

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-516285

(P2020-516285A)

(43) 公表日 令和2年6月11日 (2020. 6. 11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0	2 G 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10	4 B 0 5 0
A O 1 K 67/027 (2006. 01)	A O 1 K 67/027	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/68 (2018. 01)	C 1 2 Q 1/68	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 309 頁) 最終頁に続く		

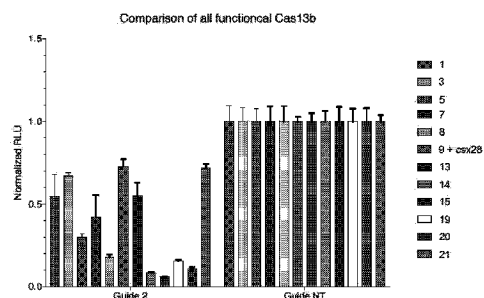
(21) 出願番号	特願2019-555810 (P2019-555810)	(71) 出願人	515236259
(86) (22) 出願日	平成30年4月11日 (2018. 4. 11)		ザ・ブロード・インスティテュート・イン コーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	令和1年12月10日 (2019. 12. 10)		アメリカ合衆国・マサチューセッツ・02 142・ケンブリッジ・メイン・ストリー ト・415
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/027125	(71) 出願人	596060697
(87) 国際公開番号	W02018/191388		マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー
(87) 国際公開日	平成30年10月18日 (2018. 10. 18)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州021 39ケンブリッジ, マサチューセッツ・ア ヴェニュー・77
(31) 優先権主張番号	62/484, 791	(74) 代理人	110000109
(32) 優先日	平成29年4月12日 (2017. 4. 12)		特許業務法人特許事務所サイクス
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	62/561, 662		
(32) 優先日	平成29年9月21日 (2017. 9. 21)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 新規V I型C R I S P Rオルソログ及び系

(57) 【要約】

本発明は、核酸を標的化する系、方法及び組成物を提供する。詳細には、本発明は、新規RNAターゲティングC R I S P Rエフェクタータンパク質と、ガイドRNAのような少なくとも1つのターゲティング核酸成分とを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされたRNAターゲティング系を提供する。

FIG 3



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

真核細胞、好ましくは哺乳類細胞の目的の標的遺伝子座を改変する方法であって、任意選択で1つ以上の局在化シグナルに融合されたCas13bエフェクタータンパク質と、1つ以上の核酸成分とを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物を前記遺伝子座に送達することを含み、少なくとも前記1つ以上の核酸成分は、エンジニアリングされ、前記1つ以上の核酸成分は、複合体を前記目的の標的に導き、及び前記エフェクタータンパク質は、前記1つ以上の核酸成分と複合体を形成し、及び前記複合体は、前記目的の標的遺伝子座に結合する、方法。

【請求項 2】

任意選択で1つ以上の局在化シグナルに融合されたCas13bエフェクタータンパク質と、1つ以上の核酸成分とを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物であって、少なくとも前記1つ以上の核酸成分は、真核細胞中の目的の標的遺伝子座の改変における使用のためにエンジニアリングされ、前記1つ以上の核酸成分は、複合体を前記目的の標的に導き、及び前記エフェクタータンパク質は、前記1つ以上の核酸成分と複合体を形成し、及び前記複合体は、前記目的の標的遺伝子座に結合する、組成物。

【請求項 3】

任意選択で1つ以上の局在化シグナルに融合されたCas13bエフェクタータンパク質と、1つ以上の核酸成分とを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物の使用であって、少なくとも前記1つ以上の核酸成分は、真核細胞中の目的の標的遺伝子座を改変するためにエンジニアリングされ、前記1つ以上の核酸成分は、複合体を前記目的の標的に導き、及び前記エフェクタータンパク質は、前記1つ以上の核酸成分と複合体を形成し、及び前記複合体は、前記目的の標的遺伝子座に結合する、使用。

【請求項 4】

前記Cas13bエフェクタータンパク質は、ポルフィロモナス属 (*Porphyromonas*)、プレボテラ属 (*Prevotella*)、バクテロイデス属 (*Bacteroides*)、リエメラ属 (*Riemerella*)、バージイェラ属 (*Bergeyella*)、アリスティペス属 (*Alistipes*)、ミロイデス属 (*Myroides*)、キャプノサイトファーガ属 (*Capnocytophaga*) 及びフラボバクテリウム属 (*Flavobacterium*) からなる群から選択される原核生物の野生型Cas13bエフェクタータンパク質と少なくとも80%相同又は同一である、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 5】

前記Cas13bエフェクタータンパク質は、ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*)、プレボテラ属種 (*Prevotella* sp.)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*)、バクテロイデス・ピオゲネス (*Bacteroides pyogenes*)、リエメラ・アナティペステイファー (*Riemerella anatipestifer*)、バージイェラ・ゾーヘルカム (*Bergeyella zoohelcum*)、プレボテラ・インターメディア (*Prevotella intermedia*)、プレボテラ・ブッカエ (*Prevotella buccae*)、アリスティペス属種 (*Alistipes* sp.)、プレボテラ・アウランティアカ (*Prevotella aurantiaca*)、ミロイデス・オドラティミマス (*Myroides odoratimimus*)、キャプノサイトファーガ・カニモルサス (*Capnocytophaga canimorsus*)、フラボバクテリウム・ブランキオフィルム (*Flavobacterium branchiophilum*) 及びフラボバクテリウム・コルムナレ (*Flavobacterium columnare*) からなる群から選択される原核生物の野生型Cas13bエフェクタータンパク質と少なくとも80%相同又は同一である、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 6】

前記 Cas 13 b エフェクタータンパク質は、ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*) Cas 13 b (受託番号 WP_039434803)、プレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5-125 Cas 13 b (受託番号 WP_044065294)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) Cas 13 b (受託番号 WP_053444417)、ポルフィロモナス属種 (*Porphyromonas* sp.) COT-052 OH 4946 Cas 13 b (受託番号 WP_039428968)、バクテロイデス・ピオゲネス (*Bacteroides pyogenes*) Cas 13 b (受託番号 WP_034542281)、リエメラ・アナティペステイファー (*Riemerella anatipestifer*) Cas 13 b (受託番号 WP_004919755)、バー
 ジイエラ・ズーヘルカム (*Bergeyella zoohelcum*) Cas 13 b (受託番号 WP_002664492)、プレボテラ・インターメディア (*Prevotella intermedia*) Cas 13 b (受託番号 WP_036860899)、プレボテラ・ブッカエ (*Prevotella buccae*) Cas 13 b (受託番号 WP_004343973)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) Cas 13 b (受託番号 WP_012458151)、アリストイペス属種 (*Alistipes* sp.) ZOR0009 Cas 13 b (受託番号 WP_047447901)、プレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) MA2016 Cas 13 b (受託番号 WP_036929175)、プレボテラ・アウランティアカ (*Prevotella aurantiaca*) Cas 13 b (受託番号 WP_025000926)、ミロイデス・オドラティミマス (*Myroides odoratimimus*) CCUG 10230 Cas 13 b (受託番号 EHO06562)、プレボテラ・インターメディア (*Prevotella intermedia*) Cas 13 b (受託番号 WP_061868553)、キャプノサイトファーガ・カニモルサス (*Capnocytophaga canimorsus*) Cas 13 b (受託番号 WP_013997271)、フラボバクテリウム・ブランキオフィウム (*Flavobacterium branchiophilum*) Cas 13 b (受託番号 WP_014084666)、ミロイデス・オドラティミマス (*Myroides odoratimimus*) Cas 13 b (受託番号 WP_058700060)、フラボバクテリウム・コルムナレ (*Flavobacterium columnare*) Cas 13 b (受託番号 WP_065213424) 及びプレボテラ・インターメディア (*Prevotella intermedia*) Cas 13 b (受託番号 WP_050955369) からなる群から選択される野生型 Cas 13 b エフェクタータンパク質と少なくとも 80 % 相同又は同一である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 7】

前記 Cas 13 b エフェクタータンパク質は、ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*) Cas 13 b (受託番号 WP_039434803)、プレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5-125 Cas 13 b (受託番号 WP_044065294)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) Cas 13 b (受託番号 WP_053444417)、ポルフィロモナス属種 (*Porphyromonas* sp.) COT-052 OH 4946 Cas 13 b (受託番号 WP_039428968)、バクテロイデス・ピオゲネス (*Bacteroides pyogenes*) Cas 13 b (受託番号 WP_034542281) 及びリエメラ・アナティペステイファー (*Riemerella anatipestifer*) Cas 13 b (受託番号 WP_004919755) からなる群から選択される野生型 Cas 13 b エフェクタータンパク質と少なくとも 80 % 相同である、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 8】

前記 Cas 13 b エフェクタータンパク質は、ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*) Cas 13 b (受託番号 WP_039434803) 及

びプレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5-125 Cas13b (受託番号WP_044065294) からなる群から選択される野生型 Cas13b エフェクタータンパク質と少なくとも 80% 相同である、請求項 1~7 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 9】

前記 Cas13b エフェクタータンパク質は、DKHXFGAFLNLARHN (配列番号 1)、GLLFFVSLFLDK (配列番号 2)、SKI XGFK (配列番号 3)、DMLNELXRCP (配列番号 4)、RXZDRFPYFALRYXD (配列番号 5) 及び LRFQVBLGXY (配列番号 6) からなる配列の 1 つ以上と少なくとも 70% の配列同一性を有する配列を含むタンパク質である、請求項 1~8 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

10

【請求項 10】

前記目的の標的遺伝子座は、RNA を含む、請求項 1~9 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 11】

前記 Cas13b エフェクタータンパク質は、少なくとも 1 つの局在化シグナルに融合され、前記局在化シグナルは、核局在化シグナル (NLS) 又は核外移行シグナル (NES)、好ましくは NES である、請求項 1~10 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 12】

前記目的の標的遺伝子座の前記改変は、鎖切断を含む、請求項 1~11 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

20

【請求項 13】

前記 Cas13b エフェクタータンパク質は、哺乳類細胞における発現にコドン最適化される、請求項 1~12 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 14】

前記 Cas13b エフェクタータンパク質は、1 つ以上の機能ドメインと会合され、及び任意選択で、前記エフェクタータンパク質は、R116A、H121A、R1177A、H1182A (ここで、アミノ酸位置は、バージイェラ・ゾーヘルカム (*Bergeyella zoohelcum*) ATCC 43767 に由来する Cas13b タンパク質のアミノ酸位置に対応する) など、1 つ以上の突然変異を任意選択で HEPN ドメイン内に含有し、それにより、前記複合体は、後成的改変因子又は転写、若しくは翻訳活性化、若しくは抑制シグナルを送達することができる、請求項 1~13 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

30

【請求項 15】

前記機能ドメインは、前記標的遺伝子座の転写又は翻訳を改変する、請求項 1~14 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 16】

前記目的の標的遺伝子座は、細胞内の核酸分子に含まれる、請求項 1~15 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

40

【請求項 17】

前記改変は、インビボ又はエキソビボである、請求項 1~16 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 18】

前記エフェクタータンパク質と複合体化したとき、前記核酸成分は、前記目的の標的遺伝子座の標的配列に対する前記複合体の配列特異的結合を生じさせる能力を有する、請求項 1~17 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 19】

前記核酸成分は、デュアルダイレクトリピート配列を含む、請求項 1~18 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

50

【請求項 20】

前記エフェクタータンパク質及び前記核酸成分は、前記ポリペプチド及び／又は前記核酸成分をコードする1つ以上のポリヌクレオチド分子によって提供され、前記1つ以上のポリヌクレオチド分子は、前記ポリペプチド及び／又は前記核酸成分を発現するように作動可能に構成される、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 21】

前記1つ以上のポリヌクレオチド分子は、前記ポリペプチド及び／又は前記核酸成分を発現するように作動可能に構成された1つ以上の調節エレメントを含み、任意選択で、前記1つ以上の調節エレメントは、プロモーター又は誘導性プロモーターを含む、請求項20に記載の方法、組成物又は使用。

10

【請求項 22】

前記1つ以上のポリヌクレオチド分子は、1つ以上のベクター内に含まれる、請求項20又は21に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 23】

前記1つ以上のポリヌクレオチド分子は、1つのベクター内に含まれる、請求項20又は21に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 24】

前記1つ以上のベクターは、ウイルスベクターを含む、請求項22又は23に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 25】

前記1つ以上のウイルスベクターは、1つ以上のレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴又は単純ヘルペスウイルスベクターを含む、請求項24に記載の方法、組成物又は使用。

20

【請求項 26】

前記1つ以上のポリヌクレオチド分子は、送達系に含まれる、請求項20若しくは21に記載の方法、組成物若しくは使用、又は前記1つ以上のベクターは、送達系に含まれる、請求項22若しくは23に記載の方法、組成物若しくは使用、又は前記アセンブルされた複合体は、送達系に含まれる、請求項1～25のいずれか一項に記載の方法、組成物若しくは使用。

【請求項 27】

前記天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物は、リボソーム、粒子、エキソソーム、微小胞、遺伝子銃又は1つ以上のウイルスベクターを含む送達媒体によって送達される、請求項1～26のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

30

【請求項 28】

前記組成物は、Cas13bエフェクタータンパク質活性を増強するアクセサリタンパク質、好ましくはcsx28タンパク質を含む、請求項1～27のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

【請求項 29】

前記組成物は、Cas13bエフェクタータンパク質活性を抑制するアクセサリタンパク質、好ましくはcsx27タンパク質を含む、請求項1～28のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

40

【請求項 30】

前記Cas13bエフェクタータンパク質は、少なくとも1つの機能ドメインに連結され、前記Cas13bエフェクタータンパク質は、前記HEPNドメインに1つ以上の突然変異を含み、前記Cas13bエフェクタータンパク質は、そのC末端でトランケートされ、前記トランケーションは、任意選択で、プレボテラ属種(Prevotella sp.) P5-125 Cas13bタンパク質のアミノ酸位置に対応するΔ1053～1090、Δ1026～1090、Δ984～1090、Δ934～1090、Δ884～1090、Δ834～1090、Δ784～1090及びΔ734～1090から選択される、請求項1～29のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用。

50

【請求項 3 1】

先行する若しくは後続の請求項のいずれか一項に記載の方法によって改変されているか、又は先行する若しくは後続の請求項のいずれか一項に記載の組成物若しくはその構成成分を任意選択で誘導的又は構成的に含むか若しくは発現するようにエンジニアリングされている哺乳類細胞。

【請求項 3 2】

前記改変は、

- 少なくとも 1 つの RNA 産物の転写又は翻訳の変化を含む前記細胞、
 - 少なくとも 1 つの RNA 産物の転写又は翻訳の変化を含む前記細胞であって、前記少なくとも 1 つの産物の発現は、増加される、前記細胞、又は
 - 少なくとも 1 つの RNA 産物の転写又は翻訳の変化を含む前記細胞であって、前記少なくとも 1 つの産物の発現は、減少される、前記細胞
- をもたらす、請求項 3 1 に記載の哺乳類細胞。

10

【請求項 3 3】

真核細胞、好ましくは哺乳類細胞におけるインビボ又はエキソビボでの使用：

- RNA 配列特異的干渉、
- RNA 配列特異的遺伝子調節、
- RNA 若しくは RNA 産物、又は l i n c RNA 若しくは非コード RNA、又は核 RNA、又は mRNA のスクリーニング、
- 突然変異誘発、
- 蛍光インサイチュハイブリダイゼーション、
- 育種、
- 細胞休眠のインビトロ又はインビボ誘導、
- 細胞周期停止のインビトロ又はインビボ誘導、
- 細胞成長及び／又は細胞増殖のインビトロ又はインビボ低下、
- 細胞アネルギーのインビトロ又はインビボ誘導、
- 細胞アポトーシスのインビトロ又はインビボ誘導、
- 細胞壊死のインビトロ又はインビボ誘導、
- 細胞死のインビトロ又はインビボ誘導、又は
- プログラム細胞死のインビトロ又はインビボ誘導

20

30

のための、請求項 1 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の又は請求項 1 ～ 3 0 のいずれか一項で言及される天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物。

【請求項 3 4】

請求項 3 1 又は 3 2 に記載の細胞の若しくはそれを含む細胞株又はその子孫。

【請求項 3 5】

請求項 3 1 又は 3 2 に記載の 1 つ以上の細胞を含む真核生物、好ましくは哺乳類。

【請求項 3 6】

請求項 3 1 又は 3 2 に記載の 1 つ以上の細胞を含む真核生物モデル、好ましくは哺乳類モデルであって、前記細胞は、任意選択で、請求項 1 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物又はその成分を誘導的又は構成的に発現する、真核生物モデル、好ましくは哺乳類モデル。

40

【請求項 3 7】

請求項 3 1 若しくは 3 2 の細胞、又は請求項 3 4 若しくは 3 5 に記載の細胞株若しくは生物、又は請求項 3 6 に記載の哺乳類モデルからの産物であって、前記細胞株又は哺乳類モデルの哺乳類の前記 1 つ又は複数の細胞は、任意選択で、請求項 1 ～ 3 6 のいずれか一項に記載の組成物又はその成分を誘導的又は構成的に発現する、産物。

【請求項 3 8】

請求項 1 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の方法、組成物又は使用を含むアッセイ、スクリーニング方法又は突然変異誘発方法。

【請求項 3 9】

50

R N A ベースのアッセイ、スクリーニング方法又は突然変異誘発方法であって、改善は、R N A を使用する代わりに、含み、前記方法は、請求項 1 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の又は請求項 1 ～ 3 0 のいずれか一項で言及される天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物を使用することを含み、任意選択で、前記 R N A ベースのアッセイ、スクリーニング方法又は突然変異誘発方法は、R N A i 又は蛍光インサイチュハイブリダイゼーション方法である、R N A ベースのアッセイ、スクリーニング方法又は突然変異誘発方法。

【請求項 4 0】

目的の真核生物標的遺伝子座の翻訳を調節する方法であって、請求項 1 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の又は請求項 1 ～ 3 0 のいずれか一項で言及される天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物を前記遺伝子座に送達することを含み、前記 C a s 1 3 b エフェクタータンパク質は、翻訳アクチベーター又は翻訳リプレッサーなどの（異種）翻訳調節因子及び任意選択で 1 つ以上の局在化シグナルに融合され、少なくとも前記 1 つ以上の核酸成分は、エンジニアリングされ、前記 1 つ以上の核酸成分は、複合体を前記目的の標的に導き、及び前記エフェクタータンパク質は、前記 1 つ以上の核酸成分と複合体を形成し、及び前記複合体は、前記目的の標的遺伝子座に結合し、好ましくは、前記異種ドメインは、E I F 4 E などの E I F 4 である、方法。

【請求項 4 1】

試料中の標的 R N A を検出する方法であって、

（a）前記試料を、請求項 1 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の又は請求項 1 ～ 3 0 のいずれか一項で言及される天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物及び前記エフェクタータンパク質によって非特異的且つ検出可能に切断される能力を有する R N A ベースの切断誘導可能レポーターとインキュベートすること、

（b）前記 R N A ベースの切断誘導可能レポーターの切断によって生成されるシグナルに基づいて前記標的 R N A を検出することを含む方法。

【請求項 4 2】

前記 R N A ベースの切断誘導可能レポーター構築物は、蛍光色素及び消光剤を含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記標的 R N A は、病原体 R N A を含む、請求項 4 1 又は 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記病原体は、ウイルス、細菌、真菌又は寄生虫を含む、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

標的 R N A の一塩基変異多型又は R N A 転写物のスプライス変異体を検出するように設計されたガイド R N A を含む、請求項 4 1 ～ 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記ガイド R N A は、標的 R N A との 1 つ以上のミスマッチヌクレオチドを含む、請求項 4 1 ～ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記ガイド R N A は、疾患状態の診断指標となる標的分子に結合する、請求項 4 1 ～ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記疾患状態は、癌を含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記疾患状態は、自己免疫疾患を含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 0】

リボ核酸（R N A）検出系であって、

a）請求項 1 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の又は請求項 1 ～ 3 0 のいずれか一項で言及される天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、及び

c) 前記エフェクタータンパク質によって非特異的且つ検出可能に切断される能力を有するRNAベースの切断誘導可能レポーターを含むリボ核酸(RNA)検出系。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願及び参照による援用

本願は、2017年4月12日に出願された米国仮特許出願第62/484,791号明細書、2017年9月21日に出願された米国仮特許出願第62/561,662号明細書及び2017年10月4日に出願された米国仮特許出願第62/568,129号明細書に対する優先権を主張し、これらの各々は、本明細書において全体として参照により援用される。

【0002】

2016年10月21日に出願された、特に米国を指定国とする出願PCT/米国特許出願公開第2016/058302号明細書を含むPCT出願が参照される。2015年10月22日に出願された米国仮特許出願第62/245,270号明細書、2016年2月17日に出願された米国仮特許出願第62/296,548号明細書並びに2016年8月17日に出願された米国仮特許出願第62/376,367号明細書及び同第62/376,382号明細書が参照される。更に、2017年3月15日に出願された米国特許出願第62/471,792号明細書が参照される。更に、2017年3月17日に出願された米国仮特許出願第62/471,170号明細書が参照される。更に、2017年4月12日に出願された米国仮特許出願第62/484,791号明細書が参照される。更に、2017年9月21日に出願された米国仮特許出願第62/561,662号明細書が参照される。Smargon et al. (2017), "Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28", Molecular Cell 65, 618-630 (Feb. 16, 2017) doi:10.1016/j.molcel.2016.12.023. Epub Jan 5, 2017及びSmargon et al. (2017), "Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28", bioRxiv 092577; doi:https://doi.org/10.1101/092577. Posted December 9, 2017が挙げられる。前述の出願及び文献引用の各々は、本明細書によって参照により本明細書に援用される。

【0003】

本明細書に引用される文献中で引用又は参照される全ての文献は、本明細書で言及されるか又は本明細書に参照によって援用される任意の文献中にある任意の製品に関する任意の製造者の指示書、説明書、製品仕様書及びプロダクトシートと共に、本明細書によって参照により本明細書に援用され、且つ本発明の実施に用いられ得る。より具体的には、参照される全ての文献は、各個別の文献について参照によって援用されることが具体的且つ個別に指示されたものとするのと同程度に参照によって援用される。

【0004】

連邦政府支援研究に関する記載事項

本発明は、国立衛生研究所(National Institutes of Health)から付与された助成金第MH100706号及び第MH110049号に基づく連邦政府の支援を受けて行われた。連邦政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0005】

本発明は、概して、遺伝子転写物の摂動又は核酸編集など、クラスター化した規則的な

10

20

30

40

50

間隔の短いパリンドローム反復（C R I S P R）及びその構成成分に関するベクター系を使用し得る配列ターゲティングを含む遺伝子発現の制御に用いられる系、方法及び組成物に関する。

【背景技術】

【0006】

ゲノムシーケンシング技法及び解析方法の最近の進歩により、様々な生物学的機能及び疾患に関連する遺伝因子をカタログ化し及びマッピングする能力が急速に向上している。個々の遺伝エレメントを選択的に摂動させることによる原因遺伝的変異の体系的なリバースエンジニアリングを可能にすると共に合成生物学、バイオテクノロジー的及び医学的応用を進歩させるには、正確なゲノムターゲティング技術が必要である。標的化したゲノム摂動を生じさせるためにデザイナーズジグフィンガー、転写アクチベーター様エフェクター（T A L E）又はホーミングメガヌクレアーゼなどのゲノム編集技法が利用可能であるものの、新規戦略及び分子機構を利用し、及び安価で、セットアップし易く、スケールアップが可能であり、且つ真核生物ゲノム及びトランスクリプトーム内の複数の位置を標的化するのに適した新規のゲノム及びトランスクリプトームエンジニアリング技術が依然として必要とされている。それは、ゲノムエンジニアリング及びバイオテクノロジーにおける新規適用の主要なリソースとなるであろう。

【0007】

細菌及び古細菌適応免疫のC R I S P R－C a s系は、タンパク質組成及びゲノム遺伝子座構成に関して極めて高度な多様性を示す。C R I S P R－C a s系遺伝子座は、50を超える遺伝子ファミリーを有し、厳密な意味で普遍的な遺伝子はないことから、急速な進化及び遺伝子座構成の極めて高度な多様性が示唆される。これまでのところ、多方向からの手法をとることにより、93個のC a sタンパク質について約395個のプロファイルのc a s遺伝子が包括的に同定されている。分類に含まれるのは、シグネチャ遺伝子プロファイル＋遺伝子座構成のシグネチャである。C R I S P R－C a s系の新規分類が提案されており、ここで、これらの系は、大まかに2つのクラス、マルチサブユニットエフェクター複合体を有するクラス1と、C a s9タンパク質に例示される単一サブユニットエフェクターモジュールを有するクラス2とに分けられる。クラス2 C R I S P R－C a s系に関連する新規エフェクタータンパク質は、強力なゲノムエンジニアリングツールとして開発することができ、推定上の新規エフェクタータンパク質の予測並びにそれらのエンジニアリング及び最適化が重要である。

【0008】

C R I S P R－C a s適応免疫系は、微生物をDNA又はRNA－DNA干渉によって外来遺伝要素から防御する。クラス2 V I型単一成分C R I S P R－C a sエフェクターは、RNAを標的化する。1つのそのようなものは、C a s13a（C2c2としても知られる：Shmakov et al. (2015) “Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 C R I S P R－C a s Systems”；Molecular Cell 60：1－13；doi：http：//dx.doi.org/10.1016/j.molcell.2015.10.008を参照されたい）であり、これは、RNAガイド下RNAアーゼとして特徴付けられた（Abudayyeh et al. (2016), Science, [Epub ahead of print], June 2；“C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting C R I S P R effector”；doi：10.1126/science.aaf5573）。現在の分類では、C a s13aは、クラス2 V I－A型C R I S P R－C a s系である。他の選択肢は、C a s13b、クラス2 V I－B型エフェクタータンパク質によって提供される。クラス2 V I－B型エフェクタータンパク質は、2つのサブグループ、グループ29タンパク質及びグループ30タンパク質とも称されるV I－B1型及びV I－B2型を含み、RNAプログラム可能ヌクレアーゼである、RNA干渉性の且つRNAファージに対する細菌

性養子免疫に関わり得るメンバーを含む。(Smargon A et al. “Cas13b is a Type VI-B CRISPR-associated RNA-Guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28”, Molecular Cell, online January 5, 2017. DOI: 10.1016/j.molcell.2016.12.023を参照されたい)。

【0009】

グループ29及びグループ30系は、Cas13bと呼ばれる大型のシングルエフェクター(約1100アミノ酸長)を含み、且つCRISPRアレイに隣接して2つの低分子推定アクセサリタンパク質(約200アミノ酸長、Csx27及びCsx28と呼ばれる)の一方を含むもの又はそのいずれも含まないものである。この隣接低分子タンパク質に基づき、この系は、VI-B1型(Csx27)又はVI-B2型(Csx28)に分類される。アレイから上流又は下流に25キロベース対まで、各遺伝子座を有する種間で保存されている追加的なタンパク質はない。僅かな例外はあるが、CRISPRアレイは、ダイレクトリピート配列36ヌクレオチド長及びスペーサー配列30ヌクレオチド長を含む。ダイレクトリピートは、概して良く保存されており、特に末端で良く保存され、5'末端のGTTG/GUUGは、3'末端のCAACと逆相補的である。この保存は、遺伝子座内のタンパク質と相互作用する可能性のあるRNAループ構造に向かう強力な塩基対合を示唆している。ダイレクトリピートに相補的なモチーフ検索から、アレイに隣接した候補tracrRNAは明らかになっておらず、Cpf1遺伝子座に見られるような単一のcrRNAを示すものである。

【0010】

本願における任意の文献の引用又は特定は、かかる文献が本発明の先行技術として利用可能であることを承認するものではない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

多岐にわたる適用、詳細には真核生物系、より詳細には哺乳類系における適用を有し、核酸又はポリヌクレオチド(例えば、DNA若しくはRNA又はこれらの任意のハイブリッド若しくは誘導体)を標的化するための代替的且つロバスタなシステム及び技法が喫緊に必要とされている。本発明は、この必要性に応え、関連する利点を提供する。本願の新規RNAターゲティング系がゲノム、トランスクリプトーム及びエピゲノムターゲティング技術のレパートリーに加わることにより、詳細には真核生物系、より詳細には哺乳類系(細胞、器官、組織又は生物を含む)における、直接的な検出、分析及び操作を通じた特定の標的部位の研究及び摂動又は編集が変わり得る。本願のRNAターゲティング系を有害作用なしにRNAターゲティングに有効に利用するには、これらのRNAターゲティングツールのエンジニアリング及び最適化の側面を理解することが決定的に重要である。

【課題を解決するための手段】

【0012】

クラス2 VI-B型エフェクタータンパク質Cas13bは、ssRNAを分解するように効率的にプログラムすることのできるRNA誘導型RNAアーゼである。本発明者らは、スクリーニングを行って、異なる種からの代表的な幾つものCas13bオルソログを特定し、真核細胞環境におけるそれらのオルソログの有効性を決定した。様々な実施形態において、本発明は、VI-B型CRISPR-Casエフェクタータンパク質又はCas13bエフェクタータンパク質並びにかかるタンパク質をコードする核酸を参照するか、それを含むか、又はそれを利用する。

【0013】

一部の実施形態において、エフェクタータンパク質は、ポルフィロモナス属(Porphyrimonas)、プレボテラ属(Prevotella)、バクテロイデス属(Bacteroides)、リエメラ属(Riemerella)、バージイセラ属(B

ergeyella)、アリストイペス属 (Alistipes)、ミロイデス属 (Myroides)、キャプノサイトファーガ属 (Capnocytophaga) 及びフラボバクテリウム属 (Flavobacterium) からなる群から選択される原核生物の野生型 Cas13b エフェクタータンパク質と少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれを超えて相同又は同一である。一部の実施形態において、エフェクタータンパク質は、ポルフィロモナス・グラエ (Porphyromonas gulae)、プレボテラ属種 (Prevotella sp.)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (Porphyromonas gingivalis)、バクテロイデス・ピオゲネス (Bacteroides pyogenes)、リエメラ・アナティペステイファー (Riemerella anatipestifer)、バージイェラ・ゾーヘルカム (Bergeyella zoohelcum)、プレボテラ・インターメディア (Prevotella intermedia)、プレボテラ・ブッカエ (Prevotella buccae)、アリストイペス属種 (Alistipes sp.)、プレボテラ・アウランティアカ (Prevotella aurantiaca)、ミロイデス・オドラティミマス (Myroides odoratimimus)、キャプノサイトファーガ・カニモルサス (Capnocytophaga canimorsus)、フラボバクテリウム・ブランキオフィルム (Flavobacterium branchiophilum) 及びフラボバクテリウム・コルムナレ (Flavobacterium columnare) からなる群から選択される原核生物の野生型 Cas13b エフェクタータンパク質と少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれを超えて相同又は同一である。好ましい実施形態において、エフェクタータンパク質は、ポルフィロモナス・グラエ (Porphyromonas gulae) Cas13b (受託番号 WP__039434803)、プレボテラ属種 (Prevotella sp.) P5-125 Cas13b (受託番号 WP__044065294)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (Porphyromonas gingivalis) Cas13b (受託番号 WP__053444417)、ポルフィロモナス属種 (Porphyromonas sp.) COT-052 OH4946 Cas13b (受託番号 WP__039428968)、バクテロイデス・ピオゲネス (Bacteroides pyogenes) Cas13b (受託番号 WP__034542281)、リエメラ・アナティペステイファー (Riemerella anatipestifer) Cas13b (受託番号 WP__004919755) からなる群から選択される野生型 Cas13b エフェクタータンパク質と少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれを超えて相同又は同一である。最も好ましいエフェクタータンパク質は、ポルフィロモナス・グラエ (Porphyromonas gulae) Cas13b (受託番号 WP__039434803)、プレボテラ属種 (Prevotella sp.) P5-125 Cas13b (受託番号 WP__044065294)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (Porphyromonas gingivalis) Cas13b (受託番号 WP__053444417)、ポルフィロモナス属種 (Porphyromonas sp.) COT-052 OH4946 Cas13b (受託番号 WP__039428968) からなる群から選択される野生型 Cas13b エフェクタータンパク質と少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれを超えて相同又は同一のものであり、及び最も特別に好ましいのは、ポルフィロモナス・グラエ (Porphyromonas gulae) Cas13b (受託番号 WP__039434803) 又はプレボテラ属種 (Prevotella sp.) P5-125 Cas13b (受託番号 WP__044065294) である。これらの Cas13b エフェクタータンパク質の各々及び他の完全なアミノ酸配列を図 1 に提供する。

