2019/12/19
		CN 108866092 A	2018/11/23
		CN 108866092 B	2022/12/27
		CN 115927437 A	2023/04/07
		EP 3622061 A1	2020/03/18
		JP 2020-519310 A	2020/07/02
		US 11345924 B2	2022/05/31
		US 2021-0189416 A1	2021/06/24
		US 2022-0267788 A1	2022/08/25
		WO 2018-205995 A1	2018/11/15
KR 10-2019-0034628 A	2019/04/02	AU 2017-306676 A1	2019/02/28
		CN 110214183 A	2019/09/06
		EP 3494215 A1	2019/06/12
		JP 2019-536425 A	2019/12/19
		JP 2023-039948 A	2023/03/22
		JP 7231935 B2	2023/03/08
		US 10113163 B2	2018/10/30
		US 10947530 B2	2021/03/16
		US 2018-0073012 A1	2018/03/15
		US 2019-0093099 A1	2019/03/28
		US 2021-0317440 A1	2021/10/14
		WO 2018-027078 A1	2018/02/08
		WO 2018-027078 A8	2018/12/06
JP 2021-536229 A	2021/12/27	AU 2019-326408 A1	2021/03/11
		CN 112867792 A	2021/05/28
		EP 3841204 A1	2021/06/30
		KR 10-2021-0049124 A	2021/05/04
		US 2020-0063114 A1	2020/02/27
		WO 2020-041249 A1	2020/02/27

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2022년 7월)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 0 1 H 5/00 (2018.01)
C 1 2 N 15/29 (2006.01)

F I

A 0 1 H 5/00 A
C 1 2 N 15/29

,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,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MY,X,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

(72)発明者 モク ヨンゲン

大韓民国, 0 8 8 3 3 , ソウル, クアナク - ク, クアナク - ロ, 1 3 3 , # 1 0 1 - 1 0 3

(72)発明者 ペ スジ

大韓民国, 3 4 0 4 6 , テジョン, ユソン - グ, ユソン - デロ 1 6 7 9 ボン - ギル, 8 - 1 4 , # 2 0 2