10

20

30

40

50

【0014】

一部の実施形態において、Cas13bエフェクタータンパク質は、(a) 900～1800アミノ酸及び2つのHEPNドメインを含み、(b) 原核生物ゲノムにおいてCRISPRアレイの上流又は下流10kb以内に天然に存在し、(c) CRISPRアレイの上流又は下流10kb以内に700アミノ酸超を含む唯一のコードされるタンパク質であり、及び／又は(d) CRISPRアレイの上流又は下流10kb以内にCas1遺伝子又はCas2遺伝子がない。一部の実施形態において、Csx27又はCsx28の少なくとも一方もCRISPRアレイの上流又は下流10kb以内に存在する。

【0015】

特定の実施形態において、Cas13bエフェクタータンパク質は、野生型タンパク質と比較したとき、改変配列を有する。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、2つ以上のCas13bエフェクタータンパク質で共有される少なくとも1つ以上の共通モチーフにおいて野生型Cas13bエフェクタータンパク質と同一である。共通モチーフは、コンセンサス配列を同定するための標準的な配列アラインメントツールによって決定され得る。詳細な実施形態において、Cas13bエフェクタータンパク質は、DKHXFGAFLNLRHN（配列番号1）、GLLFFVSLFLDK（配列番号2）、SKI XGFK（配列番号3）、DMLNELXRCP（配列番号4）、RXZDRFPYFALRYXD（配列番号5）及びLRFQVBLGXY（配列番号6）からなる配列の1つ以上と少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含むタンパク質である。更なる詳細な実施形態において、Cas13bエフェクタータンパク質は、これらの配列の少なくとも2、3、4、5つ又は6つ全てと少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含む。更なる詳細な実施形態において、これらの配列との配列同一性は、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%又は100%である。更なる詳細な実施形態において、Cas13bエフェクタータンパク質は、GLLFFVSLFL（配列番号7）及びRHQXRFPYF（配列番号8）と100%の配列同一性を有する配列を含むタンパク質である。更なる詳細な実施形態において、Cas13bエフェクターは、RHQDRFPY（配列番号9）と100%の配列同一性を有する配列を含むCas13bエフェクタータンパク質である。

【0016】

用語のCas酵素、CRISPR酵素、CRISPRタンパク質、Casタンパク質及びCRISPR Casは、概して同義的に用いられ、Cas9に具体的に言及することによるなど、特に明らかでない限り、本明細書で言及する際、常に類推から本願に更に記載されるCRISPRエフェクタータンパク質を指すことが理解されるであろう。

【0017】

本発明の実施形態において、VI-B型系は、Cas13bエフェクタータンパク質と、任意選択で、Cas13bエフェクタータンパク質の上流又は下流にコードされる低分子アクセサリタンパク質とを含む。特定の実施形態において、低分子アクセサリタンパク質は、Cas13bエフェクターがRNAを標的化する能力を増強する。

【0018】

本発明の特定の実施形態において、VI-B型系は、Cas13bエフェクタータンパク質と、任意選択で、Cas13bエフェクタータンパク質の上流又は下流にコードされる低分子アクセサリタンパク質とを含む。特定の実施形態において、低分子アクセサリタンパク質は、Cas13bエフェクターがRNAを標的化する能力を抑制する。

【0019】

本発明は、i) VI-B型CRISPR-Casエフェクタータンパク質と、ii) VI-B型CRISPR-Cas crRNAであって、a) 標的RNA配列にハイブリダイズする能力を有するガイド配列、及びb) ダイレトリビート配列を含むcrRNAとを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物を提供する。VI-B型CRISPR-Casエフェクタータンパク質は、crRNAと複合体を形成し、及びガイド配列は、複合体による標的RNA配列への配列特異的結合を導き、それにより、標的RN

A配列にハイブリダイズするガイド配列と複合体化したV I-B型C R I S P R-C a s エフェクタータンパク質を含むC R I S P R複合体が形成される。ガイド配列が標的R N A配列に特異的にハイブリダイズすると形成される複合体は、プロトスペーサーフランキング配列（P F S）の相互作用（認識）を含む。

【0020】

一部の実施形態において、本発明の天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物は、V I-B型C R I S P R-C a s エフェクタータンパク質活性を増強するV I-B型C R I S P R-C a s アクセサリタンパク質を含み得る。特定のかかる実施形態において、V I-B型C R I S P R-C a s エフェクタータンパク質活性を増強するアクセサリタンパク質は、c s x 2 8タンパク質である。かかる実施形態において、V I-B型C R I S P R-C a s エフェクタータンパク質とV I-B型C R I S P R-C a s アクセサリタンパク質とは、同じ供給源由来又は異なる供給源由来であり得る。

10

【0021】

一部の実施形態において、本発明の天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物は、V I-B型C R I S P R-C a s エフェクタータンパク質活性を抑制するV I-B型C R I S P R-C a s アクセサリタンパク質を含む。特定のかかる実施形態において、V I-B型C R I S P R-C a s エフェクタータンパク質活性を抑制するアクセサリタンパク質は、c s x 2 7タンパク質である。かかる実施形態において、V I-B型C R I S P R-C a s エフェクタータンパク質とV I-B型C R I S P R-C a s アクセサリタンパク質とは、同じ供給源由来又は異なる供給源由来であり得る。

20

【0022】

一部の実施形態において、本発明の天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物は、2つ以上のV I-B型C R I S P R-C a s c r R N Aを含む。

【0023】

一部の実施形態において、本発明の天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物は、原核細胞の標的R N A配列にハイブリダイズするガイド配列を含む。一部の実施形態において、本発明の天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物は、真核細胞の標的R N A配列にハイブリダイズするガイド配列を含む。本明細書に提供されるとおりのC R I S P R系は、c r R N A又はガイド配列を含む類似のポリヌクレオチドを利用することができ、このポリヌクレオチドは、R N A、D N A又はR N AとD N Aとの混合物であり、及び／又はこのポリヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオチド類似体を含む。この配列は、限定はされないが、バルジ、ヘアピン又はステムループ構造などの天然c r R N Aの構造を含め、任意の構造を含むことができる。特定の実施形態において、ガイド配列を含むポリヌクレオチドは、R N A又はD N A配列であり得る第2のポリヌクレオチド配列と二重鎖を形成する。

30

【0024】

特定の実施形態において、本方法は、化学的に改変されたガイドR N Aを利用する。ガイドR N A化学的改変の例としては、限定なしに、1つ以上の末端ヌクレオチドにおける2'-O-メチル（M）、2'-O-メチル3'ホスホロチオエート（MS）又は2'-O-メチル3'チオP A C E（M S P）の取り込みが挙げられる。かかる化学的に改変されたガイドR N Aは、非改変ガイドR N Aと比較したとき、安定性の増加及び活性の増加を含み得るが、オンターゲット対オフターゲット特異性は、予測不可能である（H e n d e l, 2015, Nat Biotechnol. 33（9）：985-9, doi:10.1038/nbt.3290, published online 29 June 2015を参照されたい）。化学的に改変されたガイドR N Aとしては、限定なしに、ホスホロチオエート結合を含むR N A及びリボース環の2'炭素と4'炭素との間にメチレン架橋を含むロックド核酸（L N A）ヌクレオチドが更に挙げられる。

40

【0025】

一部の実施形態において、V I-B型C R I S P R-C a s エフェクタータンパク質は、1つ以上の核局在化シグナル（N L S）を含む。

50

【0026】

Cas13bは、CRISPR-Cas系に見られる他の公知のRNAアーゼの触媒機構と対照的に、その2つのHEPNドメイン内にある保存された塩基性残基によってRNA切断を実現する。4つの予測HEPNドメイン触媒残基のいずれかの（例えば、アラニン）置換などのHEPNドメインの突然変異は、Cas13bを不活性プログラム可能RNA結合タンパク質（dCas9に類似するdCas13b）に変換することができる。

【0027】

dCas13bが指定した配列に結合可能であれば、その能力を本発明に係る幾つかの態様に用いることにより、（i）エフェクターモジュールを特異的転写物に持ち込んで機能又は翻訳を調節し（これは、大規模スクリーニング、合成調節回路の構築及び他の目的に用い得る可能性がある）、（ii）特異的RNAに蛍光タグを付加してその輸送及び／又は局在を可視化し、（iii）特異的細胞内区画に親和性のあるドメインによってRNA局在を変化させ、及び（iv）特異的転写物を（dCas13bを直接プルダウンするか、又はdCas13bを用いてビオチンリガーゼ活性を特異的転写物に局在させることにより）捕捉してRNA及びタンパク質を含めた近接分子パートナーをエンリッチすることができる。

【0028】

活性Cas13bにも多くの適用があるはずである。本発明のある態様は、特異的転写物を破壊の標的にすることを含む。加えて、Cas13bは、コグネイト標的にによってプライミングされると、インビトロで他の（非相補的）RNA分子を切断することができ、且つインビボで細胞成長を阻害することができる。生物学的には、この雑多なRNAアーゼ活性は、VI-B型CRISPR-Cas系のプログラム細胞死／休眠（PCD／D）に基づく防御機構を反映し得る。従って、本発明のある態様では、それは、特異的細胞 — 例えば、特定の転写物を発現する癌細胞、所与のクラスのニューロン、特異的病原体に感染した細胞又は他の異常な細胞若しくはその存在が他に望ましくない細胞にPCD又は休眠を惹起するために使用し得る可能性がある。

【0029】

本発明は、目的の標的遺伝子座、詳細には真核細胞、組織、器官又は生物、より詳細には哺乳類細胞、組織、器官又は生物の目的の標的遺伝子座に関連するか又はそこにある核酸配列を改変する方法を提供し、この方法は、VI-B型CRISPR-Cas遺伝子座エフェクタータンパク質と1つ以上の核酸成分とを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物を前記遺伝子座に送達することを含み、ここで、エフェクタータンパク質は、1つ以上の核酸成分と複合体を形成し、前記複合体が目的の遺伝子座に結合すると、エフェクタータンパク質は、目的の標的遺伝子座に関連するか又はそこにある配列の改変を誘導する。好ましい実施形態において、改変は、鎖切断の導入である。好ましい実施形態において、目的の標的遺伝子座に関連するか又はそこにある配列は、RNAを含み、及びエフェクタータンパク質は、VI-B型CRISPR-Cas遺伝子座によってコードされる。複合体は、インビトロ又はエキソビボで形成されて細胞に導入されるか、又はRNAと接触されるか、又はインビボで形成され得る。

【0030】

本発明は、目的の標的遺伝子座に関連するか又はそこにある配列を標的化（改変など）する方法を提供し、この方法は、Cas13b遺伝子座エフェクタータンパク質（これは、触媒活性又は代わりに触媒不活性であり得る）と1つ以上の核酸成分とを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物を、遺伝子座に関連するか又はそこにある前記配列に送達することを含み、ここで、Cas13bエフェクタータンパク質は、1つ以上の核酸成分と複合体を形成し、前記複合体が目的の遺伝子座に結合すると、エフェクタータンパク質は、目的の標的遺伝子座に関連するか又はそこにある配列の改変を誘導する。好ましい実施形態において、改変は、鎖切断の導入である。好ましい実施形態において、Cas13bエフェクタータンパク質は、1つの核酸成分、有利にはエンジニアリングされた又は天然に存在しない核酸成分と複合体を形成する。複合体は、インビトロ又はエ

キソビボで形成されて細胞に導入されるか、又はRNAと接触されるか、又はインビボで形成され得る。目的の標的遺伝子座に関連するか又はそこにある配列の改変の誘導は、Cas13bエフェクタータンパク質-核酸ガイド下であり得る。好ましい実施形態において、1つの核酸成分は、CRISPR RNA (crRNA)である。好ましい実施形態において、1つの核酸成分は、成熟crRNA又はガイドRNAであり、ここで、成熟crRNA又はガイドRNAは、スパーサー配列（又はガイド配列）及びダイレトリピート配列又はこれらの誘導体を含む。好ましい実施形態において、スパーサー配列又はその誘導体は、シード配列を含み、ここで、シード配列は、標的遺伝子座における配列の認識及び／又はそれとのハイブリダイゼーションに決定的に重要である。

【0031】

本発明の態様は、1つ以上の天然に存在しない、又はエンジニアリングされた、又は改変された、又は最適化された核酸成分を有するCas13bエフェクタータンパク質複合体に関する。好ましい実施形態において、この複合体の核酸成分は、ダイレトリピート配列に連結されたガイド配列を含むことができ、ここで、ダイレトリピート配列は、1つ以上のステムループ又は最適化された二次構造を含む。一実施形態において、ダイレトリピート配列は、約36ヌクレオチド長であり得る。具体的な実施形態において、ダイレトリピートは、5'末端に3'末端のCAACと逆相補的なGTTG/GUUGを含む。特定の実施形態において、ダイレトリピートは、16nt、例えば少なくとも28ntの最小長さ及び単一のステムループを有する。更なる実施形態において、ダイレトリピートは、長さが16ntより長く、好ましくは17ntより長く、例えば少なくとも28ntであり、且つ2つ以上のステムループ又は最適化された二次構造を有する。詳細な実施形態において、ダイレトリピートは、25nt以上、例えば26nt、27nt、28nt以上及び1つ以上のステムループ構造を有する。好ましい実施形態において、ダイレトリピートは、1つ以上のタンパク質結合RNAアプタマーを含むように改変され得る。好ましい実施形態において、ダイレトリピートは、1つ以上のタンパク質結合RNAアプタマーを含むように改変され得る。好ましい実施形態において、1つ以上のアプタマーは、最適化された二次構造の一部として含まれ得る。かかるアプタマーは、バクテリオファージコートタンパク質との結合能を有し得る。バクテリオファージコートタンパク質は、Q β 、F2、GA、fr、JP501、MS2、M12、R17、BZ13、JP34、JP500、KU1、M11、MX1、TW18、VK、SP、FI、ID2、NL95、TW19、AP205、 ϕ Cb5、 ϕ Cb8r、 ϕ Cb12r、 ϕ Cb23r、7s及びPRR1を含む群から選択され得る。好ましい実施形態において、バクテリオファージコートタンパク質は、MS2である。本発明は、30以上、40以上又は50以上のヌクレオチド長である複合体の核酸成分も提供する。

【0032】

本発明は、一過性に発現するか又は導入されるCas13bエフェクタータンパク質、及び／又はガイド、及び／又はその複合体を含む細胞を含め、Cas13bエフェクタータンパク質、及び／又はガイド、及び／又は標的核酸とのその複合体を含む細胞を提供する。特定の実施形態において、この細胞は、限定はされないが、酵母細胞、植物細胞、哺乳類細胞、動物細胞又はヒト細胞を含めた真核細胞である。

【0033】

本発明は、目的の標的遺伝子座、詳細には真核細胞、組織、器官又は生物、より詳細には哺乳類細胞、組織、器官又は生物の目的の標的遺伝子座を改変する方法も提供し、この方法は、Cas13b遺伝子座エフェクタータンパク質と1つ以上の核酸成分とを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物を前記遺伝子座に送達することを含み、ここで、Cas13bエフェクタータンパク質は、1つ以上の核酸成分と複合体を形成し、前記複合体が目的の遺伝子座に結合すると、エフェクタータンパク質は、目的の標的遺伝子座の改変を誘導する。好ましい実施形態において、改変は、鎖切断の導入である。複合体は、インビトロ又はエキソビボで形成されて細胞に導入されるか、又はRNAと接触されるか、又はインビボで形成され得る。

【0034】

かかる方法において、目的の標的遺伝子座は、RNA分子内に含まれ得る。また、目的の標的遺伝子座は、DNA分子内及び特定の実施形態では転写されたDNA分子内に含まれ得る。かかる方法において、目的の標的遺伝子座は、インビトロで核酸分子に含まれ得る。

【0035】

かかる方法において、目的の標的遺伝子座は、細胞内、詳細には真核細胞、例えば哺乳類細胞又は植物細胞内の核酸分子に含まれ得る。哺乳類細胞は、非ヒト霊長類、ウシ、ブタ、げっ歯類又はマウス細胞であり得る。細胞は、家禽、魚類又はエビなどの非哺乳類真核細胞であり得る。植物細胞は、キャッサバ、トウモロコシ、モロコシ、コムギ又はコメなどの作物植物であり得る。植物細胞は、藻類、樹木又は野菜でもあり得る。本発明によって細胞に導入される改変は、抗体、デンプン、アルコール又は他の所望の細胞産出物などの生物学的産物の産生向上のため細胞及び細胞の子孫を変化させるようなものであり得る。本発明によって細胞に導入される改変は、産生される生物学的産物を変える変化が細胞及び細胞の子孫に含まれるようなものであり得る。

【0036】

哺乳類細胞は、非ヒト哺乳動物、例えば霊長類、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、げっ歯類、ウサギ科 (*Leporidae*)、例えばサル、雌ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ウサギ、ラット又はマウス細胞であり得る。細胞は、非哺乳類真核細胞、例えば家禽類のトリ (例えば、ニワトリ)、脊椎動物魚類 (例えば、サケ) 又は甲殻類 (例えば、カキ、ハマグリ、ロブスター、エビ) 細胞であり得る。細胞は、植物細胞でもあり得る。植物細胞は、単子葉植物又は双子葉植物のもの又は作物又は穀物植物のもの、例えばキャッサバ、トウモロコシ、モロコシ、ダイズ、コムギ、オートムギ又はコメであり得る。植物細胞は、藻類、樹木又は生産植物、果実又は野菜のもの (例えば、柑橘類の木、例えばオレンジ、グレープフルーツ又はレモンの木などの木；モモ又はネクタリンの木；リンゴ又はセイヨウナシの木；アーモンド又はクルミ又はピスタチオの木などの堅果類の木；ナス科植物；アブラナ属 (*Brassica*) の植物；アキノノゲシ属 (*Lactuca*) の植物；ホウレンソウ属 (*Spinacia*) の植物；トウガラシ属 (*Capsicum*) の植物；綿、タバコ、アスパラガス、ニンジン、キャベツ、ブロッコリー、カリフラワー、トマト、ナス、コショウ、レタス、ホウレンソウ、イチゴ、ブルーベリー、ラズベリー、ブラックベリー、ブドウ、コーヒー、ココア等) でもあり得る。

【0037】

本発明は、目的の標的遺伝子座を改変する方法を提供し、この方法は、VIB型CRISPR-Cas遺伝子座エフェクタータンパク質と1つ以上の核酸成分とを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物を前記遺伝子座に送達することを含み、ここで、エフェクタータンパク質は、1つ以上の核酸成分と複合体を形成し、前記複合体が目的の遺伝子座に結合すると、エフェクタータンパク質は、目的の標的遺伝子座の改変を誘導する。好ましい実施形態において、改変は、鎖切断の導入である。

【0038】

本発明は、目的の標的遺伝子座を改変する方法も提供し、この方法は、Cas13b遺伝子座エフェクタータンパク質と1つ以上の核酸成分とを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物を前記遺伝子座に送達することを含み、ここで、Cas13bエフェクタータンパク質は、1つ以上の核酸成分と複合体を形成し、前記複合体が目的の遺伝子座に結合すると、エフェクタータンパク質は、目的の標的遺伝子座の改変を誘導する。好ましい実施形態において、改変は、鎖切断の導入である。

【0039】

かかる方法において、目的の標的遺伝子座は、インビトロで核酸分子に含まれ得る。かかる方法において、目的の標的遺伝子座は、細胞内の核酸分子に含まれ得る。好ましくは、かかる方法において、目的の標的遺伝子座は、インビトロでRNA分子に含まれ得る。また好ましくは、かかる方法において、目的の標的遺伝子座は、細胞内のRNA分子に含

まれ得る。細胞は、原核細胞又は真核細胞であり得る。細胞は、哺乳類細胞であり得る。細胞は、げっ歯類細胞であり得る。細胞は、マウス細胞であり得る。

【0040】

記載される方法の任意のものにおいて、目的の標的遺伝子座は、目的のゲノム又はエピゲノム遺伝子座であり得る。記載される方法の任意のものにおいて、複合体は、多重化した使用向けに複数のガイドと共に送達され得る。記載される方法の任意のものにおいて、2つ以上のタンパク質が用いられ得る。

【0041】

本発明の更なる態様において、核酸成分は、CRISPR RNA (crRNA) 配列を含み得る。限定なしに、本出願人らは、かかる例において、pre-crRNAが、成熟crRNAを生じさせるプロセシング及びエフェクタータンパク質へのcrRNAのローディングに十分な二次構造を含み得ると仮定する。例として及び限定ではなく、かかる二次構造は、pre-crRNA内、より詳細にはダイレクトリピート内にあるステムループを含むか、それから本質的になるか、又はそれからなり得る。

【0042】

記載される方法の任意のものにおいて、エフェクタータンパク質及び核酸成分は、そのタンパク質及び／又は核酸成分をコードする1つ以上のポリヌクレオチド分子によって提供され得、ここで、1つ以上のポリヌクレオチド分子は、タンパク質及び／又は核酸成分を発現するように作動可能に構成されている。1つ以上のポリヌクレオチド分子は、タンパク質及び／又は核酸成分を発現するように作動可能に構成された1つ以上の調節エレメントを含み得る。1つ以上のポリヌクレオチド分子は、1つ以上のベクター内に含まれ得る。記載される方法のいずれにおいても、目的の標的遺伝子座は、目的のゲノム又はエピゲノム遺伝子座であり得る。記載される方法のいずれにおいても、複合体は、多重化用途のため複数のガイドを伴って送達され得る。記載される方法のいずれにおいても、2つ以上のタンパク質が用いられ得る。

【0043】

調節エレメントは、誘導性プロモーターを含み得る。ポリヌクレオチド及び／又はベクター系は、誘導性系を含み得る。

【0044】

記載される方法の任意のものにおいて、1つ以上のポリヌクレオチド分子が送達系に含まれ得るか、又は1つ以上のベクターが送達系に含まれ得る。

【0045】

記載される方法の任意のものにおいて、天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物は、リボソーム、ナノ粒子を含む粒子、エキソソーム、微小胞、遺伝子銃又は1つ以上のウイルスベクターによって送達され得る。

【0046】

本発明は、本明細書で考察するとおりの特徴を有するか又は本明細書に記載される方法のいずれかに定義される組成物である天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物も提供する。

【0047】

特定の実施形態において、従って、本発明は、特に目的の標的遺伝子座を改変する能力を有するか又は改変するように構成されている組成物など、天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物を提供し、前記組成物は、VI-B型CRISPR-Cas遺伝子座エフェクタータンパク質と1つ以上の核酸成分とを含み、ここで、エフェクタータンパク質は、1つ以上の核酸成分と複合体を形成し、前記複合体が目的の遺伝子座に結合すると、エフェクタータンパク質は、目的の標的遺伝子座の改変を誘導する。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、Cas13b遺伝子座エフェクタータンパク質であり得る。

【0048】

本発明は、更なる態様において、特に目的の標的遺伝子座を改変する能力を有するか又

10

20

30

40

50

は改変するように構成されている組成物など、天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物も提供し、前記組成物は、(a) ガイドRNA分子(又は多重化のためなどのガイドRNA分子の組み合わせ、例えば第1のガイドRNA分子及び第2のガイドRNA分子)又はガイドRNA分子をコードする核酸(又はガイドRNA分子の組み合わせをコードする1つ以上の核酸)、(b) VI-B型CRISPR-Cas遺伝子座エフェクタータンパク質又はVI-B型CRISPR-Cas遺伝子座エフェクタータンパク質をコードする核酸を含む。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、Cas13b遺伝子座エフェクタータンパク質であり得る。

【0049】

本発明は、更なる態様において、(a) ガイドRNA分子(又はガイドRNA分子の組み合わせ、例えば第1のガイドRNA分子及び第2のガイドRNA分子)又はガイドRNA分子をコードする核酸(又はガイドRNA分子の組み合わせをコードする1つ以上の核酸)、(b) Cas13b遺伝子座エフェクタータンパク質を含む、天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物も提供する。

【0050】

本発明は、1つ以上のベクターを含むベクター系も提供し、この1つ以上のベクターは、本明細書に記載される方法に定義されるとおりの特徴を有する組成物である天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物の構成成分をコードする1つ以上のポリヌクレオチド分子を含む。

【0051】

本発明は、1つ以上のベクター又は1つ以上のポリヌクレオチド分子を含む送達系も提供し、この1つ以上のベクター又はポリヌクレオチド分子は、本明細書で考察するとおりの特徴を有するか又は本明細書に記載される方法のいずれかに定義される組成物である天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物の構成成分をコードする1つ以上のポリヌクレオチド分子を含む。

【0052】

本発明は、療法的治療方法に用いられる、天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、又は前記組成物の構成成分をコードする1つ以上のポリヌクレオチド、又は前記組成物の構成成分をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含むベクター若しくは送達系も提供する。療法的治療方法には、遺伝子若しくはトランスクリプトーム編集又は遺伝子療法が含まれ得る。

【0053】

本発明は、エフェクタータンパク質の1つ以上のアミノ酸残基が改変され得る方法及び組成物、例えばエンジニアリングされた又は天然に存在しないエフェクタータンパク質又はCas13bも提供する。ある実施形態において、改変は、エフェクタータンパク質の1つ以上のアミノ酸残基の突然変異を含み得る。1つ以上の突然変異は、エフェクタータンパク質の1つ以上の触媒活性ドメインにあり得る。このエフェクタータンパク質は、前記1つ以上の突然変異を欠くエフェクタータンパク質と比較してヌクレアーゼ活性が低下又は消失し得る。このエフェクタータンパク質は、目的の標的遺伝子座におけるRNA鎖の切断を誘導しないことがあり得る。好ましい実施形態において、1つ以上の突然変異は、2つの突然変異を含み得る。好ましい実施形態において、Cas13bエフェクタータンパク質、例えばエンジニアリングされた又は天然に存在しないエフェクタータンパク質又はCas13bにおいて1つ以上のアミノ酸残基が改変される。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、以下の突然変異：R116A、H121A、R1177A、H1182Aの1つ以上(ここで、アミノ酸位置は、バージイェラ・ズーヘルカム(Bergeyella zoohelcum) ATCC 43767に由来するCas13bタンパク質のアミノ酸位置に対応する)、例えばR116A、H121A、R1177A及びH1182A、R116A、H121A及びR1177A、R116A、H121A及びH1182A、R116A、R1177A及びH1182A、H121A、R1177A及びH1182A、R116A及びH121A、R116A及びR1177A、

R 1 1 6 A 及び H 1 1 8 2 A、H 1 2 1 A 及び R 1 1 7 7 A、H 1 2 1 A 及び H 1 1 8 2 A、R 1 1 7 7 A 及び H 1 1 8 2 A、R 1 1 6 A、H 1 2 1 A、R 1 1 7 7 A、H 1 1 8 2 A を含む。当業者は、異なる C a s 1 3 b タンパク質における対応するアミノ酸位置を同じ効果となるように突然変異させ得ることを理解するであろう。特定の実施形態において、突然変異 R 1 1 6 A、H 1 2 1 A、R 1 1 7 7 A、H 1 1 8 2 A の 1 つ以上、例えば R 1 1 6 A、H 1 2 1 A、R 1 1 7 7 A 及び H 1 1 8 2 A、R 1 1 6 A、H 1 2 1 A 及び R 1 1 7 7 A、R 1 1 6 A、H 1 2 1 A 及び H 1 1 8 2 A、R 1 1 6 A、R 1 1 7 7 A 及び H 1 1 8 2 A、H 1 2 1 A、R 1 1 7 7 A 及び H 1 1 8 2 A、R 1 1 6 A 及び H 1 2 1 A、R 1 1 6 A 及び R 1 1 7 7 A、R 1 1 6 A 及び H 1 1 8 2 A、H 1 2 1 A 及び R 1 1 7 7 A、H 1 2 1 A 及び H 1 1 8 2 A、R 1 1 7 7 A 及び H 1 1 8 2 A、R 1 1 6 A、H 1 2 1 A、R 1 1 7 7 A、H 1 1 8 2 A は、タンパク質の触媒活性を完全に又は部分的に消失させる（例えば、切断速度の変化、特異性の変化等）。特定の実施形態において、ここで、アミノ酸位置は、プレボテラ属種（*Prevotella* sp.）P 5-125 に由来する C a s 1 3 b タンパク質のアミノ酸位置に対応し、エフェクタータンパク質は、H 1 3 3 A 及び H 1 0 5 8 A 突然変異を含む。特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりのエフェクタータンパク質は、デッド C a s 1 3 b エフェクタータンパク質（即ち d C a s 1 3 b）など、「デッド」エフェクタータンパク質である。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、H E P N ドメイン 1 に 1 つ以上の突然変異を有する。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、H E P N ドメイン 2 に 1 つ以上の突然変異を有する。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、H E P N ドメイン 1 及び H E P N ドメイン 2 に 1 つ以上の突然変異を有する。エフェクタータンパク質は、1 つ以上の異種機能ドメインを含み得る。1 つ以上の異種機能ドメインは、1 つ以上の核局在化シグナル（N L S）ドメインを含み得る。1 つ以上の異種機能ドメインは、少なくとも 2 つ以上の N L S ドメインを含み得る。1 つ以上の N L S ドメインは、エフェクタータンパク質（例えば、C a s 1 3 b エフェクタータンパク質）の末端に、又はその近傍に、又はそれに近接して位置し得、及び 2 つ以上の N L S の場合、それらの 2 つの各々は、エフェクタータンパク質（例えば、C a s 1 3 b エフェクタータンパク質）の末端に、又はその近傍に、又はそれに近接して位置し得る。1 つ以上の異種機能ドメインは、1 つ以上の転写活性化ドメインを含み得る。好ましい実施形態において、転写活性化ドメインは、V P 6 4 を含み得る。1 つ以上の異種機能ドメインは、1 つ以上の転写抑制ドメインを含み得る。好ましい実施形態において、転写抑制ドメインは、K R A B ドメイン又は S I D ドメイン（例えば、S I D 4 X）を含み得る。1 つ以上の異種機能ドメインは、1 つ以上のヌクレアーゼドメインを含み得る。好ましい実施形態において、ヌクレアーゼドメインは、F o k 1 を含む。

【0054】

本発明は、1 つ以上の異種機能ドメインが以下の活性：メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、翻訳活性化活性、翻訳抑制活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写終結因子活性、ヒストン修飾活性、ヌクレアーゼ活性、一本鎖 R N A 切断活性、二本鎖 R N A 切断活性、一本鎖 D N A 切断活性、二本鎖 D N A 切断活性及び核酸結合活性の 1 つ以上を有することも提供する。少なくとも 1 つ以上の異種機能ドメインは、エフェクタータンパク質のアミノ末端又はその近傍にあり得、及び／又は少なくとも 1 つ以上の異種機能ドメインは、エフェクタータンパク質のカルボキシ末端又はその近傍にある。1 つ以上の異種機能ドメインは、エフェクタータンパク質に融合され得る。1 つ以上の異種機能ドメインは、エフェクタータンパク質にテザー係留され得る。1 つ以上の異種機能ドメインは、リンカー部分によってエフェクタータンパク質に連結され得る。

【0055】

本発明の特定の実施形態において、1 つ以上の異種機能ドメインは、エピトープタグ又はレポーターを含み得る。エピトープタグの非限定的な例としては、ヒスチジン（H i s）タグ、V 5 タグ、F L A G タグ、インフルエンザヘマグルチニン（H A）タグ、M y c タグ、V S V-G タグ及びチオレドキシニン（T r x）タグが挙げられる。レポーターの例

としては、限定はされないが、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、HcRed、DsRed、シアン蛍光タンパク質 (CFP)、黄色蛍光タンパク質 (YFP) 及び自己蛍光タンパク質、例えば青色蛍光タンパク質 (BFP) が挙げられる。

【0056】

本発明は、ポルフィロモナス属 (*Porphyromonas*)、プレボテラ属 (*Prevotella*)、バクテロイデス属 (*Bacteroides*)、リエメラ属 (*Riemerella*)、バージイエラ属 (*Bergeyella*)、アリストイペス属 (*Alistipes*)、ミロイデス属 (*Myroides*)、キャプノサイトファーガ属 (*Capnocytophaga*) 及びフラボバクテリウム属 (*Flavobacterium*) からなる群から選択される原核生物属の野生型 Cas13b エフェクタータンパク質と少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれを超えて相同又は同一のエフェクタータンパク質を含むエフェクタータンパク質も提供する。本発明は、ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*)、プレボテラ属種 (*Prevotella* sp.)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*)、バクテロイデス・ピオゲネス (*Bacteroides pyogenes*)、リエメラ・アナティペステイファー (*Riemerella anatipestifer*)、バージイエラ・ズーヘルカム (*Bergeyella zoohelcum*)、プレボテラ・インターメディア (*Prevotella intermedia*)、プレボテラ・ブッカエ (*Prevotella buccae*)、アリストイペス属種 (*Alistipes* sp.)、プレボテラ・アウランティアカ (*Prevotella aurantiaca*)、ミロイデス・オドラティミマス (*Myroides odoratimimus*)、キャプノサイトファーガ・カニモルサス (*Capnocytophaga canimorsus*)、フラボバクテリウム・ブランキオフィラム (*Flavobacterium branchiophilum*) 及びフラボバクテリウム・コルムナレ (*Flavobacterium columnare*) からなる群から選択される原核生物種の野生型 Cas13b エフェクタータンパク質と少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれを超えて相同又は同一のエフェクタータンパク質を含むエフェクタータンパク質を更に提供する。本発明は、加えて、ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*) Cas13b (受託番号 WP__039434803)、プレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5-125 Cas13b (受託番号 WP__044065294)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) Cas13b (受託番号 WP__053444417)、ポルフィロモナス属種 (*Porphyromonas* sp.) COT-052 OH4946 Cas13b (受託番号 WP__039428968)、バクテロイデス・ピオゲネス (*Bacteroides pyogenes*) Cas13b (受託番号 WP__034542281)、リエメラ・アナティペステイファー (*Riemerella anatipestifer*) Cas13b (受託番号 WP__004919755) からなる群から選択される野生型 Cas13b エフェクタータンパク質と少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれを超えて相同又は同一のエフェクタータンパク質を含むエフェクタータンパク質を提供する。最も好ましいエフェクタータンパク質は、ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*) Cas13b (受託番号 WP__039434803)、プレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5-125 Cas13b (受託番号 WP__044065294)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromona*

s g i n g i v a l i s) C a s 1 3 b (受託番号WP_053444417)、ポルフィロモナス属種 (P o r p h y r o m o n a s s p.) C O T - 0 5 2 O H 4 9 4 6 C a s 1 3 b (受託番号WP_039428968) からなる群から選択される野生型 C a s 1 3 b エフェクタータンパク質と少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれを超えて相同又は同一のものであり、及び最も特別に好ましいのは、野生型ポルフィロモナス・グラエ (P o r p h y r o m o n a s g u l a e) C a s 1 3 b (受託番号WP_039434803) 又はプレボテラ属種 (P r e v o t e l l a s p.) P 5 - 1 2 5 C a s 1 3 b (受託番号WP_044065294) と少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれを超えて相同又は同一のものである。エフェクタータンパク質は、第1のエフェクタータンパク質オルソログからの第1の断片と、第2のエフェクタータンパク質オルソログからの第2の断片とを含むキメラエフェクタータンパク質を含み得、ここで、第1及び第2のエフェクタータンパク質オルソログは、異なる。

10

【0057】

特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、少なくとも 700 アミノ酸長であり得る。好ましい実施形態において、エフェクタータンパク質は、約 900 ～ 約 1500 アミノ酸長、例えば約 900 ～ 約 1000 アミノ酸長、約 1000 ～ 約 1100 アミノ酸長、約 1100 ～ 約 1200 アミノ酸長、又は約 1200 ～ 約 1300 アミノ酸長、又は約 1300 ～ 約 1400 アミノ酸長、又は約 1400 ～ 約 1500 アミノ酸長、例えば約 900、約 1000、約 1100、約 1200、約 1300、約 1400、約 1500、約 1600、約 1700 又は約 1800 アミノ酸長であり得る。

20

【0058】

一部の実施形態において、C a s 1 3 b エフェクタータンパク質は、(a) 900 ～ 1800 アミノ酸及び2つの H E P N ドメインを含み、(b) 原核生物ゲノムにおいて C R I S P R アレイの上流又は下流 10 k b 以内に天然に存在し、(c) C R I S P R アレイの上流又は下流 10 k b 以内に 700 アミノ酸超を含む唯一のタンパク質であり、及び/又は (d) C R I S P R アレイの上流又は下流 10 k b 以内に C a s 1 遺伝子又は C a s 2 遺伝子がない。一部の実施形態において、C s x 2 7 又は C s x 2 8 も C R I S P R アレイの上流又は下流 10 k b 以内に存在する。

30

【0059】

特定の実施形態において、エフェクタータンパク質、特に V I - B 型遺伝子座エフェクタータンパク質、より詳細には C a s 1 3 b は、少なくとも 1 つ及び好ましくは少なくとも 2 つ、例えばより好ましくは正確に 2 つの保存された R x x x x H モチーフを含む。触媒 R x x x x H モチーフは、H E P N (高等真核生物及び原核生物ヌクレオチド結合) ドメインに特有である。従って、特定の実施形態において、エフェクタータンパク質は、少なくとも 1 つ及び好ましくは少なくとも 2 つ、例えばより好ましくは正確に 2 つの H E P N ドメインを含む。特定の実施形態において、H E P N ドメインは、R N アーゼ活性を有し得る。他の実施形態において、H E P N ドメインは、D N アーゼ活性を有し得る。

40

【0060】

特定の実施形態において、本明細書で意図されたとおりの C a s 1 3 b エフェクタータンパク質は、30 ～ 40 b p 長、より典型的には 34 ～ 38 b p 長、更により典型的には 36 ～ 37 b p 長、例えば 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 又は 40 b p 長の短鎖 C R I S P R リピートを含む遺伝子座に関連し得る。特定の実施形態において、C R I S P R リピートは、80 ～ 350 b p 長、例えば 80 ～ 200 b p 長、更により典型的には 86 ～ 88 b p 長、例えば 80、81、82、83、84、85、86、87、88、89 又は 90 b p 長の長鎖又は二重リピートである。

【0061】

特定の実施形態では、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) 又は P A M 様モチーフ

50

は、本明細書に開示されるとおりのエフェクタータンパク質（例えば、Cas13bエフェクタータンパク質）複合体による目的の標的遺伝子座への結合を導く。PAMは、PFS又はプロトスペーサー隣接部位と称されることもある。一部の実施形態において、PAMは、5' PAMであり得る（即ちプロトスペーサーの5'末端の上流に位置する）。他の実施形態において、PAMは、3' PAMであり得る（即ちプロトスペーサーの5'末端の下流に位置する）。他の実施形態において、5' PAM及び3' PAMの両方が必要である。本発明の特定の実施形態において、エフェクタータンパク質（例えば、Cas13bエフェクタータンパク質）の結合を導くのにPAM又はPAM様モチーフが必要でないこともある。特定の実施形態において、5' PAMは、D（即ちA、G又はU）である。特定の実施形態において、VIB1型エフェクターについて、5' PAMは、Dである。実施例1、表2を参照されたい。所与のCas13b系についてコンセンサス5'及び3' PAMを決定する方法が存在する。本発明の特定の実施形態において、リピート配列における切断により、5'末端に短鎖ヌクレオチド（例えば、5、6、7、8、9又は10 nt又はそれが二重リピートの場合にはそれを超える）リピート配列（これは、crRNA「タグ」と称され得る）及び3'末端にリピートの残りの部分が隣接する完全スペーサー配列を含むcrRNA（例えば、短鎖又は長鎖crRNA）が生じ得る。特定の実施形態において、本明細書に記載されるエフェクタータンパク質によるターゲティングには、crRNAタグと標的5'隣接配列との間に相天性がないことが必要であり得る。この要件は、Samai et al. “Co-transcriptional DNA and RNA Cleavage during Type III CRISPR-Cas Immunity” Cell 161, 1164-1174, May 21, 2015に更に記載されているものと同様であり得、ここで、要件は、侵入核酸上の本当の標的をCRISPRアレイ自体との間で区別すると考えられ、ここで、リピート配列の存在がcrRNAタグとの完全な相天性につながり、自己免疫を防ぐことになる。

【0062】

特定の実施形態において、Cas13bエフェクタータンパク質は、エンジニアリングされ、ヌクレアーゼ活性を低下又は消失させることによりRNA干渉活性を低下又は消失させる1つ以上の突然変異を含むことができる。突然変異は、隣接残基、例えばヌクレアーゼ活性に関与するものの近傍にあるアミノ酸にも作られ得る。一部の実施形態では、1つ以上の推定触媒ヌクレアーゼドメインが不活性化され、エフェクタータンパク質複合体が切断活性及びRNA結合複合体としての機能を欠く。好ましい実施形態では、得られたRNA結合複合体は、本明細書に記載されるとおりの1つ以上の機能ドメインと連結され得る。

【0063】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの本発明に係るエフェクタータンパク質（CRISPR酵素、Cas13、エフェクタータンパク質）は、触媒不活性又はデッドCas13エフェクタータンパク質（dCas13）である。一部の実施形態において、dCas13エフェクターは、ヌクレアーゼドメインに突然変異を含む。一部の実施形態において、dCas13エフェクタータンパク質は、トランケートされている。一部の実施形態において、Cas13bエフェクターと1つ以上の機能ドメインとの融合タンパク質のサイズを低減するため、そのRNA結合機能をなおも維持しつつ、Cas13bエフェクターのC末端をトランケートすることができる。例えば、少なくとも20アミノ酸、少なくとも50アミノ酸、少なくとも80アミノ酸、又は少なくとも100アミノ酸、又は少なくとも150アミノ酸、又は少なくとも200アミノ酸、又は少なくとも250アミノ酸、又は少なくとも300アミノ酸、又は少なくとも350アミノ酸、又は最大120アミノ酸、又は最大140アミノ酸、又は最大160アミノ酸、又は最大180アミノ酸、又は最大200アミノ酸、又は最大250アミノ酸、又は最大300アミノ酸、又は最大350アミノ酸、又は最大400アミノ酸がCas13bエフェクターのC末端でトランケートされ得る。Cas13bトランケーションの具体的な例としては、C末端Δ984~1090、C末端Δ1026~1090及びC末端Δ1053~1090

、C末端 $\Delta 934 \sim 1090$ 、C末端 $\Delta 884 \sim 1090$ 、C末端 $\Delta 834 \sim 1090$ 、C末端 $\Delta 784 \sim 1090$ 及びC末端 $\Delta 734 \sim 1090$ （ここで、アミノ酸位置は、プレボテラ属種（*Prevotella* sp.）P5-125 Cas13bタンパク質のアミノ酸位置に対応する）が挙げられる。図15Bを参照されたい。

【0064】

特定の実施形態において、1つ以上の機能ドメインは、制御可能、即ち誘導可能である。

【0065】

本発明の特定の実施形態において、ガイドRNA又は成熟crRNAは、ダイレクトリピート配列及びガイド配列又はスパーサー配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。特定の実施形態において、ガイドRNA又は成熟crRNAは、ガイド配列又はスパーサー配列に連結されたダイレクトリピート配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。本発明の好ましい実施形態において、成熟crRNAは、ステムループ、又は最適化ステムループ構造、又は最適化二次構造を含む。好ましい実施形態において、成熟crRNAは、ダイレクトリピート配列中にステムループ又は最適化ステムループ構造を含み、ここで、ステムループ又は最適化ステムループ構造は、切断活性に重要である。特定の実施形態において、成熟crRNAは、好ましくは、単一のステムループを含む。特定の実施形態において、ダイレクトリピート配列は、好ましくは、単一のステムループを含む。特定の実施形態において、エフェクタータンパク質複合体の切断活性は、ステムループRNA二重鎖構造に影響を及ぼす突然変異を導入することによって改変される。好ましい実施形態において、ステムループのRNA二重鎖を維持する突然変異が導入され得、それによってエフェクタータンパク質複合体の切断活性が維持される。他の好ましい実施形態において、ステムループのRNA二重鎖構造を破壊する突然変異が導入され得、それによってエフェクタータンパク質複合体の切断活性が完全に無効にされる。

【0066】

本発明は、本明細書に記載される方法又は組成物のいずれかにおける真核生物又は真核細胞での発現にコドン最適化されたエフェクタータンパク質をコードするヌクレオチド配列も提供する。本発明のある実施形態において、コドン最適化されたエフェクタータンパク質をコードするヌクレオチド配列は、本明細書で考察されるいずれかのCas13bをコードし、真核細胞又は生物、例えば本明細書の他の部分で挙げるような細胞又は生物、例えば、限定なしに、酵母細胞又は哺乳類細胞又は生物、例えばマウス細胞、ラット細胞及びヒト細胞又は非ヒト真核生物、例えば植物における作動性に関してコドン最適化される。

【0067】

本発明の特定の実施形態において、Cas13bエフェクタータンパク質をコードする核酸配列に少なくとも1つの核局在化シグナル（NLS）が付加される。好ましい実施形態において、少なくとも1つ以上のC末端又はN末端NLSが付加される（従って、Cas13bエフェクタータンパク質をコードする核酸分子がNLSのコーディングを含むことができ、そのため、発現した産物にはNLSが付加又は接続されていることになる）。本発明の特定の実施形態において、Cas13bエフェクタータンパク質をコードする核酸配列に少なくとも1つの核外移行シグナル（NES）が付加される。好ましい実施形態では、少なくとも1つ以上のC末端又はN末端NESが付加される（従って、Cas13bエフェクタータンパク質をコードする核酸分子がNESのコーディングを含むことができ、発現産物が付加又は接続されたNESを有することになる）。好ましい実施形態では、真核細胞、好ましくはヒト細胞における最適発現及び核ターゲティングのため、C末端及び／又はN末端NLS又はNESが付加される。好ましい実施形態において、コドン最適化エフェクタータンパク質は、Cas13bであり、ガイドRNAのスパーサー長さは、15～35 ntである。特定の実施形態において、ガイドRNAのスパーサー長さは、少なくとも16ヌクレオチド、例えば少なくとも17ヌクレオチド、好ましくは少なくと

も18nt、例えば好ましくは少なくとも19nt、少なくとも20nt、少なくとも21nt又は少なくとも22ntである。特定の実施形態において、スパーサー長さは、15～17nt、17～20nt、20～24nt、例えば20、21、22、23又は24nt、23～25nt、例えば23、24又は25nt、24～27nt、27～30nt、30～35nt若しくは35nt又はそれを超える。本発明の特定の実施形態において、コドン最適化エフェクタータンパク質は、Cas13bであり、ガイドRNAのダイレクトリピート長さは、少なくとも16ヌクレオチドである。特定の実施形態において、コドン最適化エフェクタータンパク質は、Cas13bであり、ガイドRNAのダイレクトリピート長さは、16～20nt、例えば16、17、18、19又は20ヌクレオチドである。特定の好ましい実施形態において、ガイドRNAのダイレクトリピート長さは、19ヌクレオチドである。

10

【0068】

本発明は、複数の核酸成分を送達する方法も包含し、ここで、各核酸成分は、異なる目的の標的遺伝子座に特異的であり、それにより複数の目的の標的遺伝子座を改変する。複合体の核酸成分は、1つ以上のタンパク質結合RNAアプタマーを含み得る。1つ以上のアプタマーは、バクテリオファージコートタンパク質との結合能を有し得る。バクテリオファージコートタンパク質は、Qβ、F2、GA、fr、JP501、MS2、M12、R17、BZ13、JP34、JP500、KU1、M11、MX1、TW18、VK、SP、FI、ID2、NL95、TW19、AP205、φCb5、φCb8r、φCb12r、φCb23r、7s及びPRR1を含む群から選択され得る。好ましい実施形態において、バクテリオファージコートタンパク質は、MS2である。本発明は、30以上、40以上又は50以上のヌクレオチド長である複合体の核酸成分も提供する。

20

【0069】

更なる態様において、本発明は、改変された目的の標的遺伝子座を含む真核細胞を提供し、ここで、目的の標的遺伝子座は、本明細書に記載される方法のいずれかによって改変される。更なる態様は、前記細胞の細胞株を提供する。別の態様は、1つ以上の前記細胞を含む多細胞生物を提供する。

【0070】

特定の実施形態において、目的の標的遺伝子座の改変は、少なくとも1つの遺伝子産物の発現の変化を含む真核細胞、少なくとも1つの遺伝子産物の発現の変化を含む真核細胞であって、少なくとも1つの遺伝子産物の発現は、増加される、真核細胞、少なくとも1つの遺伝子産物の発現の変化を含む真核細胞であって、少なくとも1つの遺伝子産物の発現は、減少される、真核細胞又は編集されたゲノムを含む真核細胞をもたらし得る。

30

【0071】

特定の実施形態において、真核細胞は、哺乳類細胞又はヒト細胞であり得る。

【0072】

更なる実施形態において、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系は、部位特異的遺伝子ノックアウト、部位特異的ゲノム編集、RNA配列特異的干渉又は多重ゲノムエンジニアリングに用いられ得る。

40

【0073】

また、本明細書に記載されるとおりの細胞、細胞株又は生物からの遺伝子産物も提供される。特定の実施形態において、発現する遺伝子産物の量は、発現の変化又は編集されたゲノムを有しない細胞からの遺伝子産物の量より多いか又は少ないこともある。特定の実施形態において、遺伝子産物は、発現の変化又は編集されたゲノムを有しない細胞からの遺伝子産物と比較して変化したものであり得る。

【0074】

また、(i)本明細書に記載されるとおりのCas13bエフェクタータンパク質、又は(ii)Cas13bエフェクタータンパク質とCRISPR-Cas複合体を形成する能力を有するガイドRNAの少なくとも一方を含む、エンジニアリングされた及び天然

50

に存在しない真核細胞も提供される。一部の実施形態において、(i) 及び／又は(ii) は、細胞において一過性に発現するか又は導入される。また、かかる細胞を含む生物、細胞株、前記細胞株又は生物の子孫も提供される。生物は、脊椎動物、例えば哺乳類であり得る。代わりに、生物は、植物又は真菌であり得る。

【0075】

更なる態様において、本発明は、改変された目的の標的遺伝子座の生成を確実にする、本明細書に記載されるCRISPR系をコードするヌクレオチド配列を含む真核細胞を提供し、ここで、目的の標的遺伝子座は、本明細書に記載される方法のいずれかによって改変される。更なる態様は、前記細胞の細胞株を提供する。別の態様は、1つ以上の前記細胞を含む多細胞生物を提供する。

10

【0076】

特定の実施形態において、目的の標的遺伝子座の改変は、少なくとも1つの遺伝子産物の(タンパク質)発現の変化を含む真核細胞、少なくとも1つの遺伝子産物の(タンパク質)発現の変化を含む真核細胞であって、少なくとも1つの遺伝子産物の(タンパク質)発現は、増加される、真核細胞、少なくとも1つの遺伝子産物の(タンパク質)発現の変化を含む真核細胞であって、少なくとも1つの遺伝子産物の(タンパク質)発現は、減少される、真核細胞又は編集されたトランスクリプトームを含む真核細胞をもたらし得る。

【0077】

特定の実施形態において、真核細胞は、哺乳類細胞又はヒト細胞であり得る。

【0078】

更なる実施形態において、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系は、発現(アイソフォーム特異的発現を含む)、安定性、局在、機能性(例えば、リボソームRNA又はmiRNA)等のRNA配列特異的干渉、RNA配列特異的改変又はかかるプロセスの多重化に使用され得る。

20

【0079】

更なる実施形態において、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系は、生体試料などの試料中のRNA検出及び／又は定量化に使用され得る。特定の実施形態において、RNA検出は、細胞におけるものである。ある実施形態において、本発明は、試料中の標的RNAを検出する方法を提供し、この方法は、(a) 試料を、i) RNAを切断する能力を有するVI-B型CRISPR-Casエフェクタータンパク質、ii) 標的RNAにハイブリダイズする能力を有するガイドRNA、及びiii) エフェクタータンパク質によって非特異的且つ検出可能に切断される能力を有するRNAベースの切断誘導可能レポーターと共にインキュベートすること、(b) 前記RNAベースの切断誘導可能レポーターの切断によって生成されるシグナルに基づいて前記標的RNAを検出することを含む。

30

【0080】

ある実施形態において、VI-B型CRISPR-Casエフェクタータンパク質は、Cas13bエフェクタータンパク質、例えば本明細書に記載されるとおりのCas13bエフェクタータンパク質である。ある実施形態において、RNAベースの切断誘導可能レポーター構築物は、蛍光色素及び消光剤を含む。特定の実施形態において、試料は、無細胞生体試料を含む。他の実施形態において、試料は、細胞試料、例えば、限定なしに植物細胞又は動物細胞を含む。本発明のある実施形態において、標的RNAは、限定はされないが、ウイルス、細菌、真菌又は寄生虫からの標的RNAを含め、病原体RNAを含む。ある実施形態において、ガイドRNAは、一塩基変異多型を含む標的RNA又はRNA転写物のスプライス変異体を検出するように設計される。ある実施形態において、ガイドRNAは、標的RNAとの1つ以上のミスマッチヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、ガイドRNAは、限定はされないが、癌又は免疫疾患など、疾患状態の診断指標となる標的分子にハイブリダイズする。

40

【0081】

本発明は、a) RNAを切断する能力を有するVI-B型CRISPR-Casエフェ

50

クタータンパク質、b) 標的RNAに結合する能力を有するガイドRNA、及びc) エフェクタータンパク質によって非特異的且つ検出可能に切断される能力を有するRNAベースの切断誘導可能レポーターを含むリボ核酸(RNA)検出系を提供する。更に、本発明は、a) RNAを切断する能力を有するVI-B型CRISPR-Casエフェクタータンパク質、及びb) エフェクタータンパク質によって非特異的且つ検出可能に切断される能力を有するRNAベースの切断誘導可能レポーターを含むRNA検出用キットを提供する。特定の実施形態において、RNAベースの切断誘導可能レポーター構築物は、蛍光色素及び消光剤を含む。

【0082】

更なる実施形態において、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系は、疾患モデル及び／又はスクリーニング系の作成に用いられ得る。

【0083】

更なる実施形態において、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系は、部位特異的トランスクリプトーム編集又は摂動、核酸配列特異的干渉又は多重ゲノムエンジニアリングに用いられ得る。

【0084】

本発明の態様では、本明細書に記載されるCas13bエフェクタータンパク質又は系は、哺乳類対象におけるウイルス発病、感染又は伝播の治療、防御、予防又は抑制に使用され得る。本発明の態様は、対象におけるウイルス発病、感染及び／又は伝播の治療、防御、抑制及び／又は改善における使用のための、(a) Cas13b CRISPRエフェクタータンパク質及び／又はCas13b CRISPRエフェクタータンパク質をコードするポリ核酸、及び(b) ウイルスの1つ以上の標的分子に結合するように設計された1つ以上のガイドRNA及び／又は1つ以上のガイドRNAをコードする1つ以上のポリ核酸を含むCas13b CRISPR系を提供する。Cas13bエフェクタータンパク質は、好ましい野生型Cas13bタンパク質並びにその好ましい誘導體及び改変体に関するものを含め、本明細書に定義されるとおりであり得る。

【0085】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCas13bエフェクタータンパク質又は系は、哺乳類対象におけるラッサウイルス発病、感染又は伝播の治療、防御、予防又は抑制に使用され得る。ラッサウイルスは、DC及び血管内皮細胞に関連する(Kunz, S. et. al. 2005. Journal of Virologyを参照されたい)。

【0086】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCas13bエフェクタータンパク質又は系は、哺乳類対象におけるエボラウイルス発病、感染又は伝播の治療、防御、予防又は抑制に使用され得る。エボラウイルスは、DC、マクロファージ、ヘパトサイト等を含めた多くの組織及び細胞型に関連する(Martines, R. B. et. al. 2015. Journal of Pathologyを参照されたい)。

【0087】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCas13bエフェクタータンパク質又は系は、哺乳類対象におけるSARS-CoV発病、感染又は伝播の治療、防御、予防又は抑制に使用され得る。SARS-CoVは、肺組織及び細胞に関連する(To, KF. et. al. 2004. Journal of Pathologyを参照されたい)。

【0088】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCas13bエフェクタータンパク質又は系は、哺乳類対象におけるジカウイルス発病、感染又は伝播の治療、防御、予防又は抑制に使用され得る。ジカウイルスは、体液、胎盤、脳等を含め、多くの組織及び細胞型に関連する(Miner, J. J. & Diamond, M. S. 2017. Cell H

10

20

30

40

50

ost & Microbeを参照されたい)。

【0089】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCas13bエフェクタータンパク質又は系は、哺乳類対象におけるデングウイルス発病、感染又は伝播の治療、防御、予防又は抑制に使用され得る。デングウイルスは、DC、マクロファージ、肝臓等を含めた多くの組織及び細胞型に関連する(Flipse, J. et. al. 2016. Journal of General Virologyを参照されたい)。

【0090】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCas13bエフェクタータンパク質又は系は、哺乳類対象におけるチクングニアウイルス発病、感染又は伝播の治療、防御、10 予防又は抑制に使用され得る。チクングニアウイルスは、免疫細胞、肝臓、中枢神経系等を含めた多くの組織及び細胞型に関連する(Schwartz, O. & Albert, M. L. 2010. Nature Reviewsを参照されたい)。

【0091】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCas13bエフェクタータンパク質又は系は、哺乳類対象におけるインフルエンザウイルス発病、感染又は伝播の治療、防御、10 予防又は抑制に使用され得る。インフルエンザウイルスは、肺上皮細胞及びマクロファージに関連する(Medina, R. A. & Garcia-Sastre A. 2011 Nature Reviewsを参照されたい)。

【0092】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCas13bエフェクタータンパク質又は系は、哺乳類対象におけるHIVウイルス発病、感染又は伝播の治療、防御、20 予防又は抑制に使用され得る。HIVウイルスは、T細胞及びマクロファージに関連する(Weiss, R. A. 2002. IUBMB Life. を参照されたい)。

【0093】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCas13bエフェクタータンパク質又は系は、哺乳類対象におけるロタウイルスのウイルス発病、感染又は伝播の治療、防御、20 予防又は抑制に使用され得る。ロタウイルスのウイルスは、腸組織及び細胞に関連する(Lopez, S & Arias, C. F. 2006. CTMIを参照されたい)。

【0094】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCas13bエフェクタータンパク質又は系は、哺乳類対象における単純ヘルペス(HSV-1)発病、感染又は伝播の治療、防御、30 予防又は抑制に使用され得る。HSV-1は、上皮細胞及び神経細胞に関連する(Schellhaas, M. et. al. 2003. Journal of General Virologyを参照されたい)。

【0095】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCas13bエフェクタータンパク質又は系は、哺乳類対象におけるHCV発病、感染又は伝播の治療、防御、40 予防又は抑制に使用され得る。HCVは、肝組織及び細胞に関連する(Ding, Q, et. al. 2014. Cell Host & Microbeを参照されたい)。

【0096】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるCas13bエフェクタータンパク質又は系は、哺乳類対象におけるHBV発病、感染又は伝播の治療、防御、50 予防又は抑制に使用され得る。HBVは、肝組織及び細胞に関連する(Schieck, A. et. al. 2013. Hepatologyを参照されたい)。

【0097】

また、本明細書に記載されるとおりの細胞、細胞株又は生物からの遺伝子産物も提供される。特定の実施形態において、発現する遺伝子産物の量は、発現の変化又は編集されたゲノムを有しない細胞からの遺伝子産物の量より多いか又は少ないこともある。特定の50 実施形態において、遺伝子産物は、発現の変化又は編集されたゲノムを有しない細胞からの

遺伝子産物と比較して変化したものであり得る。

【0098】

上記及び他の実施形態が開示されるか又は以下の詳細な説明から明らかであり、それに包含される。

【0099】

従って、本発明の目的は、本出願人らが権利を留保し、且つ任意の以前に公知の製品、プロセス又は方法のディスクレーマーを本明細書によって開示するような以前に公知のいかなる製品、製品の作製プロセス又は製品の使用方法も本発明の範囲内に包含しないことである。更に、本発明は、本出願人らが権利を留保し、且つ任意の以前に記載された製品、製品の作製プロセス又は製品の使用方法のディスクレーマーを本明細書によって開示する
10
ような、米国特許商標庁（USPTO）（米国特許法第112条第一段落）又は欧州特許庁（EPO）（EPC第83条）の明細書の記載及び実施可能要件を満たさないいかなる製品、製品の作製プロセス又は製品の使用方法も本発明の範囲内に包含しないように意図されることが注記される。本発明の実施では、第53条（c）EPC並びに規則28（b）及び（c）EPCに準拠することが有利であり得る。本明細書におけるいかなる事項も、見込みであると解釈されてはならない。

【0100】

本開示及び特に特許請求の範囲及び／又は段落において、「含む」、「含んだ」、「含んでいる」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し得る。例えば、これらは、「包含する」、「包含した」、「包含している」などを意味し得、及び「から
20
本質的になっている」及び「から本質的になる」などの用語は、米国特許法におけるそれらに帰される意味を有し、例えば、これらの用語は、明示的に記載されていない要素を許容するが、先行技術に見られる要素又は本発明の基本的な若しくは新規の特徴に影響を及ぼす要素を除外することが注記される。

【0101】

本発明の新規の特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に示される。本発明の原理が利用される例示的な実施形態を示す以下の詳細な説明及びその添付の図面を参照することにより、本発明の特徴及び利点の更なる理解が得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0102】

【図1-1】野生型Cas13bオルソログの一覧並びにそのアミノ酸配列を供給源生物及びタンパク質受託番号と共に示す。

【図1-2】野生型Cas13bオルソログの一覧並びにそのアミノ酸配列を供給源生物及びタンパク質受託番号と共に示す。

【図1-3】野生型Cas13bオルソログの一覧並びにそのアミノ酸配列を供給源生物及びタンパク質受託番号と共に示す。

【図1-4】野生型Cas13bオルソログの一覧並びにそのアミノ酸配列を供給源生物及びタンパク質受託番号と共に示す。

【図1-5】野生型Cas13bオルソログの一覧並びにそのアミノ酸配列を供給源生物及びタンパク質受託番号と共に示す。
40

【図1-6】野生型Cas13bオルソログの一覧並びにそのアミノ酸配列を供給源生物及びタンパク質受託番号と共に示す。

【図1-7】野生型Cas13bオルソログの一覧並びにそのアミノ酸配列を供給源生物及びタンパク質受託番号と共に示す。

【図1-8】野生型Cas13bオルソログの一覧並びにそのアミノ酸配列を供給源生物及びタンパク質受託番号と共に示す。

【図1-9】野生型Cas13bオルソログの一覧並びにそのアミノ酸配列を供給源生物及びタンパク質受託番号と共に示す。

【0103】

【図2】図1のCas13bオルソログの各々の分類を哺乳類細胞培養物のルシフェラー
50

ゼ発現のノックダウンにおけるその相対的有効性と共に示す。

【0104】

【図3】ガイド配列を制御して、活性Cas13bオルソログの各々の活性を比較する。

【0105】

【図4】様々なガイド配列間でCas13bオルソログの2つ — ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*) WP_039434803及びプレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5-125 WP_044065294 — の活性をC2c2/Cas13aの活性と比較する。

【0106】

【図5】RNAノックダウンに関する高活性Cas13bオルソログの特徴付け。(A) ステレオタイプのCas13遺伝子座及び対応するcrRNA構造の概略図。(B) 2つの異なるガイドを使用したルシフェラーゼノックダウンに関する19個のCas13a、15個のCas13b及び7個のCas13cオルソログの判定。両方のガイドを使用したノックダウンが効率的なオルソログについて、その宿主生物名を表示する。(C) Glucに対してガイドをタイリングしてルシフェラーゼ発現を測定することにより、PspCas13bとLwaCas13aとのノックダウン活性を比較する。(D) Clucに対してガイドをタイリングしてルシフェラーゼ発現を測定することにより、PspCas13bとLwaCas13aとのノックダウン活性を比較する。(E) LwaCas13a (赤色) 及びshRNA (黒色) についてのGlucターゲティング条件 (y軸) と比較したノンターゲティング対照 (x軸) のRNA-seqライブラリに検出される全ての遺伝子のlog2 (転写物百万分率 (TPM)) 値による発現レベル。3つのバイオロジカルレプリケートの平均値を示す。Gluc転写物データ点に表示を付す。(F) PspCas13b (青色) 及びshRNA (黒色) についてのGlucターゲティング条件 (y軸) と比較したノンターゲティング対照 (x軸) のRNA-seqライブラリに検出された全ての遺伝子のlog2 (転写物百万分率 (TPM)) 値による発現レベル。3つのバイオロジカルレプリケートの平均値を示す。Gluc転写物データ点に表示を付す。(G) E及びFにおけるトランスクリプトームワイド分析からのLwaCas13a、PspCas13b及びshRNAについてのGlucノックダウンからの有意なオフターゲットの数。

【0107】

【図6】RNA編集用のdCas13b-ADAR融合物のエンジニアリング。(A) dCas13b-ADAR融合タンパク質によるRNA編集の概略図。(B) ウミホタルルシフェラーゼW85X標的及びターゲティングガイド設計の概略図。(C) 長さ30、50、70又は84ntのガイドをタイリングしたCas13b-dADAR1 (左) 及びCas13b-ADAR2-cd (右) についてのルシフェラーゼ活性回復の定量化。(D) ウミホタルルシフェラーゼW85Xのターゲティングに関する標的部位の概略図。(E) ウミホタルルシフェラーゼW85Xを標的とする50ntガイドについてのA→I編集のシーケンシング定量化。

【0108】

【図7】REPAIRv1によるRNA編集についての配列柔軟性の測定。(A) REPAIRv1によるRNA編集のプロトスペーサー隣接部位 (PFS) 優先性を決定するためのスクリーニングの概略図。(B) 2つの異なる編集部位における4-N PFSの全ての組み合わせに関するRNA編集効率の分布。(C) 可能な全ての3塩基モチーフでのCluc W85におけるREPAIRv1のパーセント編集率の定量化。(D) 可能な全ての3塩基モチーフに関するCluc W85におけるRNA編集の5'及び3'塩基優先性のヒートマップ

【0109】

【図8】REPAIRv1による疾患関連突然変異の修正。(A) AVPR2 878G>Aのターゲティングに関する標的及びガイド設計の概略図。(B) AVPR2における878G>A突然変異は、3つの異なるガイド設計のREPAIRv1を使用して様々な

パーセンテージに修正される。(C) FANCC 1517G>Aのターゲティングに関する標的及びガイド設計の概略図。(D) FANCCにおける1517G>A突然変異は、3つの異なるガイド設計のREPAIRv1を使用して様々なパーセンテージに修正される。(E) REPAIRv1を使用した34個の異なる疾患関連G>A突然変異のパーセント編集率の定量化。(F) ClinVarデータベースによってアノテートされたとおりの修正し得る可能な全てのG>A突然変異の分析。(G) ClinVarにおける全てのG>A突然変異に関する編集モチーフの分布を、Gluc転写物で定量化したときのモチーフ毎のREPAIRv1による編集効率に対して示す。

【0110】

【図9】REPAIRv1の特異性の特徴付け。(A) KRAS標的部位及びガイド設計の概略図。(B) タイリングしたKRASターゲティングガイドに関するパーセント編集率の定量化。オンターゲット及び隣接アデノシン部位における編集率パーセンテージを示す。各ガイドについて、二重鎖RNAの領域を赤色の枠で示す。(C) GlucターゲティングガイドでのREPAIRv1による有意なRNA編集のトランスクリプトームワイド部位。オンターゲット部位Gluc部位(254 A>G)をオレンジ色で強調表示する。(D) ノンターゲティングガイドでのREPAIRv1による有意なRNA編集のトランスクリプトームワイド部位。

【0111】

【図10】REPAIRv1の特異性を向上させるADAR2の合理的な突然変異誘発。(A) 様々なdCas13-ADAR2突然変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化並びに主要なADAR2デアミナーゼ残基とdsRNA標的との間の接触に関する概略図に沿ってプロットしたその特異性スコア。特異性スコアは、ターゲティングガイド条件とノンターゲティングガイド条件との間のルシフェラーゼシグナル比として定義される。(B) その特異性スコアに対する様々なdCas13-ADAR2突然変異体によるルシフェラーゼシグナル回復の定量化。(C) オンターゲット編集割合の測定並びにmRNAのトランスクリプトームワイドシーケンシングによる各dCas13-ADAR2突然変異体に関する有意なオフターゲットの数。(D) Glucにおける中途終止部位を標的とするガイドでのREPAIRv1及びREPAIRv2による有意なRNA編集のトランスクリプトームワイド部位。オンターゲットGluc部位(254 A>G)をオレンジ色で強調表示する。(E) REPAIRv1とREPAIRv2との間のオフターゲット編集の差を強調表示するオンターゲットGluc編集部位(254 A>G)の周囲のRNAシーケンシングリード。全てのA>G編集を赤色で強調表示する一方、シーケンシングエラーを青色で強調表示する。(F) 内因性KRAS及びPPIB転写物のフレーム外UAG部位を標的とするガイドでのREPAIRv1及びREPAIRv2によるRNA編集。各条件の行についてオンターゲット編集割合を右側に横棒グラフとして示す。ガイドRNAによって形成された二重鎖領域は、赤色の囲み枠によって示す。

【0112】

【図11】インビボ効率に関するCas13bオルソログの細菌スクリーニング及びPFS決定。(A) Cas13bオルソログのPFSを決定するための細菌アッセイの概略図。β-ラクタマーゼターゲティングスプレーを有するCas13bオルソログをβ-ラクタマーゼ発現プラスミドと共形質転換し、二重選択に供する。(B) コロニー形成単位(cfu)によって測定したときのβ-ラクタマーゼを標的とするCas13bオルソログの干渉活性の定量化。(C) 細菌アッセイからの枯渇配列によって決定したときのCas13bオルソログのPFSログ。

【0113】

【図12】Cas13bノックダウンの最適化及びミスマッチ特異性の更なる特徴付け。(A) 種々の核局在化タグ及び核外移行タグに融合した上位2つのCas13a及び上位4つのCas13bオルソログを使用して、2つの異なるガイドによるGlucノックダウンを測定する。(B) 4つの異なるガイドでのLwacCas13a、RanCas13b、PguCas13b及びPspCas13bについてKRASのノックダウンを測定

10

20

30

40

50

し、4つの位置対応 s h R N A 対照と比較する。(C) L w a C a s 1 3 a 及び P s p C a s 1 3 b ノックダウンの特異性の評価に用いられるシングル及びダブルミスマッチプラスミドライブラリの概略図。標的配列並びに標的部位の 5' 末端及び 3' 末端に直接隣接する3つの位置に可能な全てのシングル及びダブルミスマッチが存在する。(D) L w a C a s 1 3 a 及び P s p C a s 1 3 b の両方の条件について、指示されるシングルミスマッチでの転写物の枯渇レベルをヒートマップとしてプロットする。(E) L w a C a s 1 3 a 及び P s p C a s 1 3 b の両方の条件について、指示されるダブルミスマッチでの転写物の枯渇レベルをヒートマップとしてプロットする。

【0114】

【図13】 d C a s 1 3 - A D A R 2 R N A 編集の設計パラメータの特徴付け。(A) 野生型 C a s 1 3 b 及び触媒不活性 H 1 3 3 A / H 1 0 5 8 A C a s 1 3 b (d C a s 1 3 b) に関する G l u c ターゲティングのノックダウン効率。(B) 野生型 A D A R 2 触媒ドメイン又は高活性 E 4 8 8 Q 突然変異体 A D A R 2 触媒ドメインのいずれかに融合した d C a s 1 3 b によるルシフェラーゼ活性回復の定量化、C l u c ターゲティングガイドをタイリングして試験した。(C) ウミホタルルシフェラーゼ W 8 5 X を標的とする 3 0 n t ガイドに関するガイド設計及び A → I 編集のシーケンシング定量化。(D) P P I B を標的とする 5 0 n t ガイドに関するガイド設計及び A → I 編集のシーケンシング定量化。(E) リンカー選択が R E P A I R v 1 によるルシフェラーゼ活性回復に及ぼす影響。(F) 標的アデノシンの対向する塩基アイデンティティが R E P A I R v 1 によるルシフェラーゼ活性回復に及ぼす影響。

【0115】

【図14】 G > A 突然変異に関する C l i n V a r モチーフ分布を示す。全ての G > A 突然変異についての C l i n V a r データベース中に観察される可能な各トリプレットモチーフの数。

【0116】

【図15】 (A) C a s 1 3 b のトランケーションは、なおも機能性 R N A 編集を有する。ルシフェラーゼシグナルの回復によって測定したとき、d C a s 1 3 b の様々な N 末端及び C 末端トランケーションが R N A 編集を可能にする。(B) d C a s 1 3 b の異なる C 末端トランケーションを有する d C a s 1 3 b - A D A R 構築物の更なる例。

【0117】

【図16】他のプログラム可能な A D A R 系と d C a s 1 3 - A D A R 2 編集体との比較。(A) 2つのプログラム可能な A D A R スキーム：B o x B ベースのターゲティング及び完全長 A D A R 2 ターゲティングの概略図。B o x B スキーム(上)では、A D A R 2 デアミナーゼドメイン (A D A R 2_{DD} (E 4 8 8 Q)) がラムダ N (λ N) と呼ばれる低分子細菌ウイルスタンパク質に融合しており、これは B o x B - λ と呼ばれる低分子 R N A 配列に特異的に結合する。次に、2つの B o x B - λ ヘアピンを含むガイド R N A が部位特異的編集のため A D A R 2_{DD} (E 4 8 8 Q)、- λ N をガイドすることができる。完全長 A D A R 2 スキーム(下)では、A D A R 2 の d s R N A 結合ドメインがガイド R N A のヘアピンに結合することにより、プログラム可能な A D A R 2 編集が可能となる。(B) C l u c を標的とするガイド及びノンターゲティングガイドでの B o x B - A D A R 2_{DD} (E 4 8 8 Q) による有意な R N A 編集のトランスクリプトームワイド部位。オンターゲット C l u c 部位 (2 5 4 A > G) をオレンジ色で強調表示する。(C) C l u c を標的とするガイド及びノンターゲティングガイドでの A D A R 2 による有意な R N A 編集のトランスクリプトームワイド部位。オンターゲット C l u c 部位 (2 5 4 A > G) をオレンジ色で強調表示する。(D) C l u c を標的とするガイド及びノンターゲティングガイドでの R E P A I R v 1 による有意な R N A 編集のトランスクリプトームワイド部位。オンターゲット C l u c 部位 (2 5 4 A > G) をオレンジ色で強調表示する。(E) C l u c に対するターゲティングガイドについての B o x B - A D A R 2_{DD} (E 4 8 8 Q)、A D A R 2 及び R E P A I R v 1 のオンターゲット編集率パーセンテージの定量化。(F) プログラム可能な A D A R 系に関する異なるターゲティング及びノンタ

ーゲティング条件間のオフターゲット部位のオーバーラップ。

【0118】

【図17】dCas13b-ADAR2突然変異体の効率及び特異性。(A) Clucターゲットティング及びノンターゲットティングガイドに関するdCas13b-ADAR2_{DD}(E488Q)突然変異体によるルシフェラーゼ活性回復の定量化。(B) ターゲティング及びノンターゲットティングガイドの比とトランスクリプトームワイドシーケンシングによって定量化したときのRNA編集オフターゲット数との間の関係。(C) dCas13b-ADAR2_{DD}(E488Q)突然変異体に関するオンターゲットCluc編集効率に対するトランスクリプトームワイドなオフターゲットRNA編集部位の数の定量化。

【0119】

【図18】dCas13b-ADAR2_{DD}(E488Q)突然変異体によるRNA編集のトランスクリプトームワイドな特異性。(A) Clucを標的とするガイドでのdCas13b-ADAR2_{DD}(E488Q)突然変異体による有意なRNA編集のトランスクリプトームワイド部位。オンターゲットCluc部位(254 A>G)をオレンジ色で強調表示する。(B) ノンターゲットティングガイドでのdCas13b-ADAR2_{DD}(E488Q)突然変異体による有意なRNA編集のトランスクリプトームワイド部位。

【0120】

【図19】dCas13b-ADAR2_{DD}(E488Q)編集のオフターゲットにおけるモチーフバイアスの特徴付け。(A) 各dCas13b-ADAR2_{DD}(E488Q)突然変異体について、トランスクリプトーム内の全てのA>Gオフターゲット編集にわたって存在するモチーフを示す。(B) ターゲティング及びノンターゲットティングガイドでのREPAIRv1について、モチーフアイデンティティ毎のオフターゲットA>G編集の分布を示す。(C) ターゲティング及びノンターゲットティングガイドでのREPAIRv2について、モチーフアイデンティティ毎のオフターゲットA>G編集の分布を示す。

【0121】

【図20】REPAIRv1及びREPAIRv2オフターゲットの更なる特徴付け。(A) REPAIRv1についての1転写物当たりのオフターゲット数のヒストグラム。(B) REPAIRv2についての1転写物当たりのオフターゲット数のヒストグラム。(C) REPAIRv1オフターゲットの変異効果予測。(D) REPAIRv1オフターゲットの潜在的発癌効果の分布。(E) REPAIRv2オフターゲットの変異効果予測。(F) REPAIRv2オフターゲットの潜在的発癌効果の分布。

【0122】

【図21】REPAIRv1及びREPAIRv2のRNA編集効率及び特異性。(A) REPAIRv1及びREPAIRv2についての標的アデノシン及び隣接部位におけるKRASターゲットティングガイド1によるKRASのパーセント編集率の定量化。(B) REPAIRv1及びREPAIRv2についての標的アデノシン及び隣接部位におけるKRASターゲットティングガイド3によるKRASのパーセント編集率の定量化。(C) REPAIRv1及びREPAIRv2についての標的アデノシン及び隣接部位におけるPPIBターゲットティングガイド2によるPPIBのパーセント編集率の定量化。

【0123】

【図22】A>G RNA編集体によるあらゆる潜在的コドン変化の実証。(A) A>I編集によって可能になる全ての潜在的コドン転換の表。(B) A>I編集によって可能になる全ての潜在的コドン転換を実証するコドン表。

【発明を実施するための形態】

【0124】

本明細書の図は、例示を目的としているに過ぎず、且つ必ずしも一定の尺度で描かれているとは限らない。

【0125】

一般に、国際公開第2014/093622号パンフレット(PCT/米国特許出願公開第2013/074667号明細書)などの前述の文献で用いられているとおりのCR

10

20

30

40

50

I S P R - C a s 又は C R I S P R 系は、C a s 遺伝子をコードする配列、t r a c r (トランス活性化 C R I S P R) 配列 (例えば、t r a c r R N A 又は活性部分的 t r a c r R N A)、t r a c r メイト配列 (内因性 C R I S P R 系に関連して「ダイレクトリピート」及び t r a c r R N A によってプロセシングされる部分的ダイレクトリピートを包含する)、ガイド配列 (内因性 C R I S P R 系に関連して「スパーサー」とも称される) 又はこの用語が本明細書において使用されるとおりの「R N A」 (例えば、C a s 9 などの C a s をガイドする R N A、例えば C R I S P R R N A 及びトランス活性化 (t r a c r) R N A 又はシングルガイド R N A (s g R N A) (キメラ R N A)) 又は C R I S P R 遺伝子座からの他の配列及び転写物を含めた、C R I S P R 関連 (「C a s」) 遺伝子の発現に関与するか又はその活性を導く転写物及び他のエレメントをまとめて指す。一般に、C R I S P R 系は、標的配列 (内因性 C R I S P R 系に関連してプロトスパーサーとも称される) の部位において C R I S P R 複合体の形成を促進するエレメントによって特徴付けられる。

10

【0126】

C R I S P R タンパク質がクラス 2 V I - B 型エフェクター (例えば、C a s 1 3 b エフェクタータンパク質) であるとき、t r a c r R N A は、不要である。本発明のエンジニアリングされた系では、ダイレクトリピートは、天然に存在する配列又は天然に存在しない配列を含み得る。本発明のダイレクトリピートは、天然に存在する長さ及び配列に限定されない。ダイレクトリピートは、3 6 n t 長であり得、しかし、それより長い又は短いダイレクトリピートが様々であり得る。例えば、ダイレクトリピートは、3 0 n t 以上、例えば 3 0 ~ 1 0 0 n t 又はそれを超え得る。例えば、ダイレクトリピートは、3 0 n t、4 0 n t、5 0 n t、6 0 n t、7 0 n t、8 0 n t、9 0 n t、1 0 0 n t 長又はそれを超える長さであり得る。一部の実施形態において、本発明のダイレクトリピートは、天然に存在するダイレクトリピートの 5 ' 末端と 3 ' 末端との間に挿入された合成ヌクレオチド配列を含み得る。特定の実施形態において、挿入された配列は、自己相補的、例えば 2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % 又は 1 0 0 % 自己相補的であり得る。更に、本発明のダイレクトリピートは、アダプタータンパク質に結合する配列など、ヌクレオチドの挿入を (機能ドメインとの会合のため) 含み得る。特定の実施形態において、かかる挿入を含むダイレクトリピートの一方の末端は、短鎖 D R のおよそ前半分であり、他方の末端は、短鎖 D R のおよそ後ろ半分である。

20

30

【0127】

C R I S P R 複合体の形成に関連して、「標的配列」とは、ガイド配列がそれに対して相補性を有するように設計される配列を指し、ここで、標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションが C R I S P R 複合体の形成を促進する。標的配列は、R N A ポリヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態において、標的配列は、細胞の核又は細胞質に位置する。一部の実施形態において、ダイレクトリピートは、以下の基準の一部又は全部を満たす繰り返しモチーフを検索することによりインシリコで同定され得る：1. C R I S P R 遺伝子座に隣接する 2 K b ウィンドウのゲノム配列に存在し、2. 2 0 ~ 5 0 b p にわたり、且つ 3. 2 0 ~ 5 0 b p の間隔が空いている。一部の実施形態では、これらの基準の 2 つ、例えば 1 及び 2、2 及び 3 又は 1 及び 3 が用いられ得る。一部の実施形態では、3 つの基準の全てが用いられ得る。

40

【0128】

本発明の実施形態において、用語のガイド配列及びガイド R N A、即ち C a s 1 3 b を標的ゲノム遺伝子座へとガイドする能力を有する R N A は、国際公開第 2 0 1 4 / 0 9 3 6 2 2 号パンフレット (P C T / 米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 7 4 6 6 7 号明細書) などの前述の引用文献中にあるとおり、同義的に使用される。一般に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズして標的配列への C R I S P R 複合体の配列特異的結合を導くのに十分な標的ポリヌクレオチド配列との相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列である。一部の実施形態において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度

50

は、好適なアラインメントアルゴリズムを用いて最適にアラインメントしたとき、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%以上であるか又はそれより高い。最適アラインメントは、配列のアラインメントに好適な任意のアルゴリズムを用いて決定することができ、その非限定的な例としては、スミス・ウォーターマンアルゴリズム、ニードルマン・ブンシュアルゴリズム、バローズ・ホイラー変換に基づくアルゴリズム（例えば、バローズ・ホイラーアライナー）、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign（Novocraft Technologies; www.novocraft.comにおいて利用可能）、ELAND（Illumina, San Diego, CA）、SOAP (soap.genomics.org.cnにおいて利用可能) 及びMaq (maq.sourceforge.netにおいて利用可能) が挙げられる。一部の実施形態において、ガイド配列は、約5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75ヌクレオチド長以上であるか又はそれより長い。一部の実施形態において、ガイド配列は、約75、50、45、40、35、30、25、20、15、12ヌクレオチド長未満であるか又はそれより短い。好ましくは、ガイド配列は、10～40ヌクレオチド長、例えば20～30又は20～40ヌクレオチド長又はそれを超え、例えば30ヌクレオチド長又は約30ヌクレオチド長である。特定の実施形態において、Cas13bエフェクターに対するガイド配列は、10～30ヌクレオチド長、例えば20～30又は20～40ヌクレオチド長又はそれを超え、例えば30ヌクレオチド長又は約30ヌクレオチド長である。特定の実施形態において、バージイェラ・ズーヘルカム (Bergeyella zoohelcum) (バージイェラ・ズーヘルカム (Bergeyella zoohelcum) ATCC 43767など) に由来するCas13bエフェクターに対するガイド配列は、10～30ヌクレオチド長、例えば20～30ヌクレオチド長、例えば30ヌクレオチド長又は約30ヌクレオチド長である。ガイド配列が標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を導く能力は、任意の好適なアッセイによって評価し得る。例えば、CRISPR複合体を形成するのに十分なCRISPR系の構成成分が、試験しようとするガイド配列を含め、CRISPR配列の構成成分をコードするベクターのトランスフェクションなどにより対応する標的配列を有する宿主細胞に提供され得、続いて本明細書に記載されるとおりのSurveyorアッセイなどにより、標的配列内における優先的な切断を評価し得る。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の切断は、標的配列、試験しようとするガイド配列を含めたCRISPR複合体の構成成分及び供試ガイド配列と異なる対照ガイド配列を提供して、供試ガイド配列と対照ガイド配列との反応間の標的配列における結合又は切断速度を比較することにより試験管内で判定することができる。他のアッセイも可能であり、当業者に想起されるであろう。

【0129】

古典的なCRISPR-Cas系において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%又は100%以上であり得、ガイド、又はRNA、又はsgRNAは、約5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75ヌクレオチド長以上であるか又はそれより長いことができるか、又はガイド、又はRNA、又はsgRNAは、約75、50、45、40、35、30、25、20、15、12ヌクレオチド長未満であるか又はそれより短いことができる。しかしながら、本発明の特定の態様では、オフターゲット相互作用が低下され得、例えばガイドが相補性の低い標的配列と相互作用するのを低下させる。実際、特定の当然変異は、80%～約95%超の相補性、例えば83%～84%、又は88～89%、又は94～95%の相補性を有する標的配列とオフターゲット配列との間を区別する（例えば、18ヌクレオチドを有する標的を、1、2又は3個のミスマッチを有する18ヌクレオチドのオフターゲットと区別する）ことが可能なCRISPR-Cas系をもたらし得る。従って、本発明との関連において

、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、94.5%、又は95%、又は95.5%、又は96%、又は96.5%、又は97%、又は97.5%、又は98%、又は98.5%、又は99%、又は99.5%、又は99.9%超、又は100%であり得る。オフターゲットは、その配列とガイドとの間で100%、又は99.9%、又は99.5%、又は99%、又は99%、又は98.5%、又は98%、又は97.5%、又は97%、又は96.5%、又は96%、又は95.5%、又は95%、又は94.5%、又は94%、又は93%、又は92%、又は91%、又は90%、又は89%、又は88%、又は87%、又は86%、又は85%、又は84%、又は83%、又は82%、又は81%、又は80%未満の相補性であり、有利には、オフターゲットは、その配列とガイドとの間で100%、又は99.9%、又は99.5%、又は99%、又は99%、又は98.5%、又は98%、又は97.5%、又は97%、又は96.5%、又は96%、又は95.5%、又は95%、又は94.5%の相補性である。

10

【0130】

特定の実施形態において、スパーサー配列と標的配列との間にミスマッチ、例えば1つ又は2つのミスマッチなどの1つ以上のミスマッチを導入することにより、スパーサー／標的に沿ったミスマッチの位置を含め、切断効率の調節を利用することができる。例えば、ダブルミスマッチが中央寄りであるほど（即ち3'寄り又は5'寄りでない）、切断効率がより大きい影響を受ける。従って、スパーサーに沿ってミスマッチ位置を選択することにより、切断効率を調節することができる。例として、標的の100%未満の切断が（例えば、ある細胞集団において）所望される場合、スパーサー配列にスパーサーと標的配列との間の1つ以上、例えば好ましくは2つのミスマッチが導入され得る。スパーサーに沿ってミスマッチ位置が中央寄りであるほど、切断割合が低くなる。

20

【0131】

本明細書に記載されるとおりの本発明に係る方法は、本明細書に考察されるとおりのベクターを細胞に送達することを含む、本明細書に考察されるとおりの真核細胞において（インビトロで、即ち単離された真核細胞において）1つ以上のヌクレオチド改変を誘導することを包含する。この突然変異には、ガイドRNA又はsgRNAを介した細胞の各標的配列における1つ以上のヌクレオチドの導入、欠失又は置換が含まれ得る。この突然変異には、ガイドRNAを介した前記細胞の各標的配列における1〜75ヌクレオチドの導入、欠失又は置換が含まれ得る。この突然変異には、ガイドRNAを介した前記細胞の各標的配列における1、5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50又は75ヌクレオチドの導入、欠失又は置換が含まれ得る。この突然変異には、ガイドRNAを介した前記細胞の各標的配列における5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50又は75ヌクレオチドの導入、欠失又は置換が含まれ得る。この突然変異には、ガイドRNAを介した前記細胞の各標的配列における10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50又は75ヌクレオチドの導入、欠失又は置換が含まれ得る。この突然変異には、ガイドRNAを介した前記細胞の各標的配列における20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50又は75ヌクレオチドの導入、欠失又は置換が含まれ得る。この突然変異には、ガイドRNAを介した前記細胞の各標的配列における40、45、50、75、100、200、300、400又は500ヌクレオチドの導入、欠失又は置換が含まれ得る。

30

40

【0132】

毒性及びオフターゲット効果を最小限に抑えるため、送達されるCas mRNA又はタンパク質及びガイドRNAの濃度を制御することが重要となり得る。Cas mRNA又はタンパク質及びガイドRNAの最適濃度は、細胞モデル又は非ヒト真核生物動物モデルにおける種々の濃度の試験及びディープシーケンシングを用いた潜在的なオフターゲット

50

トゲノム遺伝子座における改変の程度の分析によって決定することができる。

【0133】

典型的には、内因性CRISPR系に関連して、CRISPR複合体（標的配列にハイブリダイズし、且つ1つ以上のCasタンパク質と複合体を形成したガイド配列を含む）が形成されると、標的配列又はその近傍（例えば、標的配列から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50塩基対又はそれを超える範囲内）に切断が生じるが、特にRNA標的の場合、例えば二次構造に依存し得る。

【0134】

Casをコードする核酸分子は、有利には、コドン最適化されたCasである。コドン最適化された配列の例は、この場合、真核生物、例えばヒトでの発現に最適化されるか（即ちヒトでの発現に最適化されている）又は本明細書で考察されるとおりの別の真核生物、動物若しくは哺乳動物に最適化された配列である。例えば、国際公開第2014/093622号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2013/074667号明細書）のSaCas9ヒトコドン最適化配列を参照されたい。これが好ましいが、他の例が可能であることが理解され、ヒト以外の宿主種に対するコドン最適化又は特定の器官に対するコドン最適化が公知である。一部の実施形態において、Casをコードする酵素コード配列は、特定の細胞、例えば真核細胞での発現にコドン最適化される。真核細胞は、特定の生物、例えば、限定はされないが、ヒトを含めた哺乳動物又は本明細書で考察されるとおりの非ヒト真核生物又は動物又は哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、家畜又は非ヒト哺乳動物又は霊長類のものであるか又はそれに由来し得る。一部の実施形態において、ヒト又は動物に対するいかなる実質的な医学的利益もなく、それらに苦痛を生じさせる可能性のあるヒトの生殖細胞系列遺伝子アイデンティティの改変方法及び／又は動物の遺伝子アイデンティティの改変方法、更にかかる方法から得られる動物は、除外され得る。一般に、コドン最適化とは、天然配列の少なくとも1つのコドン（例えば、約1、2、3、4、5、10、15、20、25、50個以上又はそれより多いコドン）を、天然のアミノ酸配列を維持しつつ、その宿主細胞の遺伝子においてより高頻度で又は最も高頻度で使用されるコドンに置き換えることにより、目的の宿主細胞における発現を増強するための核酸配列の改変方法を指す。様々な種が特定のアミノ酸のある種のコドンについて特定のバイアスを呈する。コドンバイアス（生物間でのコドン使用の違い）は、多くの場合にメッセンジャーRNA（mRNA）の翻訳効率と相関し、次に、それは、数ある中でも特に、翻訳されるコドンの特性及び特定のトランスファーRNA（tRNA）分子の利用可能性に依存すると考えられている。細胞において選択のtRNAが優勢であることは、概して、ペプチド合成で最も高頻度で使用されるコドンを反映するものである。従って、コドン最適化に基づき、所与の生物における最適な遺伝子発現に合わせて遺伝子を調整することができる。コドン使用表は、例えば、www.kazusa.or.jp/codon/で利用可能な「コドン使用データベース」で容易に利用可能であり、これらの表を幾つもの方法で適合させることができる。Nakamura, Y., et al. "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" *Nucl. Acids Res.* 28:292 (2000) を参照されたい。特定の配列を特定の宿主細胞における発現にコドン最適化するためのコンピュータアルゴリズムも利用可能であり、Gene Forge (Aptagen; Jacobus, PA)なども利用可能である。一部の実施形態において、Casをコードする配列中の1つ以上のコドン（例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、25、50以上又は全てのコドン）は、特定のアミノ酸について最も高頻度で使用されるコドンに対応する。

【0135】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの方法は、1つ以上の目的の遺伝子のプロモーターを含む調節エレメントと細胞内で作動可能に接続した1つ以上のガイドRNAをコードする1つ以上の核酸が提供又は導入されるCasトランスジェニック細

胞を提供することを含み得る。本明細書で使用されるとき、用語「Casトランスジェニック細胞」は、Cas遺伝子がゲノム的に組み込まれている真核細胞などの細胞を指す。細胞の性質、タイプ又は起源は、本発明によれば、特に限定されない。また、Casトランス遺伝子を細胞に導入する方法も様々であり得、当該技術分野において公知のとおり任意の方法であり得る。特定の実施形態において、Casトランスジェニック細胞は、単離細胞にCasトランス遺伝子を導入することによって得られる。特定の他の実施形態において、Casトランスジェニック細胞は、Casトランスジェニック生物から細胞を単離することによって得られる。例として及び限定なしに、本明細書において言及されたとおりのCasトランスジェニック細胞は、Casノックイン真核生物など、Casトランスジェニック真核生物に由来し得る。国際公開第2014/093622号パンフレット（PCT/米国特許出願公開第13/74667号明細書）（参照により本明細書に援用される）が参照される。Rosa遺伝子座のターゲティングに関する、Sangamo Biosciences, Inc. に譲渡された米国特許出願公開第20120017290号明細書及び同第20110265198号明細書の方法を、本発明のCRISPR Cas系を利用するように改変し得る。Rosa遺伝子座の標的化に関する、Celllectisに譲渡された米国特許出願公開第20130236946号明細書の方法も、本発明のCRISPR Cas系を利用するように改変し得る。更なる例として、Cas9ノックインマウスについて記載しているPlatt et al. (Cell; 159 (2): 440-455 (2014))（参照により本明細書に援用される）が参照される。Casトランス遺伝子は、Lox-Stop-ポリA-Lox (LSL) カセットを更に含み得、それによりCas発現をCreリコンビナーゼによって誘導可能なものにすることができる。代わりに、Casトランスジェニック細胞は、単離細胞にCasトランス遺伝子を導入することによって得ることができる。トランス遺伝子の送達系は、当該技術分野において周知である。例として、Casトランス遺伝子は、同様に本明細書の他の部分に記載されたとおり、例えば真核細胞においてベクター（例えば、AAV、アデノウイルス、レンチウイルス）、及び／又は粒子、及び／又はナノ粒子送達を用いて送達され得る。

【0136】

当業者は、本明細書において参照されたとおりのCasトランスジェニック細胞などの細胞が、例えば及び限定なしに、Platt et al. (2014), Chen et al., (2014) 又はKumar et al. (2009) に記載されたとおり、組み込まれたCas遺伝子を有することに加えて、更なるゲノム変化を含むか、又はCasを標的遺伝子座にガイドすることが可能なRNAと複合体を形成したとき、Casの配列特異的作用によって生じる突然変異、例えば1つ以上の発癌突然変異などを含み得ることを理解するであろう。

【0137】

一部の実施形態において、Cas配列は、1個以上の核局在化配列(NLS)又は核外移行配列(NES)、例えば約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上又はそれより多いNLS又はNESに融合される。一部の実施形態において、Casは、アミノ末端又はその近傍に約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上又はそれより多いNLS又はNESを含むか、カルボキシ末端又はその近傍に約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上又はそれより多いNLS又はNESを含むか、又はこれらの組み合わせ（例えば、アミノ末端にゼロ個又は少なくとも1個以上のNLS又はNES及びカルボキシ末端にゼロ個又は1個以上のNLS又はNES）である。2個以上のNLS又はNESが存在する場合、各々を他と独立して選択し得、従って単一のNLS又はNESが2つ以上のコピーで存在し得、且つ／又は1つ以上のコピーで存在する1つ以上の他のNLS又はNESとの組み合わせで存在し得る。本発明の好ましい実施形態において、Casは、最大で6個のNLSを含む。一部の実施形態において、NLS又はNESは、NLS又はNESの最も近いアミノ酸がN末端又はC末端からポリペプチド鎖に沿って約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50又はそれより多いアミノ

酸の範囲内にあるとき、N末端又はC末端の近傍にあると見なされる。NLSの非限定的な例としては、アミノ酸配列PKKKRKV（配列番号X）を有するSV40ウイルスライジT抗原のNLS、ヌクレオプラスミンのNLS（例えば、配列KRPAATKKAGQAKKKK）（配列番号X）を有するヌクレオプラスミンビパルタイトNLS、アミノ酸配列PAAKRVKLD（配列番号X）又はRQRRNELKRSP（配列番号X）を有するc-myc NLS、配列NQSSNF GPMKG GNF GGRSSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY（配列番号X）を有するhRNPA1 M9 NLS、インポーチン-αのIBBDメインの配列RMRI ZFKNK GKDTAE LRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV（配列番号X）、筋腫タンパク質の配列VSRKRPRP（配列番号X）及びPPKKARE D（配列番号X）、ヒトp53の配列POPKKKPL（配列番号X）、マウスc-abl IVの配列SALIKKKKKMA P（配列番号X）、インフルエンザウイルスNS1の配列DRLRR（配列番号X）及びPKQKKRK（配列番号X）、肝炎ウイルスデルタ抗原の配列RKLKKKKIKKL（配列番号X）、マウスMx1タンパク質の配列REKKKFLKRR（配列番号X）、ヒトポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼの配列KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK（配列番号X）及びステロイドホルモン受容体（ヒト）グルコルチコイドの配列RKC LQAGMNL EARKTKK（配列番号X）に由来するNLS配列が挙げられる。NESの非限定的な例としては、NES配列LYPERLLRRI LT（ctgtacccttgagcg gctgcggcg gga tccctgacc）が挙げられる。一般に、1つ以上のNLS又はNESは、真核細胞のそれぞれ核又は細胞質における検出可能な量のCasの蓄積をドライブするのに十分な強度である。一般に、核局在化／核外移行活性の強度は、Cas内のNLS／NESの数、用いられる詳細なNLS又はNES又はこれらの組み合わせ要因から導き出すことができる。核／細胞質内での蓄積の検出は、任意の好適な技法によって実施し得る。例えば、検出可能なマーカーをCasに融合し得、それにより、核（例えば、DAPIなど、核に特異的な染色）又は細胞質の位置を検出する手段と組み合わせるなどして細胞内での位置を可視化し得る。細胞核はまた、細胞から単離され得、次にその内容物を免疫組織化学、ウェスタンブロット又は酵素活性アッセイなど、任意の好適なタンパク質検出方法によって分析し得る。核内における蓄積は、CRISPR複合体形成の効果に関するアッセイ（例えば、標的配列におけるDNA切断又は突然変異に関するアッセイ又はCRISPR複合体形成及び／若しくはCas酵素活性の影響を受けて変化した遺伝子発現活性に関するアッセイ）によるなどして、Cas若しくは複合体に曝露されていない対照又は1つ以上のNLS又はNESを欠くCasに曝露された対照と比較して間接的にも決定され得る。特定の実施形態において、限定なしに、オルガネラ、例えばミトコンドリア、プラスチド、葉緑体、小胞、ゴルジ、（核又は細胞）膜、リボソーム、核小体、ER、細胞骨格、液胞、中心体、ヌクレオソーム、顆粒、中心小体などの細胞内の特定の部位にCasを局在化させるためなど、他の局在化タグがCasタンパク質に融合され得る。

【0138】

特定の態様において、本発明は、例えば、Cas及び／又はCasを標的遺伝子座に案内する能力を有するRNA（即ちガイドRNA）を細胞に送達又は導入するための、またこれらの成分を（例えば、原核細胞において）増殖させるためのベクターに関する。本明細書で使用されるとき、「ベクター」は、ある実体を1つの環境から別の環境に移すことを可能にするか又は促進するツールである。これは、別のDNAセグメントが挿入されて挿入セグメントの複製をもたらし得るレプリコン、例えばプラスミド、ファージ又はコスミドである。概して、ベクターは、適切な制御エレメントと会合しているときに複製能を有する。一般に、用語「ベクター」は、それに連結されている別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を指す。ベクターとしては、限定はされないが、一本鎖、二本鎖又は部分的二本鎖の核酸分子、1つ以上の遊離末端を含む、遊離末端のない（例えば、環状の）核酸分子、DNA、RNA又は両方を含む核酸分子及び当該技術分野において公知の他の各種ポリヌクレオチドが挙げられる。ある種のベクターは、「プラスミド」であり、これは

10

20

30

40

50

、標準的な分子クローニング技術によるなどして追加のDNAセグメントを挿入することができる環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターは、ウイルスベクターであり、ここで、ベクターには、ウイルス（例えば、レトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス（AAV））へのパッケージングのためのウイルス由来DNA又はRNA配列が存在する。ウイルスベクターは、宿主細胞へのトランスフェクションのためのウイルスが担持するポリヌクレオチドも含む。特定のベクターは、それが導入される宿主細胞での自己複製能を有する（例えば、細菌性複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳類ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより宿主ゲノムと共に複製される。更に、特定のベクターは、それが作動可能に連結された遺伝子の発現を導くことが可能である。かかるベクターは、本明細書では「発現ベクター」と称される。組換えDNA技法において有用な一般的な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。

10

【0139】

組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に好適な形態で本発明の核酸を含むことができ、これは、即ち、組換え発現ベクターが、発現させる核酸配列に作動可能に連結された1つ以上の調節エレメント（これは、発現に用いられる宿主細胞に基づいて選択され得る）を含むことを意味する。組換え発現ベクターの範囲内において、「作動可能に連結された」は、ヌクレオチド配列の（例えば、インビトロ転写／翻訳系における又はベクターが宿主細胞に導入される場合に宿主細胞における）発現が可能となる形で目的のヌクレオチド配列が調節エレメントに連結されていることを意味するように意図される。組換え及びクローニング方法に関しては、2004年9月2日に米国特許出願公開第2004-0171156 A1号明細書として公開された米国特許出願第10/815,730号明細書（この内容は、本明細書において全体として参照により援用される）が挙げられる。

20

【0140】

ベクターは、調節エレメント、例えばプロモーターを含み得る。ベクターは、Casコード配列及び／又は単一の、しかし少なくとも3、又は8、又は16、又は32、又は48、又は50個を含み得る可能性もあるガイドRNA（例えば、sgRNA）コード配列、例えば1～2、1～3、1～4、1～5、3～6、3～7、3～8、3～9、3～10、3～8、3～16、3～30、3～32、3～48、3～50個のRNA（例えば、sgRNA）を含み得る。単一のベクターには、有利には、約16個以下のRNAがある場合、各RNA（例えば、sgRNA）にプロモーターがあり得、及び単一のベクターが16個より多いRNAを提供する場合、1つ以上のプロモーターがそれらのRNAの2個以上の発現をドライブし得、例えば32個のRNAがある場合、各プロモーターが2個のRNAの発現をドライブし得、及び48個のRNAがある場合、各プロモーターが3個のRNAの発現をドライブし得る。単純な算術的な十分に確立されたクローニングプロトコル及び本開示の教示により、当業者は、例えば、AAVなどの好適な例示的ベクターに対するRNA及びU6プロモーターなどの好適なプロモーターに関して本発明を容易に実施することができる。例えば、AAVのパッケージング限界は、約4.7 kbである。単一のU6-gRNA（+クローニング用の制限部位）の長さは、361 bpである。従って、当業者は、単一のベクターに約12～16個、例えば13個のU6-gRNAカセットを容易に収めることができる。これは、TALEアセンブリに用いられるゴールデンゲート戦略（<http://www.genome-engineering.org/tales-effectors/>）など、任意の好適な手段によってアセンブルすることができる。当業者は、U6-gRNAの数を約1.5倍増加させるため、例えば12～16、例えば13から約18～24、例えば約19個のU6-gRNAに増加させるため、タンデムガイド戦略も用いることができる。従って、当業者は、単一のベクター、例えばAAVベクター中に約18～24個、例えば約19個のプロモーター-RNA、例えばU6-gRNAに容易に至ることができる。ベクター中のプロモーター及びRNAの数を増加させる更

30

40

50

なる手段は、単一のプロモーター（例えば、U6）を使用して、切断可能な配列によって分離されたRNAのアレイを発現させることである。また、ベクター中のプロモーターRNAの数を増加させる更に別の手段は、コード配列又は遺伝子のイントロンにおいて切断可能な配列によって分離されたプロモーターRNAのアレイを発現させることであり、この場合、ポリメラーゼIIプロモーターを使用することが有利であり、それにより発現が増加し、組織特異的様式での長いRNAの転写が可能となり得る（例えば、<http://nar.oxfordjournals.org/content/34/7/e53.short>、<http://www.nature.com/mt/journal/v16/n9/abs/mt2008144a.html>を参照されたい）。有利な実施形態において、AAVは、最大約50遺伝子を標的とするU6タンデムgRNAをパッケージングし得る。従って、当該技術分野における知識及び本開示の教示から、当業者は、1つ以上のプロモーターの制御下にあるか、又はそれに作動可能に若しくは機能的に連結された複数のRNA又はガイドを発現するベクター、例えばシングルベクターを（特に本明細書で考察されるRNA又はガイドの数に関して）いかなる過度の実験もなく容易に作製及び使用することができる。

【0141】

ガイドRNAのコード配列及び／又はCasコード配列は、調節エレメントに機能的に又は作動可能に連結され得、従って調節エレメントが発現をドライブする。プロモーターは、構成的プロモーター、及び／又は条件的プロモーター、及び／又は誘導性プロモーター、及び／又は組織特異的プロモーターであり得る。プロモーターは、RNAポリメラーゼ、pol I、pol II、pol III、T7、U6、H1、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、 β -アクトシンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）プロモーター及びEF1 α プロモーターからなる群から選択され得る。有利なプロモーターは、プロモーターであり、U6である。

【0142】

本発明の態様は、クラス2 CRISPR-Cas系に関連する新規エフェクタータンパク質の同定及びエンジニアリングに関する。好ましい実施形態において、このエフェクタータンパク質は、シングルサブユニットエフェクターモジュールを含む。更なる実施形態において、エフェクタータンパク質は、インビトロ、インビボ又はエキソビボ適用において原核細胞又は真核細胞で機能する。

【0143】

核酸がDNA又はRNAであり、及び一部の態様においてDNA-RNAハイブリッド（hybrid）又はその誘導体も指し得る用語「核酸ターゲティング系」は、まとめて、DNA又はRNAターゲティングCRISPR関連（「Cas」）遺伝子の発現に関与するか又はその活性を誘導する転写物及び他のエレメントを指し、この遺伝子は、DNA又はRNAターゲティングCasタンパク質をコードする配列及びCRISPR RNA（crRNA）配列と、（全ての系ではないが、一部において）トランス活性化CRISPR-Cas系RNA（tracrRNA）配列とを含むDNA若しくはRNAターゲティングガイドRNA又はDNA若しくはRNAターゲティングCRISPR遺伝子座からの他の配列及び転写物を含み得る。一般に、RNAターゲティング系は、標的DNA又はRNA配列の部位におけるDNA又はRNAターゲティング複合体の形成を促進するエレメントによって特徴付けられる。DNA又はRNAターゲティング複合体の形成に関連して、「標的配列」は、DNA又はRNAターゲティングガイドRNAがそれと相補性を有するように設計されるDNA又はRNA配列を指し、ここで、標的配列とRNAターゲティングガイドRNAとの間のハイブリダイゼーションがRNAターゲティング複合体の形成を促進する。一部の実施形態において、標的配列は、細胞の核又は細胞質に位置する。

【0144】

本発明のある態様において、本願のRNA-又はRNAターゲティングCRISPR／

Cas又はCRISPR-Cas系RNAターゲティング系とも称される新規RNAターゲティング系は、同定されたVI-B型Casタンパク質をベースとし、これは、特異的RNA配列を標的化するのにカスタマイズしたタンパク質を作成する必要はなく、むしろ単一の酵素をRNA分子によって特異的RNA標的を認識するようにプログラムすることができ、換言すれば、前記RNA分子を用いて酵素を特異的RNA標的に動員することができる。

【0145】

本発明のある態様において、本願のDNA-又はDNAターゲティングCRISPR/Cas又はCRISPR-Cas系RNAターゲティング系とも称される新規DNAターゲティング系は、同定されたVI-B型Casタンパク質をベースとし、これは、特異的RNA配列を標的化するのにカスタマイズしたタンパク質を作成する必要はなく、むしろ単一の酵素をRNA分子によって特異的DNA標的を認識するようにプログラムすることができ、換言すれば、前記RNA分子を用いて酵素を特異的DNA標的に動員することができる。

10

【0146】

本明細書に記載される核酸ターゲティング系、ベクター系、ベクター及び組成物は、様々な核酸ターゲティング適用、タンパク質などの遺伝子産物の合成の変化又は改変、核酸切断、核酸編集、核酸のスプライシング、標的核酸の輸送、標的核酸の追跡、標的核酸の単離、標的核酸の可視化等において用いられ得る。

【0147】

本明細書で使用されるとき、Casタンパク質又はCRISPR酵素は、CRISPR-Cas系の新規分類に提示されるタンパク質のいずれかを指す。

20

【0148】

Cas13bヌクレアーゼ

本発明のCas13bエフェクタータンパク質は、図1からの又はそこに示されるとおりのかかるタンパク質であるか、又はそれを含むか、又はそれから本質的になるか、又はそれからなるか、又はそれが関わるか若しくはそれに関する。図1の好ましいタンパク質は、ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*) Cas13b (受託番号WP__039434803)、プレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5-125 Cas13b (受託番号WP__044065294)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) Cas13b (受託番号WP__053444417)、ポルフィロモナス属種 (*Porphyromonas* sp.) COT-052 OH4946 Cas13b (受託番号WP__039428968)、バクテロイデス・ピオゲネス (*Bacteroides pyogenes*) Cas13b (受託番号WP__034542281)、リエメラ・アナティペステイファー (*Riemerella anatipestifer*) Cas13b (受託番号WP__004919755) からなる群から選択される。図1の最も好ましいタンパク質は、ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*) Cas13b (受託番号WP__039434803)、プレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5-125 Cas13b (受託番号WP__044065294)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) Cas13b (受託番号WP__053444417)、ポルフィロモナス属種 (*Porphyromonas* sp.) COT-052 OH4946 Cas13b (受託番号WP__039428968) からなる群から選択され、及び最も特別に好ましいのは、ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*) Cas13b (受託番号WP__039434803) 又はプレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5-125 Cas13b (受託番号WP__044065294) である。本発明は、本明細書からの又はそこに示されるとおりのタンパク質を、本明細書に示されるとおりのその突然変異又は改変を含めて提供するか、又はそれに関するか、又はそれに関わるか、又はそれを含むか、又はそれから本質的になるか、又はそれからなることが意図される

30

40

50

。

【0149】

従って、一部の実施形態において、エフェクタータンパク質は、デッド Cas 型エフェクタータンパク質などの RNA 結合タンパク質であり得、これは、任意選択で本明細書に記載されるとおり、例えば転写アクチベーター又はリプレッサードメイン、NLS 又は他の機能ドメインで機能化され得る。一部の実施形態において、エフェクタータンパク質は、RNA の一本鎖を切断する RNA 結合タンパク質であり得る。結合する RNA が ssRNA である場合、その ssRNA は、完全に切断される。一部の実施形態において、エフェクタータンパク質は、例えば、それが 2 つの RNA アーゼドメインを含む場合、RNA の二本鎖を切断する RNA 結合タンパク質であり得る。結合する RNA が dsRNA である場合、その dsRNA は、完全に切断される。

10

【0150】

CRISPR 系における RNA アーゼ機能は、公知であり、例えばある種の III 型 CRISPR-Cas 系について mRNA ターゲティングが報告されており (Hale et al., 2014, Genes Dev, vol. 28, 2432-2443; Hale et al., 2009, Cell, vol. 139, 945-956; Peng et al., 2015, Nucleic acids research, vol. 43, 406-417)、多大な利点をもたらす。従って、本エフェクタータンパク質によって RNA を標的とする CRISPR-Cas 系、組成物又は方法が提供される。

【0151】

標的 RNA、即ち目的の RNA は、標的 RNA 上の目的の標的部位へのエフェクタータンパク質の動員及び結合につながる本発明によって標的とされるべき RNA である。標的 RNA は、任意の好適な形態の RNA であり得る。これには、一部の実施形態では、mRNA が含まれ得る。他の実施形態において、標的 RNA には tRNA 又は rRNA が含まれ得る。

20

【0152】

Cas13b ガイド

本明細書で使用されるとき、VI 型 CRISPR-Cas 遺伝子座エフェクタータンパク質の「crRNA」、又は「ガイド RNA」、又は「シングルガイド RNA」、又は「sgRNA」、又は「1 つ以上の核酸成分」という用語は、標的核酸配列とハイブリダイズして、標的 RNA 配列への RNA ターゲティング複合体の配列特異的結合を導くのに十分な標的核酸配列との相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列を含む。

30

【0153】

特定の実施形態において、本明細書に提供されるとおりの CRISPR システムは、crRNA 又はガイド配列を含む類似のポリヌクレオチドを利用することができ、ここで、ポリヌクレオチドは、RNA、DNA 又は RNA と DNA との混合物であり、及び／又はポリヌクレオチドは、1 つ以上のヌクレオチド類似体を含む。この配列は、限定はされないが、バルジ、ヘアピン又はステムループ構造など、天然 crRNA の構造を含め、任意の構造を含み得る。特定の実施形態において、ガイド配列を含むポリヌクレオチドは、RNA 又は DNA 配列であり得る第 2 のポリヌクレオチド配列と二重鎖を形成する。

40

【0154】

特定の実施形態において、本発明のガイドは、天然に存在しない核酸、及び／又は天然に存在しないヌクレオチド、及び／又はヌクレオチド類似体、及び／又は化学的改変を含む。天然に存在しない核酸には、例えば、天然に存在するヌクレオチドと天然に存在しないヌクレオチドとの混合物が含まれ得る。天然に存在しないヌクレオチド及び／又はヌクレオチド類似体は、リボース、リン酸及び／又は塩基部分が改変され得る。本発明のある実施形態において、ガイド核酸は、リボヌクレオチド及び非リボヌクレオチドを含む。1 つのかかる実施形態において、ガイドは、1 つ以上のリボヌクレオチド及び 1 つ以上のデオキシリボヌクレオチドを含む。本発明のある実施形態において、ガイドは、ホスホロチオエート結合、ボラノホスフェート結合を有するヌクレオチド、リボース環の 2' 及び 4

50

炭素間にメチレン架橋を含むロックド核酸 (LNA) ヌクレオチド又は架橋核酸 (BNA) など、1つ以上の天然に存在しないヌクレオチド又はヌクレオチド類似体を含む。改変ヌクレオチドの他の例としては、2'-O-メチル類似体、2'-デオキシ類似体、2'-チオウリジン類似体、N6-メチルアデノシン類似体又は2'-フルオロ類似体が挙げられる。改変塩基の更なる例としては、限定はされないが、2'-アミノプリン、5'-ブromoウリジン、プソイドウリジン (Ψ)、N1-メチルプソイドウリジン (me1 Ψ)、5'-メトキシウリジン (5moU)、イノシン、7'-メチルグアノシンが挙げられる。ガイドRNAの化学的改変の例としては、限定なしに、1つ以上の末端ヌクレオチドにおける2'-O-メチル (M)、2'-O-メチル-3'-ホスホロチオエート (MS)、S-拘束エチル (cEt) 又は2'-O-メチル-3'-チオPACe (MSP) の取り込みが挙げられる。かかる化学的に改変されたガイドは、改変されていないガイドRNAと比較したとき、高い安定性及び高い活性を含むことができ、しかしながら、オンターゲット対オフターゲット特異性は、予測不可能である (Hendel, 2015, Nat Biotechnol. 33 (9): 985-9, doi:10.1038/nbt.3290, published online 29 June 2015; Allers et al., J. Med. Chem. 2005, 48: 901-904; Bramsen et al., Front. Genet., 2012, 3: 154; Deng et al., PNAS, 2015, 112: 11870-11875; Sharma et al., MedChemComm., 2014, 5: 1454-1471; Li et al., Nature Biomedical Engineering, 2017, 1, 0066 DOI:10.1038/s41551-017-0066)。

【0155】

一部の実施形態において、ガイドRNAの5'及び/又は3'末端は、蛍光色素、ポリエチレングリコール、コレステロール、タンパク質又は検出タグを含め、種々の機能性部分によって改変される (Kelly et al., 2016, J. Biotech. 233: 74-83を参照されたい)。特定の実施形態において、ガイドは、標的RNAに結合する領域にリボヌクレオチドを含み、Cas13bに結合する領域に1つ以上のデオキシリボヌクレオチド及び/又はヌクレオチド類似体を含む。本発明のある実施形態において、デオキシリボヌクレオチド及び/又はヌクレオチド類似体は、限定なしに、5'及び/又は3'末端、ステムループ領域及びシード領域など、エンジニアリングされたガイド構造に組み込まれる。特定の実施形態において、改変は、ステムループ領域の3'-ハンドルにない。ガイドのステムループ領域の3'-ハンドルにおける化学的改変は、その機能を無効にし得る。特定の実施形態において、ガイドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50又は75ヌクレオチドが化学的に改変される。一部の実施形態において、ガイドの3'又は5'末端のいずれかの3~5ヌクレオチドが化学的に改変される。一部の実施形態において、2'-F改変など、シード領域に軽微な改変のみが導入される。一部の実施形態において、2'-F改変は、ガイドの5'及び/又は3'末端に導入される。特定の実施形態において、ガイドの5'及び/又は3'末端の3~5ヌクレオチドが2'-O-メチル (M)、2'-O-メチル-3'-ホスホロチオエート (MS)、S-拘束エチル (cEt) 又は2'-O-メチル-3'-チオPACe (MSP) で化学的に改変される。かかる改変は、ゲノム編集効率を亢進させ得る (Hendel et al., Nat. Biotechnol. (2015) 33 (9): 985-989を参照されたい)。特定の実施形態において、遺伝子破壊レベルを亢進させるため、ガイドの全てのリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート (PS) に置換される。特定の実施形態において、ガイドの5'及び/又は3'末端の5ヌクレオチド超が2'-O-Me、2'-F又はS-拘束エチル (cEt) で化学的に改変される。かかる化学的に改変されたガイドは、亢進したレベルの遺伝子破壊を媒介することができる (Ragdarm et al., 2015, PNAS, E7110-E7111を参照されたい)。本発明のある実施形

態において、ガイドは、その3'及び／又は5'末端に化学的部分を含むように改変される。かかる部分としては、限定はされないが、アミン、アジド、アルキン、チオ、ジベンゾシクロオクチン（DBCO）又はローダミンが挙げられる。特定の実施形態において、化学的部分は、アルキル鎖などのリンカーによってガイドにコンジュゲートされる。特定の実施形態において、改変されたガイドの化学的部分は、ガイドをDNA、RNA、タンパク質又はナノ粒子などの別の分子に取り付けるために使用することができる。かかる化学的に改変されたガイドは、CRISPR系によって遺伝子編集された細胞の同定又は集積に使用することができる（Lee et al., eLife, 2017, 6:e25312, DOI:10.7554を参照されたい）。

【0156】

一部の実施形態において、ガイドの改変は、化学的改変、挿入、欠失又は分割である。一部の実施形態において、化学的改変には、限定はされないが、2'-O-メチル（M）類似体、2'-デオキシ類似体、2'-チオウリジン類似体、N6-メチルアデノシン類似体、2'-フルオロ類似体、2'-アミノプリン、5'-プロモウリジン、プソイドウリジン（Ψ）、N1-メチルプソイドウリジン（me1Ψ）、5'-メトキシウリジン（5moU）、イノシン、7-メチルグアノシン、2'-O-メチル-3'-ホスホロチオエート（MS）、S-拘束エチル（cEt）、ホスホロチオエート（PS）又は2'-O-メチル-3'-チオPACE（MSP）の取り込みが含まれる。一部の実施形態において、ガイドは、ホスホロチオエート改変の1つ以上を含む。特定の実施形態において、ガイドの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又は25ヌクレオチドが化学的に改変される。特定の実施形態において、シード領域の1ヌクレオチド以上が化学的に改変される。特定の実施形態において、5'末端の1ヌクレオチド以上が化学的に改変される。特定の実施形態において3'-ハンドルのいかなるヌクレオチドも化学的に改変されない。一部の実施形態において、シード領域の化学的改変は、2'-フルオロ類似体の取り込みなど、軽微な改変である。具体的な実施形態において、シード領域の1ヌクレオチドが2'-フルオロ類似体に置き換えられる。一部の実施形態において、5'末端の5又は10ヌクレオチドが化学的に改変される。Cas13b CrRNAの5'末端のかかる化学的改変により遺伝子切断効率が向上し得る。具体的な実施形態において、5'末端の5ヌクレオチドが2'-フルオロ類似体に置き換えられる。具体的な実施形態において、5'末端の10ヌクレオチドが2'-フルオロ類似体に置き換えられる。具体的な実施形態において、5'末端の5ヌクレオチドが2'-O-メチル（M）類似体に置き換えられる。

【0157】

一部の実施形態において、ガイドの3'-ハンドルのループが改変される。一部の実施形態において、ガイドの3'-ハンドルのループが欠失、挿入、分割又は化学的改変を有するように改変される。特定の実施形態において、ループは、3、4又は5ヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、ループは、UCUU、UUUU、UAUU又はUGUUの配列を含む。

【0158】

一態様において、ガイドは、非リン酸ジエステル結合を介して化学的に連結又はコンジュゲートしている部分を含む。一態様において、ガイドは、非限定的な例において、非ヌクレオチドループを介して化学的に連結又はコンジュゲートしているダイレクトリピート及びターゲティング配列を含む。一部の実施形態において、これらの部分は、非リン酸ジエステル共有結合性リンカーを介してつなぎ合わされる。共有結合性リンカーの例としては、限定はされないが、カルバミン酸塩類、エーテル類、エステル類、アミド類、イミン類、アミジン類、アミノトリジン類（aminotrizines）、ヒドロゾン（hydrozone）、ジスルフィド類、チオエーテル類、チオエステル類、ホスホロチオエート類、ホスホロジチオエート類、スルホンアミド類、スルホン酸塩類、フルホン類（ulfones）、スルホキシド類、尿素類、チオ尿素類、ヒドラジド、オキシム、トリアゾール、光解離性連結、ディールス・アルダー環化付加対又は閉環メタセシス対などの

C-C結合形成基及びマイケル反応対からなる群から選択される化学的部分が挙げられる。

【0159】

一部の実施形態において、ガイドの部分は、初めに標準的なホスホラミダイト合成プロトコルを用いて合成される (Herdewijn, P., ed., *Methods in Molecular Biology* Col 288, "Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications", Humana Press, New Jersey (2012))。一部の実施形態において、ノンターゲットガイド部分は、ライゲーションに適切な官能基を含むように、当該技術分野において公知の標準プロトコルを用いて官能化され得る (Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press (2013))。官能基の例としては、限定はされないが、ヒドロキシル、アミン、カルボン酸、カルボン酸ハロゲン化物、カルボン酸活性エステル、アルデヒド、カルボニル、クロロカルボニル、イミダゾリルカルボニル、ヒドロジド (hydrozide)、セミカルバジド、チオセミカルバジド、チオール、マレイミド、ハロアルキル、スホニル (sulfonyl)、アリ (ally)、プロパルギル、ジエン、アルキン及びアジドが挙げられる。ガイドのノンターゲット部分が官能化されると、2つのオリゴヌクレオチド間に共有結合性の化学結合又は連結が形成され得る。化学結合の例としては、限定はされないが、カルバミン酸塩類、エーテル類、エステル類、アミド類、イミン類、アミジン類、アミノトリジン類 (aminotrizines)、ヒドロゾン (hydrozone)、ジスルフィド類、チオエーテル類、チオエステル類、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート類、スルホンアミド類、スルホン酸塩、フルホン類 (fulfones)、スルホキシド類、尿素類、チオ尿素類、ヒドラジド、オキシム、トリアゾール、光解離性連結、ディールス・アルダー環化付加対又は閉環メタセシス対などのC-C結合形成基及びマイケル反応対をベースとするものが挙げられる。

10

20

【0160】

一部の実施形態において、ガイドの1つ以上の部分は、化学的に合成することができる。一部の実施形態において、化学合成は、2'-アセトキシエチルオルトエステル (2'-ACE) (Scaringe et al., J. Am. Chem. Soc. (1998) 120:11820-11821; Scaringe, *Methods Enzymol.* (2000) 317:3-18) 又は2'-チオノカルバメート (2'-TC) 化学 (Dellinger et al., J. Am. Chem. Soc. (2011) 133:11540-11546; Hendel et al., *Nat. Biotechnol.* (2015) 33:985-989) を伴う自動化された固相オリゴヌクレオチド合成機を使用する。

30

【0161】

一部の実施形態において、ガイド部分は、様々なバイオコンジュゲーション反応、ループ、架橋並びに糖修飾、インターヌクレオチドリノ酸ジエステル結合、プリン及びピリミジン残基を介した非ヌクレオチド連結を用いて共有結合的に連結することができる。Sl etten et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* (2009) 48:6974-6998; Manoharan, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2004) 8:570-9; Behlke et al., *Oligonucleotides* (2008) 18:305-19; Watts, et al., *Drug. Discov. Today* (2008) 13:842-55; Shukla, et al., *ChemMedChem* (2010) 5:328-49。

40

【0162】

一部の実施形態において、ガイド部分は、クリック化学を用いて共有結合的に連結することができる。一部の実施形態において、ガイド部分は、トリアゾールリンカーを用いて共有結合的に連結することができる。一部の実施形態において、ガイド部分は、高度に安定したトリアゾールリンカーを生じさせるアルキン及びアジドが関わるヒュスゲン1, 3

50

一 双極性環化付加反応を用いて共有結合的に連結することができる (He et al., ChemBioChem (2015) 17:1809-1812; 国際公開第2016/186745号パンフレット)。一部の実施形態において、ガイド部分は、5'-ヘキシン部分と3'-アジド部分とのライゲーションにより共有結合的に連結することができる。一部の実施形態において、5'-ヘキシンガイド部分及び3'-アジドガイド部分のいずれか一方又は両方を2'-アセトキシエチルオルトエステル(2'-ACE)基で保護することができ、これは、続いてダーマコン(Dharmacon)プロトコルを用いて取り除くことができる(Scarlinge et al., J. Am. Chem. Soc. (1998) 120:11820-11821; Scarlinge, Methods Enzymol. (2000) 317:3-18)。

10

【0163】

一部の実施形態において、ガイド部分は、スペーサー、アタッチメント、バイオコンジュゲート、発色団、レポーター群、色素標識RNA及び天然に存在しないヌクレオチド類似体などの部分を含むリンカー(例えば、非ヌクレオチドループ)を介して共有結合的に連結することができる。より具体的には、本発明の目的に好適なスペーサーとしては、限定はされないが、ポリエーテル類(例えば、ポリエチレングリコール類、多価アルコール類、ポリプロピレングリコール又はエチレンとプロピレングリコール類との混合物)、ポリアミン基(例えば、スペンニン(spennine)、スペルミジン及びそのポリマー誘導体)、ポリエステル類(例えば、ポリ(アクリル酸エチル))、ポリホスホジエステル類、アルキレン類及びこれらの組み合わせが挙げられる。好適なアタッチメントとしては、限定はされないが、蛍光標識など、リンカーに追加的な特性を加えるためリンカーに加えることのできる任意の部分が挙げられる。好適なバイオコンジュゲートとしては、限定はされないが、ペプチド、グリコシド、脂質、コレステロール、リン脂質、ジアシルグリセロール類及びジアルキルグリセロール類、脂肪酸、炭化水素、酵素基質、ステロイド類、ビオチン、ジゴキシゲニン、炭水化物、多糖が挙げられる。好適な発色団、レポーター群及び色素標識RNAとしては、限定はされないが、フルオレセイン及びローダミンなどの蛍光色素、化学発光、電気化学発光及び生物発光マーカー化合物が挙げられる。2つのRNA成分をコンジュゲートする例示的なリンカーの設計については、国際公開第2004/015075号パンフレットにも記載されている。

20

【0164】

リンカー(例えば、非ヌクレオチドループ)は、任意の長さであり得る。一部の実施形態において、リンカーは、約0~16ヌクレオチドに等しい長さを有する。一部の実施形態において、リンカーは、約0~8ヌクレオチドに等しい長さを有する。一部の実施形態において、リンカーは、約0~4ヌクレオチドに等しい長さを有する。一部の実施形態において、リンカーは、約2ヌクレオチドに等しい長さを有する。例示的なリンカー設計については、国際公開第2011/008730号パンフレットにも記載されている。

30

【0165】

一部の実施形態において、相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを用いて最適にアラインメントしたとき、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%以上であるか又はそれより高い。最適アラインメントは、配列のアラインメントに好適な任意のアルゴリズムを用いて決定することができ、その非限定的な例としては、スミスーウォーターマンアルゴリズム、ニードルマンーブンシュアルゴリズム、バローズーホイラー変換に基づくアルゴリズム(例えば、バローズ・ホイラーアライナー)、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign(Novocraft Technologies; www.novocraft.comにおいて利用可能)、ELAND(Illumina, San Diego, CA)、SOAP(soap.genomics.org.cnにおいて利用可能)及びMaq(maq.sourceforge.netにおいて利用可能)が挙げられる。ガイド配列(RNAターゲティングガイドRNA又はcrRNA内にある)が標的核酸配列への核酸ターゲティング複合体の配列特異的結合を導く能力は、任意の好適なアッセイによ

40

50

って評価され得る。例えば、核酸ターゲティング複合体を形成するのに十分なRNAターゲティングCRISPR Cas13b系の構成成分は、試験しようとするガイド配列を含め、対応する標的核酸配列を有する宿主細胞へと、核酸ターゲティング複合体の構成成分をコードするベクターのトランスフェクションによるなどして提供され得、続いて本明細書に記載されるとおりのSurveyorアッセイなどにより、標的核酸配列内における優先的なターゲティング（例えば、切断）を評価し得る。同様に、標的核酸配列の切断は、標的核酸配列、試験しようとするガイド配列を含めた核酸ターゲティング複合体の構成成分及び供試ガイド配列と異なる対照ガイド配列を提供して、それらの供試ガイド配列と対照ガイド配列との反応間で標的配列における結合又は切断速度を比較することにより、試験管内で判定することができる。他のアッセイも可能であり、当業者に想起されるであろう。ガイド配列、従ってRNAターゲティングガイドRNA又はcrRNAは、任意の標的核酸配列を標的化するように選択され得る。標的配列は、DNAであり得る。標的配列は、任意のRNA配列であり得る。一部の実施形態において、標的配列は、メッセンジャーRNA（mRNA）、プレmRNA、リボソームRNA（rRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、マイクロRNA（miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、核内低分子RNA（snRNA）、核小体低分子RNA（snoRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、非コードRNA（ncRNA）、長鎖非コードRNA（lncRNA）及び低分子細胞質RNA（scRNA）からなる群から選択されるRNA分子内の配列であり得る。一部の好ましい実施形態において、標的配列は、mRNA、プレmRNA及びrRNAからなる群から選択されるRNA分子内の配列であり得る。一部の好ましい実施形態において、標的配列は、ncRNA及びlncRNAからなる群から選択されるRNA分子内の配列であり得る。一部のより好ましい実施形態において、標的配列は、mRNA分子又はプレmRNA分子内の配列であり得る。

【0166】

一部の実施形態において、RNAターゲティングガイドRNA又はcrRNAは、そのRNAターゲティングガイドRNA又はcrRNA内の二次構造度が低下するように選択される。一部の実施形態において、RNAターゲティングガイドRNAの約75%、50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%以下の又はそれより少ないヌクレオチドは、最適に折り畳まれたとき、自己相補的塩基対合に参与する。最適な折り畳みは、任意の好適なポリヌクレオチド折り畳みアルゴリズムによって決定され得る。一部のプログラムは、最小ギブズ自由エネルギーを計算することに基づく。1つのかかるアルゴリズムの例は、Zuker and Stiegler（Nucleic Acids Res. 9（1981），133-148）によって記載されるとおりのmFoldである。別の例示的折り畳みアルゴリズムは、ウィーン大学（University of Vienna）の理論化学研究所（Institute for Theoretical Chemistry）で開発された、セントロイド構造予測アルゴリズムを用いるオンラインウェブサーバーRNAfoldである（例えば、A. R. Gruber et al., 2008, Cell 106（1）：23-24；及びPA Carr and GM Church, 2009, Nature Biotechnology 27（12）：1151-62を参照されたい）。

【0167】

特定の実施形態において、ガイドRNA又はcrRNAは、ダイレトリピート（DR）配列及びガイド配列又はスパーサー配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。特定の実施形態において、ガイドRNA又はcrRNAは、ガイド配列又はスパーサー配列に融合又は連結したダイレトリピート配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、又はそれからなり得る。特定の実施形態において、ダイレトリピート配列は、ガイド配列又はスパーサー配列より上流（即ち5'側）に位置し得る。他の実施形態において、ダイレトリピート配列は、ガイド配列又はスパーサー配列より下流（即ち3'側）に位置し得る。他の実施形態において、複数のDR（デュアルDRなど）が存在し得る。

【0168】

特定の実施形態において、crRNAは、ステムループ、好ましくは単一のステムループを含む。特定の実施形態において、ダイレクトリピート配列は、ステムループ、好ましくは単一のステムループを形成する。

【0169】

特定の実施形態において、ガイドRNAのスペーサー長さは、15～35 ntである。特定の実施形態において、ガイドRNAのスペーサー長さは、少なくとも15ヌクレオチドである。特定の実施形態において、スペーサー長さは、15～17 nt、例えば15、16又は17 nt、17～20 nt、例えば17、18、19又は20 nt、20～24 nt、例えば20、21、22、23又は24 nt、23～25 nt、例えば23、24又は25 nt、24～27 nt、例えば24、25、26又は27 nt、27～30 nt、例えば27、28、29又は30 nt、30～35 nt、例えば30、31、32、33、34、又は35 nt、又は35 nt以上である。

【0170】

干渉性RNA (RNAi) 及びマイクロRNA (miRNA)

他の実施形態において、標的RNAには、真核生物及び原核生物の両方の干渉性RNA、即ちRNA干渉経路に関与するRNA、例えばshRNA、siRNAなどが含まれ得る。他の実施形態において、標的RNAにはマイクロRNA (miRNA) が含まれ得る。干渉性RNA又はmiRNAの制御は、インビボ又はインビトロで干渉性RNA又はmiRNAの寿命を短縮することによる手法で見られるオフターゲット効果 (OTE) を低減することを促進し得る。

【0171】

特定の実施形態において、標的は、miRNA自体でなく、miRNA標的のmiRNA結合部位である。

【0172】

特定の実施形態において、miRNAは、(細胞内で再配置されることを含むなど) 隔離され得る。特定の実施形態において、miRNAは、限定なしにヘアピンなどで切断され得る。

【0173】

特定の実施形態において、miRNAプロセッシング (代謝回転を含むなど) は、増加又は減少する。

【0174】

エフェクタータンパク質及び好適なガイドが (例えば、空間的又は時間的に好適なプロモーター、例えば組織特異的又は細胞周期特異的プロモーター及び/又はエンハンサーの制御下で) 選択的に発現する場合、これを用いて細胞又は系を (インビボ又はインビトロで) その細胞におけるRNAiから「保護」することができるであろう。これは、RNAiが必要ない隣接組織又は細胞において、又はエフェクタータンパク質及び好適なガイドが発現する及び発現しない (即ちそれぞれRNAiが制御されない及びそれが制御される) 細胞又は組織を比較する目的で有用であり得る。エフェクタータンパク質を使用して、リボザイム、リボソーム又はリボスイッチなど、RNAを含むか又はそれからなる分子を制御するか又はそれに結合し得る。本発明の実施形態では、RNAガイドがエフェクタータンパク質をそうした分子に動員することにより、エフェクタータンパク質は、それらに結合することが可能になる。

【0175】

本発明のタンパク質系は、本願がこの系を情報に基づいてエンジニアリングするための基礎を提供するため、本開示から、過度の実験を行うことなく、治療法、アッセイ及び他の適用を含め、RNAi技術の領域において適用することができる (例えば、Guidi et al., PLoS Negl Trop Dis 9 (5): e0003801. doi:10.1371/journal.pntd; Crotty et al., “In vivo RNAi screens: concepts and appli

cations". Shane Crotty. . . 2015 Elsevier Ltd. Published by Elsevier Inc., Pesticide Biochemistry and Physiology (Impact Factor : 2.01). 01/2015; 120. DOI:10.1016/j.pestbp.2015.01.002及びMakkonen et al., Viruses 2015, 7(4), 2099-2125; doi:10.3390/v7042099を参照されたい)。

【0176】

リボソームRNA (rRNA)

例えば、アジスロマイシンなどのアザライド系抗生物質は、周知である。これは、50Sリボソームサブユニットを標的としてそれを破壊する。本エフェクタータンパク質は、50Sリボソームサブユニットを標的とする好適なガイドRNAと共に、一部の実施形態において、50Sリボソームサブユニットに動員されて、それに結合し得る。従って、リボソーム（特に50Sリボソームサブユニット）標的に向けられた好適なガイドと合わせた本エフェクタータンパク質が提供される。リボソーム（特に50Sリボソームサブユニット）標的に向けられた好適なガイドと合わせたこの使用エフェクタータンパク質の使用には、抗生物質としての使用が含まれ得る。詳細には、抗生物質としての使用は、アジスロマイシンなどのアザライド系抗生物質の機能と類似している。一部の実施形態では、原核生物リボソームサブユニット、例えば原核生物の70Sサブユニット、上述の50Sサブユニット、30Sサブユニット並びに16S及び5Sサブユニットが標的とされ得る。他の実施形態では、真核生物リボソームサブユニット、例えば真核生物の80Sサブユニット、60Sサブユニット、40Sサブユニット並びに28S、18S、5.8S及び5Sサブユニットが標的とされ得る。

【0177】

一部の実施形態において、エフェクタータンパク質は、本明細書に記載されるとおりの任意選択で機能化されたRNA結合タンパク質であり得る。一部の実施形態において、エフェクタータンパク質は、RNAの一本鎖を切断するRNA結合タンパク質であり得る。いずれの場合にも、しかし、特にRNA結合タンパク質がRNAの一本鎖を切断する場合、リボソーム機能が調節され得、詳細にはそれが低減又は破壊され得る。これは、任意のリボソームRNA及び任意のリボソームサブユニットに適用され得、rRNAの配列は、

【0178】

従って、リボソーム標的に対する好適なガイドと合わせた本エフェクタータンパク質の使用によるリボソーム活性の制御が想定される。これは、リボソームの切断又はそれへの結合によるものであり得る。詳細には、リボソーム活性の低減が想定される。これは、リボソーム機能のインビボ又はインビトロアッセイにおいて、またリボソーム活性に基づく治療をインビボ又はインビトロで制御する手段としても有用であり得る。更に、インビボ系又はインビトロ系におけるタンパク質合成の制御（即ち低減）が想定され、かかる制御には抗生物質としての使用並びに研究及び診断上の使用が含まれる。

【0179】

リボスイッチ

リボスイッチ（アプタザイムとしても知られる）は、小分子に結合するメッセンジャーRNA分子の調節性セグメントである。これは、典型的には、mRNAによってコードされるタンパク質の産生の変化をもたらす。従って、リボスイッチ標的に対する好適なガイドと合わせた本エフェクタータンパク質の使用によるリボスイッチ活性の制御が従って想定される。これは、リボスイッチの切断又はそれへの結合によるものであり得る。詳細には、リボスイッチ活性の低減が想定される。これは、リボスイッチ機能のインビボ又はインビトロアッセイにおいて、またリボスイッチ活性に基づく治療をインビボ又はインビトロで制御する手段としても有用であり得る。更に、インビボ系又はインビトロ系におけるタンパク質合成の制御（即ち低減）が想定される。この制御には、rRNAに関する限り

、抗生物質としての使用並びに研究及び診断上の使用が含まれ得る。

【0180】

リボザイム

リボザイムは、酵素（これは、当然ながら、タンパク質である）と類似した、触媒特性を有するRNA分子である。リボザイムは、天然に存在するもの及びエンジニアリングされたものの両方ともRNAを含むか又はそれからなるため、同様に本RNA結合エフェクタータンパク質の標的となり得る。一部の実施形態において、エフェクタータンパク質は、リボザイムを切断して、それによりそれを無効にするRNA結合タンパク質であり得る。従って、リボザイム標的に対する好適なガイドと合わせた本エフェクタータンパク質の使用によるリボザイム活性の制御が想定される。これは、リボザイムの切断又はそれへの結合によるものであり得る。詳細には、リボザイム活性の低減が想定される。これは、リボザイム機能のインビボ又はインビトロアッセイにおいて、またリボザイム活性に基づく治療をインビボ又はインビトロで制御する手段としても有用であり得る。

10

【0181】

RNAプロセッシングを含めた遺伝子発現

エフェクタータンパク質は、好適なガイドと共に、RNAプロセッシングの制御によることを含めた遺伝子発現のターゲティングにも使用され得る。RNAプロセッシングの制御には、RNA polのターゲティングによる選択的スプライシングを含めたRNAスプライシング；植物のウイロイドを含め、ウイルス複製（詳細には、サテライトウイルス、バクテリオファージ及びレトロウイルス、例えばHBV、HBC及びHIV並びに本明細書に挙げられる他のウイルスのもの）；及びtRNA生合成などのRNAプロセッシング反応が含まれ得る。エフェクタータンパク質及び好適なガイドは、RNA活性化（RNAa）の制御にも使用され得る。RNAaは、遺伝子発現の促進につながり、そのため、遺伝子発現の制御は、RNAaの破壊又は低減、従って遺伝子発現の促進低下による形で実現し得る。これについて以下で更に詳細に考察する。

20

【0182】

RNAiスクリーン

RNAiスクリーンにより、そのノックダウンが表現型の変化に関連する遺伝子産物を同定して、生物学的経路を調べ及び構成要素を同定することができる。エフェクタータンパク質及び好適なガイドを使用してスクリーンにおけるRNAiの活性を除去し又は低下させ、従って（それまで干渉を受けていた）遺伝子産物の活性を（干渉／抑制を除去するか又は低下させることで）回復させることにより、こうしたスクリーンにも又はスクリーンの間も制御を及ぼし得る。

30

【0183】

サテライトRNA（satRNA）及びサテライトウイルスも処理し得る。

【0184】

RNアーゼ活性に関連する本明細書の制御は、概して、低減、負の破壊又はノックダウン若しくはノックアウトを意味する。

【0185】

インビボRNA適用

遺伝子発現の阻害

本明細書に提供される標的特異的RNアーゼは、標的RNAの極めて特異的な切断が可能である。RNAレベルでの干渉は、空間的及び時間的の両方の、且つゲノムが改変されないため非侵襲的な方法での調節が可能である。

40

【0186】

幾つもの疾患がmRNAターゲティングによって治療可能であることが実証されている。それらの研究のほとんどは、siRNAの投与に関するが、本明細書に提供されるRNAターゲティングエフェクタータンパク質を同じように適用し得ることが明らかである。

【0187】

mRNA標的（及び対応する疾患治療）の例は、VEGF、VEGF-R1及びRTP

50

801 (AMD及び／又はDMEの治療に)、カスパーゼ2 (Nai onの治療に)、ADRB2 (眼圧の治療に)、TRPVI (ドライアイ症候群の治療に、Sykキナーゼ (喘息の治療に)、Apo B (高コレステロール血症又は低βリポ蛋白血症の治療に)、PLK1、KSP及びVEGF (固形腫瘍の治療に)、Ber-Abl (CMLの治療に) である (Burnett and Rossi Chem Biol. 2012, 19 (1): 60-71))。同様に、RNAターゲティングは、HIV (HIV Tet及びRevのターゲティング)、RSV (RSVヌクレオカプシドのターゲティング) 及びHCV (miR-122のターゲティング) など、RNAウイルス媒介性疾患の治療に有効であることが実証されている (Burnett and Rossi Chem Biol. 2012, 19 (1): 60-71)。

10

【0188】

更に、本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を突然変異特異的又はアレル特異的ノックダウンに使用し得ることが想定される。突然変異を含む転写されたmRNAの配列又はアレル特異的配列を特異的に標的化するガイドRNAを設計することができる。かかる特異的ノックダウンは、突然変異した又はアレル特異的な遺伝子産物に伴う障害に関する治療適用に特に好適である。例えば、家族性低βリポ蛋白血症 (FHBL) のほとんどの症例は、ApoB遺伝子の突然変異によって引き起こされる。この遺伝子は、2つのバージョンのアポリポタンパク質Bタンパク質：短いバージョン (ApoB-48) 及びより長いバージョン (ApoB-100) をコードする。FHBLにつながる幾つかのApoB遺伝子突然変異は、両方のバージョンのApoBを異常に短くする。突然変異したApoB mRNA転写物を本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質で特異的にターゲティング及びノックダウンすることは、FHBLの治療において有益であり得る。別の例として、ハンチントン病 (HD) は、ハンチンチンタンパク質をコードする遺伝子のCAGトリプレットリピートの伸長により異常なタンパク質が生じて引き起こされる。ハンチンチンタンパク質をコードする突然変異した又はアレル特異的なmRNA転写物を本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質で特異的にターゲティング及びノックダウンすることは、HDの治療において有益であり得る。

20

【0189】

これに関連して及びより一般的に本明細書に記載されるとおりの様々な適用について、スプリットバージョンのRNAターゲティングエフェクタータンパク質の使用を想定し得ることが注記される。実際、これは、特異性の増加を可能にし得るのみならず、送達にも有利であり得る。Cas13bは、Cas13b酵素の2つのパートが実質的に機能性Cas13bをなすという意味でスプリットである。理想的には、スプリットは、常に、触媒ドメインが影響を受けないようなものでなければならない。このCas13bは、ヌクレアーゼとして機能し得るか、又はそれは、典型的にはその触媒ドメインの突然変異に起因して、本質的に触媒活性をほぼ又は全く有さないRNA結合タンパク質であるデッドCas13bであり得る。

30

【0190】

スプリットCas13bの各半分は、二量化パートナーに融合され得る。例として及び限定ではなく、ラバマイシン感受性二量化ドメインを用いると、Cas13b活性を時間的に制御するための化学的に誘導可能なスプリットCas13bの作成が可能となる。従って、Cas13bは、2つの断片に分割することにより化学的に誘導可能にすることができ、このラバマイシン感受性二量化ドメインを使用してCas13bを制御された形で再アセンブルし得る。スプリットCas13bの2つのパートは、スプリットCas13bのN'末端パート及びC'末端パートと考えることができる。この融合は、典型的にはCas13bのスプリット点である。換言すれば、スプリットCas13bのN'末端パートのC'末端が二量体半体の一方に融合する一方、C'末端パートのN'末端が他方の二量体半体に融合する。

40

【0191】

Cas13bは、切断点が新しく作り出されるという意味で分割される必要はない。ス

50

プリット点は、典型的にはインシリコで設計され、構築物にクローニングされる。一緒になって、スプリット Cas 13 b の 2 つのパート、N' 末端パート及び C' 末端パートは、好ましくは、野生型アミノ酸（又はそれをコードするヌクレオチド）の少なくとも 70 % 以上、好ましくは野生型アミノ酸（又はそれをコードするヌクレオチド）の少なくとも 80 % 以上、好ましくは少なくとも 90 % 以上、好ましくは少なくとも 95 % 以上及び最も好ましくは少なくとも 99 % 以上を含む完全な Cas 13 b を形成する。何らかのトリミングがある可能性があり得、突然変異体が想定される。非機能性ドメインは、完全に除去され得る。重要な点は、2 つのパートが一体にされ得ること及び所望の Cas 13 b 機能が回復するか又は元に戻ることである。二量体は、ホモ二量体又はヘテロ二量体であり得る。

10

【0192】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの Cas 13 b エフェクターは、突然変異特異的又はアレル特異的のノックダウンなど、突然変異特異的又はアレル特異的のターゲティングに用いられ得る。

【0193】

RNA ターゲティングエフェクタータンパク質は、相乗作用して RNA アーゼ活性を増加させるか又はメッセージの更なる分解を確実にする、非特異的 RNA アーゼ又はアルゴノート 2 などの別の機能性 RNA アーゼドメインに更に融合することができる。

【0194】

RNA 機能の調節による遺伝子発現の調節

20

【0195】

mRNA の切断による遺伝子発現への直接的な効果を別として、RNA ターゲティングは、細胞内での RNA プロセシングの特定の側面に影響を与えるためにも使用することができる。これにより遺伝子発現をより繊細に調節することが可能となり得る。概して、調節は、例えば、タンパク質の結合を遮断するか、又は RNA 結合タンパク質を動員するなど、例えば RNA へのタンパク質の結合に干渉することにより媒介され得る。実際、調節は、mRNA のスプライシング、輸送、局在、翻訳及び代謝回転など、種々のレベルで確実とし得る。治療のコンテキストでも同様に、RNA 特異的ターゲティング分子を使用することにより、これらのレベルの各々において（病原性の）機能不全に対処することが想定され得る。これらの実施形態では、多くの場合、RNA ターゲティングタンパク質は、本明細書に記載される突然変異型の Cas 13 b など、RNA 標的を切断する能力を失った、しかしそれに結合するその能力を維持している「デッド」Cas 13 b であることが好ましい。

30

【0196】

A) 選択的スプライシング

【0197】

ヒト遺伝子の多くは、選択的スプライシングの結果として複数の mRNA を発現する。種々の疾患は、発現した遺伝子の機能喪失又は機能獲得につながる異常なスプライシングに関係することが示されている。こうした疾患には、スプライシング欠損を引き起こす突然変異によって引き起こされるものもあるが、そうでないものも多数ある。1 つの治療選択肢は、スプライシング機構を直接標的化することである。本明細書に記載される RNA ターゲティングエフェクタータンパク質は、例えば、スプライシングの遮断又は促進、エクソンのインクルージョン又はエクスクルージョン及び特異的アイソフォームの発現への影響付与及び／又は代替的タンパク質産物の発現の刺激に使用することができる。かかる適用について、以下に更に詳細に記載する。

40

【0198】

RNA ターゲティングエフェクタータンパク質が標的 RNA に結合すると、RNA 配列へのスプライシング因子の接近を立体的に遮断することができる。スプライス部位を標的とする RNA ターゲティングエフェクタータンパク質は、その部位でスプライシングを遮断し、任意選択でスプライシングを隣接する部位に向け直し得る。例えば、5' スプライ

50

ス部位に結合するRNAターゲティングエフェクタータンパク質の結合は、スプライソソームのU1成分の動員を遮断することができ、そのエクソンのスキッピングに有利である。代わりに、スプライシングエンハンサー又はサイレンサーを標的とするRNAターゲティングエフェクタータンパク質は、標的部位におけるトランス作用性調節性スプライシング因子の結合を妨げ、スプライシングを有効に遮断又は促進することができる。更に、本明細書に記載されるとおりのRNAターゲティングエフェクタータンパク質によってILF2/3を前駆mRNAのエクソン近傍に動員することにより、エクソンエクスクルージョンを実現することができる。更に別の例として、hnRNP A1の動員及びエクソンエクスクルージョンのため、グリシンリッチドメインを付加することができる (De la Gattola-Konczak et al. Mol Cell Biol. 1999 Jan; 19(1): 251-60)。

【0199】

特定の実施形態において、gRNAの適切な選択により、特定のスプライス変異体が標的化され得る一方、他のスプライス変異体が標的化されないことになる。

【0200】

ある場合には、RNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して、スライシングを促進することができる (例えば、スプライシングが欠損している場合)。例えば、更なるスプライシングのため、RNAターゲティングエフェクタータンパク質をスプライシング調節性ステムループの安定化能のあるエフェクターに会合させることができる。RNAターゲティングエフェクタータンパク質を特定のスプライシング因子のコンセンサス結合部位配列に連結すると、タンパク質を標的DNA又はRNAに動員することができる。

【0201】

異常なスプライシングと関連付けられている疾患の例としては、限定はされないが、シナプスで機能するタンパク質のスプライシングを調節するNovaタンパク質の喪失によって起こる傍腫瘍性眼球クロモス・ミオクロモス運動失調 (又はPOMA) 及び非機能性クロライドチャネルの産生をもたらす、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子のスプライシング欠損によって引き起こされる嚢胞性線維症が挙げられる。他の疾患では、異常なRNAスプライシングは、機能獲得をもたらす。これには、例えば、スプライシング欠損を生じさせるmRNAの3' UTRにおけるCUGトリプレットリピート伸長 (50 ~ > 1500リピート) によって引き起こされる筋強直性ジストロフィーが該当する。

【0202】

RNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して、スプライシング因子 (U1など) を5' スプライシング部位に動員して所望のエクソンの周りにあるイントロンの切出しを促進することにより、エクソンを除外することができる。かかる動員は、スプライシングアクチベーターとして機能するアルギニン/セリンリッチドメインとの融合によって媒介される可能性がある (Gravelly BR and Maniatis T, Mol Cell. 1998 (5): 765-71)。

【0203】

RNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して所望の遺伝子座におけるスプライシング機構を遮断し、それによりエクソン認識及び別のタンパク質産物の発現を妨げ得ることが想定される。治療し得る障害の例は、ジストロフィンタンパク質をコードする遺伝子の突然変異によって引き起こされるデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) である。ほぼ全てのDMD突然変異がフレームシフトにつながり、ジストロフィン翻訳が障害されることになる。RNAターゲティングエフェクタータンパク質をスプライスジャンクション又はエクソンスプライシングエンハンサー (ESE) と組み合わせて、それによってエクソン認識を妨げることにより、部分的に機能性のタンパク質の翻訳をもたらすことができる。これは、致死性デュシェンヌ表現型を重篤度の低いベッカー表現型に変換する。

【0204】

B) RNA 改変

【0205】

RNA 編集は、RNA の小さい改変によって所与の配列の遺伝子産物の多様性が増加する自然の過程である。典型的には、この改変には、そのゲノムによってコードされるものと異なる RNA 配列をもたらすアデノシン (A) からイノシン (I) への変換が関わる。RNA 改変は、概して ADAR 酵素によって確実となり、これによれば、pre-RNA 標的は、編集されるアデノシンを含むエクソンとイントロン非コードエレメントとの間の塩基対合によって不完全な二重鎖 RNA を形成する。A-I 編集の古典的な例は、グルタミン酸受容体 GluR-B mRNA であり、これによれば、この変化によってチャンネルのコンダクタンス特性が改変されることになる (Higuchi M, et al. Cell 11. 1993; 75: 1361-70)。

10

【0206】

本発明によれば、酵素的手法を用いて所与の転写物の RNA 塩基における転移 ($A \rightleftharpoons G$ 又は $C \rightleftharpoons U$ の変化) 又は転換 (任意のプリンから任意のピリミジン又はその逆) が誘導される。転移は、それぞれ A を I に又は C を U に変換する、アデノシン (ADAR1/2) 又はシトシンデアミナーゼ (APOBEC、AID) を使用して直接誘導することができる。転換は、目的の塩基に活性酸素種の損傷を局在させて、それによりグアニンからオキソグアニンへの変換など、影響を受けた塩基に化学修飾が加わることにより間接的に誘導することができる。オキソグアニンは、T として認識され、従ってアデニンと塩基対合して翻訳に影響を生じさせることになる。ROS 媒介性塩基損傷のために動員され得るタンパク質としては、APEX 及び mini-SOG が挙げられる。両方の手法とも、これらのエフェクターを触媒不活性 Cas13b に融合し、それらのタイプの突然変異が所望される転写物上の部位に動員することができる。

20

【0207】

ヒトでは、ADAR1 遺伝子におけるヘテロ接合機能的ヌル突然変異は、皮膚疾患、ヒト色素性遺伝性皮膚症につながる (Miyamura Y, et al. Am J Hum Genet. 2003; 73: 693-9)。本発明の RNA ターゲティングエフェクタータンパク質を使用して機能不全の RNA 改変を修正し得ることが想定される。

【0208】

更に、RNA アデノシンメチラーゼ (N(6)-メチルアデノシン) を本発明の RNA ターゲティングエフェクタータンパク質に融合して目的の転写物に標的化し得ることが想定される。このメチラーゼは、可逆的なメチル化を引き起こし、調節的役割を有し、且つ複数の RNA 関連細胞経路を調節することにより遺伝子発現及び細胞運命決定に影響を及ぼし得る (Fuet al Nat Rev Genet. 2014; 15(5): 293-306)。

30

【0209】

C) ポリアデニル化

【0210】

mRNA のポリアデニル化は、mRNA の核輸送、翻訳効率及び安定性に重要であり、これらの全て並びにまたポリアデニル化の過程が特定の RBP に依存する。多くの真核生物 mRNA は、転写後に約 200 ヌクレオチドの 3' ポリ (A) テールを受け取る。ポリアデニル化には、ポリ (A) ポリメラーゼの活性を刺激する種々の RNA 結合タンパク質複合体が関わる (Minvielle-Sebastia L et al. Curr Opin Cell Biol. 1999; 11: 352-7)。本明細書に提供される RNA ターゲティングエフェクタータンパク質を使用して RNA 結合タンパク質と RNA との間の相互作用に干渉するか又はそれを促進し得ることが想定される。

40

【0211】

ポリアデニル化に関わる欠陥タンパク質と関係付けられている疾患の例は、眼咽頭型筋ジストロフィー (OPMD) である (Brais B, et al. Nat Genet. 1998; 18: 164-7)。

50

【0212】

D) RNA 核外輸送

p r e -m R N A プロセッシング後、m R N A は、核から細胞質に輸送される。これは、キャリア複合体の生成を含む細胞機構によって確実となり、キャリア複合体は、次に、核膜孔を通して移動し、細胞質でm R N A を放出し、続いて、キャリアは、再利用される。

【0213】

R N A の核外輸送において役割を果たすタンパク質（T A P など）の過剰発現は、アフリカツメガエルにおいて本来非効率的に核外輸送される転写物の核外輸送を増加させることが分かっている（K a t a h i r a J , e t a l . E M B O J . 1 9 9 9 ; 1 8 : 2 5 9 3 - 6 0 9 ）。

10

【0214】

E) mRNA 局在

【0215】

m R N A 局在は、空間的に調節されたタンパク質産生を確実にする。細胞の特定の領域への転写物の局在は、局在化エレメントによって確実となり得る。詳細な実施形態において、本明細書に記載されるエフェクタータンパク質を使用して局在化エレメントを目的のR N A に標的化し得ることが想定される。エフェクタータンパク質は、標的転写物に結合して、それをそのペプチドシグナルタグによって決まる細胞内の位置にシャトル輸送するように設計することができる。例えば、より詳細には、1つ以上の核局在化シグナル（N L S ）及び／又は1つ以上の核外移行シグナル（N E S ）に融合したR N A ターゲティングエフェクタータンパク質を使用してR N A の局在性を変化させることができる。

20

【0216】

局在化シグナルの更なる例としては、幾つかの非対称細胞型における細胞質へのβ-アクチンの局在を確実にするジップコード結合タンパク質（Z B P 1 ）、K D E L 保持配列（小胞体への局在化）、核外移行シグナル（細胞質への局在化）、ミトコンドリア標的シグナル（ミトコンドリアへの局在化）、ペルオキシソーム標的シグナル（ペルオキシソームへの局在化）及びm 6 A 標識／Y T H D F 2 （p ボディへの局在化）が挙げられる。想定される他の手法は、R N A ターゲティングエフェクタータンパク質と既知の局在（例えば、膜、シナプス）のタンパク質の融合である。

【0217】

30

代わりに、本発明に係るエフェクタータンパク質は、例えば、局在依存性ノックダウンに使用し得る。エフェクタータンパク質を適切な局在化シグナルと融合することにより、エフェクターが特定の細胞内区画に標的化される。この区画にある標的R N A のみが有効に標的化されることになる一方、他の同一の、しかし別の細胞内区画にある標的が標的化されず、従って局在依存性ノックダウンを成立させることができる。

【0218】

F) 翻訳

【0219】

本明細書に記載されるR N A ターゲティングエフェクタータンパク質を使用して翻訳を増進させるか又は抑制することができる。翻訳の上方制御は、細胞回路を制御する極めてロバストな方法であることが想定される。更に、機能研究には、転写物の上方制御がタンパク質産生の増加につながらないという欠点がある転写上方制御スクリーンと比べてタンパク質翻訳スクリーンが有利であり得る。

40

【0220】

本明細書に記載されるR N A ターゲティングエフェクタータンパク質を使用してE I F 4 G などの翻訳開始因子を目的のメッセンジャーR N A の5'非翻訳リピート（5' U T R ）の近傍に持っていき、翻訳をドライブし得ることが想定される（非再プログラム可能R N A 結合タンパク質についてD e G r e g o r i o e t a l . E M B O J . 1 9 9 9 ; 1 8 (1 7) : 4 8 6 5 - 7 4 に記載されるとおり）。別の例として、細胞質ポリ（A）ポリメラーゼのG L D 2 をR N A ターゲティングエフェクタータンパク質によっ

50

て標的mRNAに動員することができる。これによれば、標的mRNAの指向性のポリアダニル化と、それによる翻訳の刺激とが可能となり得る。

【0221】

同様に、本明細書において想定されるRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して、ZBP1など、mRNAの翻訳リプレッサーを遮断することができる(Huttemaier S, et al. Nature. 2005; 438: 512-5)。標的RNAの翻訳開始部位への結合により、翻訳が直接影響を受け得る。

【0222】

加えて、RNAアーゼ阻害薬など、mRNAを例えばその分解の防止によって安定化させるタンパク質にRNAターゲティングエフェクタータンパク質を融合すると、目的の転写物からのタンパク質産生を増加させることが可能である。

10

【0223】

本明細書に記載されるRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して、RNA転写物の5'UTR領域に結合し、且つリボソームの形成及び翻訳開始を妨げることにより翻訳を抑制し得ることが想定される。

【0224】

更に、RNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用してCCR4-NOTデアデニラーゼ複合体の一成分であるCaf1を標的mRNAに動員することにより、標的転写物の脱アダニル化及びタンパク質翻訳の阻害をもたらすことができる。

【0225】

例えば、本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して、治療的に関連性のあるタンパク質の翻訳を増加又は減少させることができる。RNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して翻訳を下方制御又は上方制御し得る治療適用の例は、筋萎縮性側索硬化症(ALS)及び心血管障害である。ALS運動皮質及び脊髄では、グリアグルタミン酸トランスポーターEAAT2レベルの低下が報告されていると共に、ALS脳組織でも複数の異常なEAAT2 mRNA転写物が報告されている。EAAT2タンパク質及び機能の喪失は、ALSにおける興奮毒性の主な原因であると考えられている。EAAT2タンパク質レベル及び機能の回復は、治療利益をもたらし得る。従って、RNAターゲティングエフェクタータンパク質を例えば上記に記載したとおりの翻訳リプレッサーの遮断又はmRNAの安定化によるEAAT2タンパク質の発現の上方制御に有益に使用することができる。アポリポタンパク質A1は、高密度リポタンパク質(HDL)の主要なタンパク質成分であり、ApoA1及びHDLは、概してアテローム形成抑制性であると考えられる。RNAターゲティングエフェクタータンパク質を、例えば上記に記載したとおりの翻訳リプレッサーの遮断又はmRNAの安定化によるApoA1の発現の上方制御に有益に使用し得ることが想定される。

20

30

【0226】

G) mRNA代謝回転

【0227】

翻訳は、mRNA代謝回転及び調節性mRNA安定性と密接に結び付いている。転写物の安定性には特異的タンパク質が関与することが記載されている(ニューロンにおけるELAV/Huタンパク質、Keene JD, 1999, Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 5-7)及びトリステトラプロリン(TTP)など。これらのタンパク質は、細胞質におけるメッセージの分解を保護することにより標的mRNAを安定化させる(Peng SS et al., 1988, EMBO J. 17: 3461-70)。

40

【0228】

本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して、mRNA代謝回転が影響を受けるように、mRNA転写物を安定化させる役割を果たすタンパク質の活性に干渉し得るか、又はそれを促進し得ることが想定され得る。例えば、RNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用してヒトTTPを標的RNAに動員すれば、アダニル酸

50

ーウリジル酸リッチエレメント（AUリッチエレメント）媒介性翻訳抑制及び標的分解が可能となり得る。AUリッチエレメントは、癌原遺伝子をコードする多くのmRNAの3' UTR、核内転写因子及びサイトカインに見られ、RNA安定性を促進する。別の例として、RNAターゲティングエフェクタータンパク質を、別のmRNA安定化タンパク質であるHuR（Hinman MN and Lou H, Cell Mol Life Sci 2008; 65: 3168-81）に融合してそれを標的転写物に動員することにより、その寿命を延ばすか、又は短命なmRNAを安定化させることができる。

【0229】

更に、本明細書に記載されるRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して標的転写物の分解を促進し得ることが想定される。例えば、m6Aメチルトランスフェラーゼを標的転写物に動員して転写物をPボディに局在させることにより、標的の分解をもたらすことができる。

【0230】

更に別の例として、本明細書に記載されるとおりのRNAターゲティングエフェクタータンパク質を非特異的エンドヌクレアーゼドメインPilT N末端（PIN）に融合することにより、それを標的転写物に動員し、且つその分解を可能にすることができる。

【0231】

傍腫瘍性神経障害（PND）関連脳脊髄炎及びニューロパチーの患者は、中枢神経系外の腫瘍におけるHuタンパク質に対する自己抗体を生成し（Szabo A et al. 1991, Cell. ; 67: 325-33、それは、次に、血液脳関門を通過する患者である。本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用してmRNA転写物への自己抗体の結合に干渉し得ることが想定され得る。

【0232】

筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ（DMPK）遺伝子の3' UTRにおける（CUG）_nの伸長によって引き起こされるジストロフィー1型（DM1）の患者は、核内へのかかる転写物の蓄積によって特徴付けられる。（CUG）_nリピートを標的とするエンドヌクレアーゼと融合した本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質であれば、かかる異常な転写物の蓄積を阻害し得ることが想定される。

【0233】

H) 多機能タンパク質との相互作用

【0234】

一部のRNA結合タンパク質は、多くのRNA上の複数の部位に結合して多様な過程で機能する。例えば、hnRNP A1タンパク質は、エクソンスプライシングサイレンサー配列に結合してスプライシング因子をアンタゴナイズし、テロメア末端に会合し（それによりテロメア活性を刺激する）、且つmiRNAに結合してドロシャ媒介性プロセッシングを促進し、それにより成熟に影響を及ぼすことが分かっている。本発明のRNA結合エフェクタータンパク質が1つ以上の位置でRNA結合タンパク質の結合に干渉し得ることが想定される。

【0235】

I) RNAフォールディング

【0236】

RNAは、その生物学的活性を発揮するため、定義付けられた構造をとる。代替的三次構造間でのコンホメーションの移行は、多くのRNA媒介性プロセスに決定的に重要である。しかしながら、RNAフォールディングは、幾つかの問題に関連し得る。例えば、RNAは、不適切な代替的コンホメーションへと折り畳まれて、それに維持される傾向があることもあり、且つ／又は正しい三次構造が代替的構造と比べて十分に熱力学的に好ましいといえないこともある。本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質、詳細には切断欠損又はデッドRNAターゲティングタンパク質を使用して（m）RNAのフォールディングを仕向け且つ／又はその正しい三次構造を確保し得る。

【0237】

特定の実施形態において、c r R N Aと複合体化したC a s 1 3 bは、標的R N Aへの結合時に活性化され、続いて任意の近接したs s R N A標的を切断する（即ち「コラテラル」又は「バイスタンダー」効果）。C a s 1 3 bは、コグネイト標的によってプライミングされると、他の（非相補的な）R N A分子を切断することができる。このような無差別的なR N A切断は、潜在的に細胞毒性を引き起こすか、又は他に細胞生理若しくは細胞状態に影響を及ぼす可能性がある。

【0238】

従って、特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系は、細胞の休眠の誘導に使用されるか又はそれにおける使用のためのものである。特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系は、細胞周期停止の誘導に使用されるか又はそれにおける使用のためのものである。特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系は、細胞成長及び／又は細胞増殖の低減に使用されるか又はそれにおける使用のためのものである。特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系は、細胞アネルギーの誘導に使用されるか又はそれにおける使用のためのものである。特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系は、細胞アポトーシスの誘導に使用されるか又はそれにおける使用のためのものである。特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系は、細胞壊死の誘導に使用されるか又はそれにおける使用のためのものである。特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系は、細胞死の誘導に使用されるか又はそれにおける使用のためのものである。特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系は、プログラム細胞死の誘導に使用されるか又はそれにおける使用のためのものである。

【0239】

特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系を導入又は誘導することを含む、細胞の休眠の誘導方法に関する。特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系を導入又は誘導することを含む、細胞周期停止の誘導方法に関する。特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系を導入又は誘導することを含む、細胞成長及び／又は細胞増殖の低減方法に関する。特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系を導入又は誘導することを含む、細胞アネルギーの誘導方法に関する。特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系を導入又は誘導することを含む、細胞アポトーシスの誘導方法に関する。特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系を導入又は誘導することを含む、細胞壊死の誘導方法に関する。特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系を導入又は誘導することを含む、プログラム細胞死の誘導方法に関する。

【0240】

本明細書に記載されるとおりの方法及び使用は、治療的又は予防的であり得、特定の細胞、細胞（部分）集団又は細胞型／組織型を標的とし得る。詳細には、本明細書に記載されるとおりの方法及び使用は、治療的又は予防的であり得、1つ以上の標的配列、例えば1つ以上の特定の標的RNA（例えば、ssRNA）を発現する特定の細胞、細胞（部分）集団又は細胞型／組織型を標的とし得る。限定なしに、標的細胞は、例えば、特定の転写物を発現する癌細胞、例えば所与のクラスのニューロン、例えば自己免疫を引き起こす（免疫）細胞又は特異的な（例えば、ウイルス性の）病原体に感染した細胞等であり得る。

【0241】

従って、特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系を導入又は誘導することを含む、望ましくない細胞（宿主細胞）の存在によって特徴付けられる病的状態を治療する方法に関する。特定の実施形態において、本発明は、望ましくない細胞（宿主細胞）の存在によって特徴付けられる病的状態を治療するための、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系の使用に関する。特定の実施形態において、本発明は、望ましくない細胞（宿主細胞）の存在によって特徴付けられる病的状態の治療における使用のための、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系に関する。好ましくは、CRISPR-Cas系は、望ましくない細胞に特異的な標的を標的とすることが理解されるべきである。特定の実施形態において、本発明は、癌を治療、予防又は軽減するための、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系の使用に関する。特定の実施形態において、本発明は、癌の治療、予防又は軽減における使用のための、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系に関する。特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系を導入又は誘導することを含む、癌を治療、予防又は軽減する方法に関する。好ましくは、CRISPR-Cas系は、癌細胞に特異的な標的を標的とすることが理解されるべきである。特定の実施形態において、本発明は、病原体による細胞の感染を治療、予防又は軽減するための、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系の使用に関する。特定の実施形態において、本発明は、病原体による細胞の感染の治療、予防又は軽減における使用のための、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系に関する。特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系を導入又は誘導することを含む、病原体による細胞の感染を治療、予防又は軽減する方法に関する。好ましくは、CRISPR-Cas系は、病原体に感染した細胞に特異的な標的（例えば、病原体由来の標的）を標的とすることが理解されるべきである。特定の実施形態において、本発明は、自己免疫障害を治療、予防又は軽減するための、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系の使用に関する。特定の実施形態において、本発明は、自己免疫障害の治療、予防又は軽減における使用のための、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系に関する。特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物、ベクター系又は送達系を導入又は誘導することを含む、自己免疫障害を治療、予防又は軽減する方法に関する。好ましくは、CRISPR-Cas系は、自己免疫障害に関与する細胞に特異的な標的（例えば、特異的免疫細胞）を標的とすることが理解されるべきである。

【0242】

RNA検出又はタンパク質検出におけるRNAターゲティングエフェクタータンパク質の使用

10

20

30

40

50

更に、RNAターゲティングエフェクタータンパク質を生体試料中の核酸又はタンパク質の検出に使用し得ることが想定される。試料は、細胞又は無細胞であり得る。

【0243】

更に、RNAターゲティングエフェクタータンパク質をノーザンブロットアッセイにおいて使用し得ることが想定される。ノーザンブロットイングには、電気泳動を用いたRNA試料のサイズによる分離が関わる。RNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して標的RNA配列を特異的に結合し、検出することができる。

【0244】

RNAターゲティングエフェクタータンパク質は、蛍光タンパク質（GFPなど）に融合して、生細胞におけるRNA局在の追跡に使用することもできる。より詳細には、RNAターゲティングエフェクタータンパク質は、それがもはやRNAを切断しない点で不活性化することができる。詳細な実施形態では、より精密な可視化を確保するため、スプリットRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用し得ることが想定され、これによれば、シグナルが両方のサブタンパク質の結合に依存する。代わりに、複数のRNAターゲティングエフェクタータンパク質複合体が標的転写物に結合すると再構成されるスプリット蛍光タンパク質を使用することができる。更に、転写物がmRNAに沿った複数の結合部位で標的とされ、そのため蛍光シグナルが真のシグナルを増幅して限局的な識別を可能にし得ることが想定される。更に別の代替形態として、蛍光タンパク質がスプリットインティンから再構成され得る。

【0245】

RNAターゲティングエフェクタータンパク質は、例えば、RNA又は特異的スプライス変異体の局在、mRNA転写物のレベル、転写物の上方又は下方制御及び疾患特異的診断の決定に好適に使用される。RNAターゲティングエフェクタータンパク質は、例えば、蛍光顕微鏡法又はフローサイトメトリー、例えば細胞のハイスループットスクリーニング及び細胞選別後の生細胞の回収を可能にする蛍光活性化細胞選別（FACS）などを用いた（生）細胞におけるRNAの可視化に使用することができる。更に、種々の転写物の発現レベルをストレス下、例えば分子障害薬又は細胞に対する低酸素条件を用いた癌成長の障害下で同時に評価することができる。別の適用は、2つの光子顕微鏡を用いて神経刺激中のシナプス結合への転写物の局在を追跡することであり得る。

【0246】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの本発明に係る成分又は複合体は、例えば、（蛍光）標識したCas13bエフェクターによるなど、多重化エラーロバスト蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（MERFISH；Chen et al. Science；2015；348（6233））において使用することができる。

【0247】

インビトロAPEX標識

細胞過程は、タンパク質、RNA及びDNA間の分子相互作用のネットワークに依存する。タンパク質-DNA及びタンパク質-RNA相互作用の正確な検出は、かかる過程の理解に重要である。インビトロ近接標識技術は、アフィニティータグを例えば光活性化可能なプローブと組み合わせて利用して、インビトロで目的のタンパク質又はRNAの近くにあるポリペプチド及びRNAを標識する。UV照射後、光活性化可能な基が、タグ付加分子にごく近接しているタンパク質及び他の分子と反応し、それによりそれらを標識する。標識された相互作用分子は、続いて回収して同定することができる。本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して、例えばプローブを選択のRNA配列に標的化することができる。

【0248】

これらの適用は、疾患に関連する適用又は培養が困難な細胞型のインビボイメージングのため動物モデルにおいても適用し得る可能性がある。

【0249】

本発明は、リスクの検査及びRNA標的療法の手引きを含め、無細胞RNAの非侵襲的

10

20

30

40

50

試料採取によって健康状態を診断及びモニタリングするための薬剤及び方法を提供し、治療の急速投与が治療成績に重要な状況で有用である。一実施形態において、本発明は、再発及び／又は一般的な薬剤耐性突然変異の発生をモニタリングすることを含め、循環腫瘍RNAに関する癌検出方法及び薬剤を提供する。別の実施形態において、本発明は、血液又は血清から直接細菌種を検出及び／又は同定して、それにより例えば疾患の進行及び敗血症をモニタするための検出方法及び薬剤を提供する。本発明のある実施形態では、Cas13bタンパク質及び誘導体を使用して、ライノウイルス感染症又は上気道感染症などの一般病が気管支炎などのより重篤な感染症と区別され、診断される。

【0250】

本発明は、心筋梗塞又は脳卒中治療時の例えばVKORC1、CYP2C9及びCYP2C19遺伝子タイピングに基づく抗凝固薬の投与の手引きを含め、救急ファーマコゲノミクスに向けた迅速遺伝子タイピングのための方法及び薬剤を提供する。

【0251】

本発明は、食品製造及び配送チェーンに沿ったあらゆるポイントでの食品の細菌汚染を監視するための薬剤及び方法を提供する。別の実施形態において、本発明は、例えば、食品原料の特定及び純度の決定による、品質管理及び監視を提供する。1つの非限定的な例では、本発明を使用して、動物肉及び海産物の種など、食品原料を特定又は確認し得る。

【0252】

別の実施形態において、本発明は法医学的決定において使用される。例えば、血液又は他の体液を含む犯罪現場試料。本発明のある実施形態では、本発明を使用して指紋から核酸試料が同定される。

【0253】

RNA折り紙／インビトロアセンブリラインにおけるRNAターゲティングエフェクタータンパク質の使用 — コンビナトリクス

RNA折り紙とは、RNAを組み込まれた鋳型として使用して二次元又は三次元構造を作り出すためのナノスケールの折り畳み構造を指す。折り畳み構造はRNAにコードされ、従って得られるRNAの形状は合成されるRNA配列によって決まる(Geary, et al. 2014. Science, 345 (6198). pp. 799-804)。RNA折り紙は、タンパク質などの他の成分を複合体となるように配列するための足場としての役割を果たし得る。本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用すると、例えば好適なガイドRNAを使用して目的のタンパク質をRNA折り紙に標的化することができる。

【0254】

RNA単離又は精製、エンリッチメント又は枯渇におけるRNAターゲティングエフェクタータンパク質の使用

更に、RNAと複合体化したときのRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用してRNAを単離及び／又は精製し得ることが想定される。例えば、RNA-RNAターゲティングエフェクタータンパク質複合体の単離及び／又は精製に使用し得るアフィニティータグにRNAターゲティングエフェクタータンパク質を融合することができる。かかる適用は、例えば、細胞における遺伝子発現プロファイルの分析において有用である。詳細な実施形態において、RNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して特異的非コードRNA(ncRNA)を標的化し、それによりその活性を遮断して、有用な機能性プローブを提供し得ることが想定され得る。特定の実施形態では、本明細書に記載されるとおりのエフェクタータンパク質(effector protein)を使用して特定のRNAを特異的にエンリッチし得る(限定はされないが、安定性を増加させることなどを含む)か、又は代わりに特定のRNA(限定なしに、例えば特定のスプライス変異体、アイソフォームなど)を特異的に枯渇させ得る。

【0255】

lincRNA機能及び他の核RNAの検査

siRNAなどの現在のRNAノックダウン戦略は、タンパク質機構が細胞質性である

10

20

30

40

50

ため、ほとんどが細胞質転写物のターゲティングに限られるという不都合がある。細胞機能に必須でない外因系である本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質の利点は、それを細胞のどの区画においても使用できることである。NLSシグナルをRNAターゲティングエフェクタータンパク質に融合することにより、それを核に誘導することができ、核RNAのターゲティングが可能となる。例えば、lincRNAの機能をプローブすることが想定される。長鎖遺伝子間非コードRNA (lincRNA) は、極めて広範に調査されている研究分野である。多くのlincRNAが、今のところ依然として解明されていない機能を有し、これは本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用した研究となる可能性がある。

【0256】

10

RNA結合タンパク質の同定

特異的RNAに結合するタンパク質の同定は、多くのRNAの役割を理解するのに有用であり得る。例えば、多くのlincRNAは転写の制御に転写及び後成的調節因子が関連する。どのようなタンパク質が所与のlincRNAに結合するかを理解することは、所与の調節経路の構成成分を解明することを促進し得る。結合したタンパク質をビオチンで局所的に標識するため、ビオチンリガーゼを特異的転写物に動員するように本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を設計することができる。次に、タンパク質をプルダウンし、質量分析法により分析して、それを同定することができる。

【0257】

20

RNAへの複合体のアセンブリ及び基質シャットリング

更に、本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して、RNAに複合体をアセンブルすることができる。これは、RNAターゲティングエフェクタータンパク質を複数の関連するタンパク質（例えば、特定の合成経路の構成成分）で機能化することにより実現し得る。代わりに、かかる種々の関連するタンパク質で複数のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を機能化して、同じ又は隣接する標的RNAに標的化し得る。RNAへの複合体のアセンブリの有用な適用は、例えば、タンパク質間の基質シャットリングの促進である。

【0258】

合成生物学

生物学的システムの開発には、臨床応用を含め、広い有用性がある。本発明のプログラム可能なRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して、例えば癌関連RNAを標的転写物として使用した標的細胞死のため毒性ドメインのスプリットタンパク質に融合し得ることが想定される。更に、合成生物学的システムにおいて、例えばキナーゼ又は他の酵素などの適切なエフェクターとの融合複合体により、タンパク質間相互作用を含む経路に影響を与えることができる。

30

【0259】

タンパク質スプライシング：インテイン

タンパク質スプライシングは、インテインと称される介在ポリペプチドが、エクステインと称される、それに隣接するポリペプチドからのそれ自体の切出し、且つ続くエクステインのライゲーションを触媒する翻訳後プロセスである。本明細書に記載されるとおりの2つ以上のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を標的転写物にアセンブルすることを用いてスプリットインテインの放出を仕向け (Topilina and Mills Mob DNA, 2014 Feb 4; 5 (1): 5)、それによりmRNA転写物の存在に関する直接計算及び続く代謝酵素又は転写因子などの（転写経路の下流作動のための）タンパク質産物の放出を可能にし得る。本願は合成生物学（上記を参照されたい）又は大規模バイオ生産（一定の条件下でのみ産物を産生する）において多大な意義を有し得る。

40

【0260】

誘導性システム、投与システム及び自己不活性化システム

一実施形態において、本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質及びエフ

50

エクター成分を含む融合複合体は、誘導性、例えば光誘導性又は化学誘導性となるように設計される。かかる誘導能により、エフェクター成分を所望の時点で活性化させることが可能となる。

【0261】

光誘導能は、例えば、融合にCRY2PHR／CIBN対形成が用いられる融合複合体を設計することにより実現される。このシステムは、生細胞におけるタンパク質相互作用の光誘導に特に有用である（Koner mann S, et al. Nature. 2013; 500: 472-476）。

【0262】

化学誘導能は、例えば、融合にFKBP／FRB（FK506結合タンパク質／FKBPラパマイシン結合）対形成が用いられる融合複合体を設計することにより提供される。このシステムを使用すると、タンパク質の結合にラパマイシンが必要である（Zetsche et al. Nat Biotechnol. 2015; 33(2): 139-42が、Cas9へのこのシステムの使用について記載している）。

【0263】

更に、本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質は、細胞にDNAとして導入すると、テトラサイクリン又はドキシサイクリン制御転写活性化（Tet-On及びTet-Off発現系）、例えばエクジソン誘導性遺伝子発現系などのホルモン誘導性遺伝子発現系及びアラビノース誘導性遺伝子発現系など、誘導性プロモーターによって調節することができる。RNAとして送達すると、RNAターゲティングエフェクタータンパク質の発現をリボスイッチで調節することができ、これはテトラサイクリンのような小分子を検知することができるものである（Goldfless et al. Nucleic Acids Res. 2012; 40(9): e64に記載されるとおり）。

【0264】

一実施形態において、本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質の送達を調節して細胞内のタンパク質又はcrRNAの量を変化させ、それにより所望の効果又は任意の望ましくないオフターゲット効果の大きさを変化させることができる。

【0265】

一実施形態において、本明細書に記載されるRNAターゲティングエフェクタータンパク質は自己不活性化するように設計することができる。これは、mRNA又は複製RNA治療薬（replication RNA therapeutic）（Wroble ska et al. Nat Biotechnol. 2015 Aug; 33(8): 839-841）のいずれかの、RNAとして細胞に送達すると、自己RNAを破壊して、それにより常在性及び潜在的に望ましくない効果を低減することにより、発現及び続く効果を自己不活性化し得る。

【0266】

本明細書に記載されるとおりのRNAターゲティングエフェクタータンパク質の更なるインビボ適用については、Mackay JP et al (Nat Struct Mol Biol. 2011 Mar; 18(3): 256-61)、Nelles et al (Bioessays. 2015 Jul; 37(7): 732-9)及びAbil Z and Zhao H (Mol Biosyst. 2015 Oct; 11(10): 2658-65)が参照され、これらは参照により本明細書に援用される。詳細には、本発明の特定の実施形態において、好ましくは触媒不活性Cas13bを使用することによる特定の実施形態において以下の適用が想定される：翻訳の亢進（例えば、Cas13b-翻訳促進因子融合物（例えば、eIF4融合物））；翻訳の抑制（例えば、リボソーム結合部位を標的とするgRNA）；エクソンスキッピング（例えば、スプライスドナー及び／又はアクセプター部位を標的とするgRNA）；エクソンインクルージョン（例えば、特定のエクソンスプライスドナー及び／又はアクセプター部位が含まれるように標的化するgRNA又はスプライソソーム成分（例えば、U1 snRNA）に融合した若しくはそれを動員するCas13b）；RNA局在への接近（例えば、Cas13b-

マーカ融合物（例えば、EGFP融合物））；RNA局在の変化（例えば、Cas13b局在化シグナル融合物（例えば、NLS又はNES融合物））；RNA分解（この場合、Cas13bの活性に依存する場合、触媒不活性Cas13bは使用されないものとし、代わりに及び特異性の増加のため、スプリットCas13bが使用され得る）；gRNAの分解又は機能部位への結合によるなど（恐らくCas13bシグナル配列融合物による再局在化によって特異的部位でタイトレートアウトする）、非コードRNA機能（例えば、miRNA）の阻害。

【0267】

Cas13b機能は、crRNAの5'又は3'伸長及びcrRNAループの伸長に対してロバストである。従って、複合体形成及び標的転写物への結合に影響を及ぼすことなくcrRNAにMS2ループ及び他の動員ドメインを付加し得ることが想定される。様々なエフェクタードメインを動員するためのcrRNAに対するかかる改変は、上記に記載したRNA標的化エフェクタータンパク質の使用において適用可能である。

【0268】

Cas13bは、RNAファージ耐性を媒介する能力を有する。従って、Cas13bを使用して、限定はされないが、レトロウイルス（例えば、HIVなどのレンチウイルス）、HCV、エボラウイルス及びジカウイルスを含めたRNA単独病原体に対して例えば動物、ヒト及び植物を免疫し得ることが想定される。

【0269】

特定の実施形態では、Cas13bは、それ自体のアレイをプロセッシング（切断）できる。これは、野生型Cas13bタンパク質と、本明細書に記載される1つ以上の突然変異アミノ酸残基を含む突然変異Cas13bタンパク質との両方に適用される。従って、種々の標的転写物及び／又は適用に向けて設計された複数のcrRNAを単一のprecursorRNAとして又は1つのプロモーターによってドライブされる単一の転写物として送達し得ることが想定される。かかる送達方法には、実質的によりコンパクトで、合成がより容易で、且つウイルス系での送達がより容易であるという利点がある。本明細書におけるCas13bのオルソログについて、正確なアミノ酸位置は、異なることもあり、これは、当該技術分野において公知のとおり且つ本明細書において他の部分に記載されたとおり、タンパク質アラインメントによって適切に決定し得ることが理解されるであろう。本発明の態様は、原核細胞又は真核細胞におけるインビトロ、インビボ又はエキソビボでのゲノムエンジニアリングにおける、例えば1つ以上の遺伝子又は1つ以上の遺伝子産物の発現を変化させるか又は操作するための、本明細書に記載される組成物及び系の方法及び使用も包含する。

【0270】

本発明の態様は、原核細胞又は真核細胞におけるインビトロ、インビボ又はエキソビボでのゲノム又はトランスクリプトームエンジニアリングにおける、例えば1つ以上の遺伝子又は1つ以上の遺伝子産物の（タンパク質）発現を変化させる又は操作するための、本明細書に記載される組成物及び系の方法及び使用も包含する。

【0271】

ある態様において、本発明は、細胞における標的RNAの（タンパク質）発現を調節する、例えば低下させるための方法及び組成物を提供する。本方法では、RNAの転写、安定性及び／又は翻訳に干渉する本発明のCas13b系が提供される。

【0272】

特定の実施形態において、有効量のCas13b系を使用してRNAが切断されるか、又は他にRNA発現が阻害される。これに関連して、この系はsiRNA及びshRNAと同様の使用を有し、従ってまた、かかる方法に代えることもできる。この方法は、限定なしに、例えば、干渉リボ核酸（siRNA又はshRNAなど）又はその転写鋳型、例えばshRNAをコードするDNAの代わりとしてのCas13b系の使用を含む。Cas13b系は、例えば、標的細胞を含む哺乳類への投与によって標的細胞に導入される。

【0273】

有利には、本発明の Cas 13 b 系は特異的である。例えば、干渉リボ核酸 (siRNA 又は shRNA など) ポリヌクレオチド系は設計及び安定性の問題並びにオフターゲット結合に悩まされるが、本発明の Cas 13 b 系は高い特異性で設計することができる。

【0274】

不安定化 Cas 13 b

特定の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの本発明に係るエフェクタータンパク質 (CRISPR 酵素; Cas 13 b) は、不安定化ドメイン (DD) に会合又は融合される。一部の実施形態において、DD は ER 50 である。この DD の対応する安定化リガンドは、一部の実施形態において 4 HT である。そのため、一部の実施形態では、少なくとも 1 つの DD のうちの 1 つが ER 50 であり、従って安定化リガンドが 4 HT 又は CMP 8 である。一部の実施形態において、DD は DHFR 50 である。この DD の対応する安定化リガンドは、一部の実施形態において TMP である。そのため、一部の実施形態では、少なくとも 1 つの DD のうち 1 つが DHFR 50 であり、従って安定化リガンドが TMP である。一部の実施形態において、DD は ER 50 である。この DD の対応する安定化リガンドは、一部の実施形態において CMP 8 である。従って CMP 8 は、ER 50 系における 4 HT の代替となる安定化リガンドであり得る。CMP 8 及び 4 HT を競合的に使用し得る／使用すべきである可能性があり得るが、一部の細胞型はこれらの 2 つのリガンドのいずれか一方の影響を受け易いこともあり、本開示及び当該技術分野における知識から、当業者は CMP 8 及び／又は 4 HT を使用することができる。

【0275】

一部の実施形態において、1 つ又は 2 つの DD が CRISPR 酵素の N 端側末端に融合され、1 つ又は 2 つの DD が CRISPR 酵素の C 端側に融合され得る。一部の実施形態では、少なくとも 2 つの DD が CRISPR 酵素と会合し、且つそれらの DD は同じ DD であり、即ち DD は同種である。従って、DD の両方 (又は 2 つ以上) が ER 50 DD であり得る。一部の実施形態ではこれが好ましい。代わりに、DD の両方 (又は 2 つ以上) が DHFR 50 DD であり得る。これも一部の実施形態では好ましい。一部の実施形態において、少なくとも 2 つの DD が CRISPR 酵素と会合し、且つそれらの DD は異なる DD であり、即ち DD は異種である。従って、DD の 1 つが ER 50 であり得る一方、DD の 1 つ以上又は任意の他の DD が DHFR 50 であり得る。異種である 2 つ以上の DD を有することは、より高い分解制御レベルをもたらし得るため有利であり得る。N 端又は C 端における 2 つ以上の DD のタンデム融合が分解を増強し得、及びかかるタンデム融合は、例えば、ER 50-ER 50-Cas 13 b 又は DHFR-DHFR-Cas 13 b であり得る。いずれの安定化リガンドも存在しない場合に高レベルの分解が起こり、一方の安定化リガンドが存在せず、他方の (又は別の) 安定化リガンドが存在する場合に中間レベルの分解が起こり得る一方、安定化リガンドの両方 (又は 2 つ以上) が存在する場合に低レベルの分解が起こり得ることが想定される。制御はまた、N 端側 ER 50 DD 及び C 端側 DHFR 50 DD を有することによってもたらされ得る。

【0276】

一部の実施形態において、CRISPR 酵素と DD の融合は、DD と CRISPR 酵素との間にリンカーを含む。一部の実施形態において、リンカーは Gly Ser リンカーである。一部の実施形態において、DD-CRISPR 酵素は少なくとも 1 つの核外移行シグナル (NES) を更に含む。一部の実施形態において、DD-CRISPR 酵素は 2 つ以上の NES を含む。一部の実施形態において、DD-CRISPR 酵素は少なくとも 1 つの核局在化シグナル (NLS) を含む。これは、NES に加えて含むのであり得る。一部の実施形態において、CRISPR 酵素は、CRISPR 酵素と DD との間のリンカーとして又はその一部として、局在化 (核内移行又は核外移行) シグナルを含むか、又はそれから本質的になるか、又はそれからなる。HA 又は Flag タグもリンカーとしての本発明の範囲内にある。本出願人は、NLS 及び／又は NES をリンカーとして使用し、また、GS ほどの長さのものから最大 (GGGGS)₃ に至るまでのグリシンセリンリンカーも使用する。

【0277】

不安定化ドメインには、広範囲のタンパク質に不安定性を付与する一般的な有用性がある。例えば、Miyazaki, J Am Chem Soc. Mar 7, 2012; 134(9):3942-3945(参照により本明細書に援用される)を参照されたい。CMP8又は4-ヒドロキシタモキシフェンは不安定化ドメインであり得る。より一般的には、N末端規則による不安定化残基である哺乳類DHFRの温度感受性突然変異体(DHFRts)が、許容温度で安定であるが、37℃で不安定であることが分かった。DHFRtsを発現する細胞に哺乳類DHFRの高親和性リガンドであるメトトレキサートを加えると、タンパク質の分解が部分的に阻害された。これは、細胞において本来分解の標的となるタンパク質を小分子リガンドが安定化させ得るという重要な実証であった。ラパマイシン誘導体を使用すると、mTORのFRBDメインの不安定突然変異体(FRB*)が安定化し、融合したキナーゼGSK-3βの機能が回復した6, 7。この系は、リガンド依存的な安定性が、複雑な生物学的環境にある特異的タンパク質の機能を調節する魅力的な戦略に相当することを実証した。タンパク質活性の制御系には、ラパマイシンによって誘導されたFK506結合タンパク質とFKBP12との二量体化によってユビキチン相補性が生じると機能性になるDDが関与し得る。ヒトFKBP12又はecDHFRタンパク質の突然変異体は、その高親和性リガンド、それぞれShield-1又はトリメトプリム(TMP)が存在しない場合には代謝的に不安定であるようにエンジニアリングすることができる。これらの突然変異体は、本発明の実施において有用な可能な不安定化ドメイン(DD)の一部であり、及びCRISPR酵素との融合物としてのDDの不安定性がプロテアソームによる融合タンパク質全体のCRISPRタンパク質分解をもたらす。Shield-1及びTMPは用量依存的にDDに結合してそれを安定化させる。エストロゲン受容体リガンド結合ドメイン(ERLBD、ERS1の残基305~549)も不安定化ドメインとしてエンジニアリングすることができる。エストロゲン受容体シグナル伝達経路は乳癌などの種々の疾患に関与するため、この経路は広く研究されており、多くのエストロゲン受容体作動薬及び拮抗薬が開発されている。従って、ERLBDと薬物との適合性のあるペアが公知である。突然変異形態のERLBDに結合するが、野生型形態のERLBDには結合しないリガンドがある。3つの突然変異(L384M、M421G、G521R)をコードするこれらの突然変異ドメインの1つを使用することにより、内因性エストロゲン感受性ネットワークを乱すことのないリガンドを用いてERLBD由来のDDの安定性を調節することが可能である。追加の突然変異(Y537S)を導入してERLBDを更に不安定化させ、それを潜在的なDD候補として構成することができる。この四重突然変異体は、有利なDD展開である。この突然変異ERLBDをCRISPR酵素に融合させることができ、且つリガンドを用いてその安定性を調節し又は攪乱させることができ、これによりCRISPR酵素がDDを有する。別のDDは、Shield1リガンドによって安定化する、突然変異FKBPタンパク質をベースとする12kDa(107アミノ酸)タグであり得る。例えば、Nature Methods 5, (2008)を参照されたい。例えば、DDは、合成の生物学的に不活性な小分子、Shield-1に結合し、且つそれによって可逆的に安定化される、改変されたFK506結合タンパク質12(FKBP12)であり得、例えば、Banaszynski LA, Chen LC, Maynard-Smith LA, Ooi AG, Wandless TJ. "A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules". Cell. 2006;126:995-1004; Banaszynski LA, Sellmyer MA, Contag CH, Wandless TJ, Thorne SH. "Chemical control of protein stability and function in living mice". Nat Med. 2008;14:1123-1127; Maynard-Smith LA, Chen LC, Banaszynski LA, Ooi AG, Wandless TJ. "A

10

20

30

40

50

directed approach for engineering conditional protein stability using biologically silent small molecules". The Journal of biological chemistry. 2007; 282: 24866-24872; 及び Rodriguez, Chem Biol. Mar 23, 2012; 19 (3): 391-398 (これらは、全て参照により本明細書に援用される)を参照されたく、及び本発明の実施においてCRISPR酵素と会合させるDDの選択において本発明の実施で用いられ得る。理解し得るとおり、当該技術分野における知識には幾つものDDが含まれ、及びDDは、CRISPR酵素と、有利にはリンカーを伴い会合させる、例えば融合することができ、それによってDDをリガンドの存在下で安定化させることができ、且つそれが存在しないとき、DDを不安定化させることができ、それによってCRISPR酵素が全体として不安定化するか、又はDDはリガンドが存在しない場合に安定化させることができ、且つリガンドが存在するときにDDを不安定化させることができ、DDによってCRISPR酵素、従ってCRISPR-Cas複合体又は系を調節又は制御する — いわばオン・オフを切り替えることが可能となり、それにより系を例えばインビボ又はインビトロ環境で調節又は制御する手段が提供される。例えば、目的のタンパク質をDDタグとの融合物として発現させると、それは細胞内で不安定化し、例えばプロテアソームによって急速に分解される。従って、安定化リガンドが存在しないと、Dが会合したCasの分解につながる。新規DDを目的のタンパク質に融合させると、その不安定性が目的のタンパク質に付与され、融合タンパク質全体の急速な分解が生じる。Casのピーク活性は、時にオフターゲット効果の低減に有益である。従って、高い活性の短いバーストが好ましい。本発明はかかるピークを提供することが可能である。ある意味では、この系は誘導性である。別の意味では、この系は安定化リガンドの非存在下で抑制され、且つ安定化リガンドの存在下で抑制が解除される。

【0278】

植物及び酵母へのRNAターゲティングCRISPR系の適用
定義：

一般に、用語「植物」は、細胞分裂によって特徴的に成長し、葉緑体を含有し、且つセルロースで構成された細胞壁を有する植物界 (Plantae) の任意の様々な光合成生物、真核生物、単細胞生物又は多細胞生物に関する。用語の植物には単子葉及び双子葉植物が包含される。具体的には、植物には、限定なしに、アカシア、アルファルファ、アマランス、リンゴ、アンズ、チョウセンアザミ、トネリコの木、アスパラガス、アボカド、バナナ、オオムギ、マメ類、テンサイ、カバノキ、ブナノキ、クロイチゴ、ブルーベリー、ブロッコリー、メキャベツ、キャベツ、キャノーラ、カンタループ、ニンジン、キャッサバ、カリフラワー、ヒマラヤスギ、穀物、セロリ、クリ、サクランボ、ハクサイ、柑橘類、クレメンタイン、クローバ、コーヒー、トウモロコシ、ワタ、ササゲ、キュウリ、イトスギ、ナス、ニレ、エンダイブ、ユーカリ、ウイキョウ、イチジク、モミ、ゼラニウム、ブドウ、グレープフルーツ、ラッカセイ類、ホオズキ、ガムヘムロック (gum hemlock)、ヒッコリー、ケール、キーウィフルーツ、コールラビ、カラマツ、レタス、ニラ、レモン、ライム、ニセアカシア、マツ、メイデンヘア、トウモロコシ、マンゴー、カエデ、メロン、キビ、キノコ、カラシ、堅果類、オーク、オートムギ、油ヤシ、オクラ、タマネギ、オレンジ、観賞植物又は装飾花又は観賞樹、パパイヤ、ヤシ、パセリ、パースニップ、エンドウマメ、モモ、ピーナッツ、セイヨウナシ、ピート、コショウ、カキ、キマメ、マツ、パイナップル、オオバコ、セイヨウスモモ、ザクロ、ジャガイモ、カボチャ、赤チコリ、ダイコン、ナタネ、キイチゴ、コメ、ライムギ、モロコシ、ベニバナ、サルヤナギ、ダイズ、ハウレンソウ、エゾマツ、カボチャ、イチゴ、サトウダイコン、サトウキビ、ヒマワリ、サツマイモ、スイートコーン、タンジェリン、茶、タバコ、トマト、樹木、ライ小麦、芝草、カブ、つる植物、クルミ、オランダガラシ、スイカ、コムギ、ヤムイモ、イチイ及びズッキーニなどの被子植物及び裸子植物が含まれることが意図される。用語の植物には、それらに根、葉及び高等植物を特徴付ける他の器官がないことによ

って主に統一された、大部分が光独立栄養生物である藻類も包含される。

【0279】

本明細書に記載されるとおりのRNAターゲティング系を使用した遺伝子発現の調節方法を使用して、本質的にいかなる植物にも所望の形質を付与することができる。本明細書に記載される所望の生理学的及び農学的特性について、本開示の核酸構築物及び上述の様々な形質転換方法を用いて多種多様な植物及び植物細胞系をエンジニアリングし得る。好ましい実施形態において、エンジニアリングの標的となる植物及び植物細胞としては、限定はされないが、穀類作物（例えば、コムギ、トウモロコシ、コメ、キビ、オオムギ）、果実作物（例えば、トマト、リンゴ、セイヨウナシ、イチゴ、オレンジ）、飼料作物（例えば、アルファルファ）、根菜作物（例えば、ニンジン、ジャガイモ、サトウダイコン、ヤムイモ）、葉菜作物（例えば、レタス、ホウレンソウ）；顕花植物（例えば、ペチュニア、バラ、キク）、針葉樹及びマツの木（例えば、モミ、エゾマツ）；ファイトレメディエーションで用いられる植物（例えば、重金属蓄積植物）；油料作物（例えば、ヒマワリ、ナタネ）及び実験目的で用いられる植物（例えば、アラビドプシス属（*Arabidopsis*））を含めた作物など、単子葉及び双子葉植物が挙げられる。従って、本方法及びCRISPR-Cas系は広範囲の植物にわたり、例えばモクレン目（*Magnoliales*）、シキミ目（*Illiciales*）、クスノキ目（*Laurales*）、コショウ目（*Piperiales*）、ウマノスズクサ目（*Aristolochiales*）、スイレン目（*Nymphaeales*）、キンボウゲ目（*Ranunculales*）、ケシ目（*Papaverales*）、サラセニア科（*Sarraceniaceae*）、ヤマグルマ目（*Trochodendrales*）、マンサク目（*Hamamelidales*）、トチュウ目（*Eucomiales*）、レイトネリア目（*Leitneriales*）、ヤマモモ目（*Myricales*）、ブナ目（*Fagales*）、モクマオウ目（*Casuarinales*）、ナデシコ目（*Caryophyllales*）、バタイス目（*Batales*）、タデ目（*Polygonales*）、イソマツ目（*Plumbaginales*）、ビワモドキ目（*Dilleniaceae*）、ツバキ目（*Theales*）、アオイ目（*Malvales*）、イラクサ目（*Urticales*）、サガリバナ目（*Lecythidales*）、スミレ目（*Violales*）、ヤナギ目（*Salicales*）、フウチョウソウ目（*Capparales*）、ツツジ目（*Ericales*）、イワウメ目（*Diapensales*）、カキノキ目（*Ebenales*）、サクラソウ目（*Primulales*）、バラ目（*Rosales*）、マメ目（*Fabales*）、カワゴケソウ目（*Podostemales*）、アリノトウグサ目（*Haloragales*）、フトモモ目（*Myrtales*）、ミズキ目（*Cornales*）、ヤマモガシ目（*Proteales*）、ビャクダン目（*Santalales*）、ラフレシア目（*Rafflesiales*）、ニシキギ目（*Celastrales*）、トウダイグサ目（*Euphorbiales*）、クロウメモドキ目（*Rhamnales*）、ムクロジ目（*Sapindales*）、クルミ目（*Juglandales*）、フウロソウ目（*Geraniales*）、ヒメハギ目（*Polygalales*）、セリ目（*Umbellales*）、リンドウ目（*Gentianales*）、ハナシノブ目（*Polemoniales*）、シソ目（*Lamiales*）、オオバコ目（*Plantaginales*）、ゴマノハグサ目（*Scrophulariales*）、キキョウ目（*Campanulales*）、アカネ目（*Rubiales*）、マツムシソウ目（*Dipsacales*）及びキク目（*Asterales*）に属する双子葉植物などで用いることができる。本方法及びCRISPR-Cas系は、オモダカ目（*Alismatales*）、トチカガミ目（*Hydrocharitales*）、イバラモ目（*Najadales*）、ホンゴウソウ目（*Triuridales*）、ツユクサ目（*Commelinales*）、ホシクサ目（*Eriocaulales*）、サンアソウ目（*Restionales*）、イネ目（*Poales*）、イグサ目（*Juncuales*）、カヤツリグサ目（*Cyperales*）、ガマ目（*Typhales*）、パイナップル目（*Bromeliales*）、ショウガ目（*Zingiberales*）、ヤシ目（*Arecalles*）、パナマソウ目

(Cyclanthales)、タコノキ目(Pandanales)、サトイモ目(Arales)、ユリ目(Lilliales)及びラン目(Orchidales)に属するものなどの単子葉植物又は裸子植物類(Gymnospermae)に属する植物、例えばマツ目(Pinales)、イチョウ目(Ginkgoales)、ソテツ目(Cycadales)、ナンヨウスギ目(Araucariales)、ヒノキ目(Cupressales)及びグネツム目(Gnetales)に属するもので用いることができる。

【0280】

本明細書に記載されるRNAターゲティングCRISPR系及び使用方法は、以下の双子葉類、単子葉類又は裸子植物の属の非限定的なリストに含まれる広範囲にわたる植物種に用いることができる：オオカミナスビ属(*Atropa*)、アルセオダフネ属(*Alseodaphne*)、カシューナットノキ属(*Anacardium*)、ラッカセイ属(*Arachis*)、ベイルシュミエディア属(*Beilschmiedia*)、アブラナ属(*Brassica*)、ベニバナ属(*Carthamus*)、アオツヅラフジ属(*Cocculus*)、クロトン属(*Croton*)、ククミス属(*Cucumis*)、ミカン属(*Citrus*)、スイカ属(*Citrullus*)、トウガラシ属(*Capsicum*)、ニチニチソウ属(*Catharanthus*)、ココヤシ属(*Cocos*)、コーヒーノキ属(*Coffea*)、ククルビタ属(*Cucurbita*)、ニンジン属(*Daucus*)、ドッグエティア属(*Duguetia*)、ハナビシソウ属(*Eschscholzia*)、イチジク属(*Ficus*)、オランダイチゴ属(*Fragaria*)、ツノゲシ属(*Glaucium*)、ダイズ属(*Glycine*)、ワタ属(*Gossypium*)、ヒマワリ属(*Helianthus*)、パラゴムノキ属(*Hevea*)、ヒヨス属(*Hyoscyamus*)、アキノノゲシ属(*Lactuca*)、ランドルフィア属(*Landolphia*)、アマ属(*Linum*)、ハマビワ属(*Litsea*)、トマト属(*Lycopersicon*)、ルピナス属(*Lupinus*)、キャッサバ属(*Manihot*)、マジョラナ属(*Majorana*)、リンゴ属(*Malus*)、ウマゴヤシ属(*Medicago*)、タバコ属(*Nicotiana*)、オリーブ属(*Olea*)、パルセニウム属(*Parthenium*)、ケシ属(*Papaver*)、ワニナシ属(*Persea*)、インゲンマメ属(*Phaseolus*)、カイノキ属(*Pistacia*)、エンドウ属(*Pisum*)、ナシ属(*Pyrus*)、サクラ属(*Prunus*)、ダイコン属(*Raphanus*)、トウゴマ属(*Ricinus*)、キオン属(*Senecio*)、ツヅラフジ属(*Sinomenium*)、ハスノハカヅラ属(*Stephania*)、シロガラシ属(*Sinapis*)、ナス属(*Solanum*)、カカオ属(*Theobroma*)、ジャジクソウ属(*Trifolium*)、フェヌグリーク属(*Trigonella*)、ソラマメ属(*Vicia*)、ツルニチニチソウ属(*Vinca*)、ブドウ属(*Vitis*)及びササゲ属(*Vigna*)；及びネギ属(*Allium*)、ウシクサ属(*Andropogon*)、スズメガヤ属(*Aragrostis*)、アスパラガス属(*Aragrostis*)、カラスミギ属(*Avena*)、ギョウギシバ属(*Cynodon*)、アブラヤシ属(*Elaeis*)、ウシノケグサ属(*Festuca*)、フェストロリウム属(*Festulolium*)、ワスレグサ属(*Heterocallis*)、オオムギ属(*Hordeum*)、アオウキクサ属(*Lemna*)、ドクムギ属(*Lolium*)、バショウ属(*Musa*)、イネ属(*Oryza*)、キビ属(*Panicum*)、チカラシバ属(*Pannesetum*)、アワガエリ属(*Phleum*)、イチゴツナギ属(*Poa*)、ライムギ属(*Secale*)、モロコシ属(*Sorghum*)、コムギ属(*Triticum*)、トウモロコシ属(*Zea*)、モミ属(*Abies*)、コウヨウザン属(*Cunninghamia*)、マオウ属(*Ephedra*)、トウヒ属(*Picea*)、マツ属(*Pinus*)及びトガサワラ属(*Pseudotsuga*)。

【0281】

RNAターゲティングCRISPR系及び使用方法は、例えば、紅藻植物門(Rhodophyta)(紅藻類)、緑藻植物門(Chlorophyta)(緑藻類)、褐藻植

10

20

30

40

50

物門 (Phaeophyta) (褐藻類)、珪藻植物門 (Bacillariophyta) (珪藻類)、真正眼点藻植物門 (Eustigmatophyta) 及び渦鞭毛藻類を含む幾つかの真核生物の門並びに原核生物の門、藍色植物門 (Cyanobacteria) (藍藻類) から選択される藻類 (algae) を含め、広範囲にわたる「藻類」又は「藻類細胞」にも用いることができる。用語「藻類」には、例えば、アンフォラ属 (Amphora)、アナベナ属 (Anabaena)、アンキストロデスミス属 (Anikstrodesmis)、ボトリオコッカス属 (Botryococcus)、キートケロス属 (Chaetoceros)、クラミドモナス属 (Chlamydomonas)、クロレラ属 (Chlorella)、クロロコクム属 (Chlorococcum)、キクロテラ属 (Cyclotella)、シリンドロテカ属 (Cylindrotheca)、ドナリエラ属 (Dunaliella)、エミリアニア属 (Emiliana)、ユーグレナ属 (Euglena)、ヘマトコッカス属 (Hematococcus)、イソクリシス属 (Isochrysis)、モノクリシス属 (Monochrysis)、モノラフィディウム属 (Monoraphidium)、ナンノクロリス属 (Nannochloris)、ナンノクロロプシス属 (Nannochloropsis)、フナガタケイソウ属 (Navicula)、ネフロクロリス属 (Nephrochloris)、ネフロセルミス属 (Nephroselmis)、ニッチア属 (Nitzschia)、ノドゥラリア属 (Nodularia)、ノストック属 (Nostoc)、オクロモナス属 (Ochromonas)、オオキスティス属 (Oocystis)、オシラトリア属 (Oscillartoria)、パブロバ属 (Pavlova)、フェオダクチラム属 (Phaeodactylum)、プラチモナス属 (Playtmonas)、プレウロクリシス属 (Pleurochrysis)、アマノリ属 (Porphyra)、シュードアナベナ属 (Pseudoanabaena)、ピラミモナス属 (Pyramimonas)、スティココッカス属 (Stichococcus)、シネココッカス属 (Synechococcus)、シネコシスティス属 (Synechocystis)、テトラセルミス属 (Tetraselmis)、タラシオシラ属 (Thalassiosira) 及びアイアカシオ属 (Trichodesmium) から選択される藻類が含まれる。

【0282】

植物の一部、即ち「植物組織」を本発明の方法に従い処理して改良された植物を作り出し得る。植物組織は植物細胞も包含する。用語「植物細胞」は、本明細書で使用されるとき、インタクトな全植物であるか、又は代わりにインビトロ組織培養下に培地又は寒天上で、成長培地又は緩衝液中の懸濁液中で、又は高度に組織化された単位、例えば植物組織、植物器官又は全植物などの一部として成長した単離された形態であるかのいずれかの、生きている植物の個々の単位を指す。

【0283】

「プロトプラスト」は、その細胞壁を再形成し、増殖し及び再生して適切な成長条件下で全植物に成長することのできる生きている植物のインタクトな生化学的にコンピテントな単位をもたらす機械的又は酵素的手段を例えば用いてその保護細胞壁が完全に又は部分的に除去された植物細胞を指す。

【0284】

用語「形質転換」は、広義には、アグロバクテリウム (Agrobacteria) 又は種々の化学的若しくは物理的方法の1つを用いたDNAの導入によって植物宿主が遺伝子改変される方法を指す。本明細書で使用されるとき、用語「植物宿主」は、植物の任意の細胞、組織、器官又は子孫を含め、植物を指す。多くの好適な植物組織又は植物細胞を形質転換することができ、限定はされないが、プロトプラスト、体細胞胚、花粉、葉、実生、茎、カルス、走根、微小管及び苗条が挙げられる。植物組織は、有性生殖的に生成されたか、それとも無性生殖的に生成されたかに関わらず、かかる植物、種子、子孫、ムカゴの任意のクローン及び挿し木又は種子など、これらのいずれかの子孫も指す。

【0285】

用語「形質転換された」は、本明細書で使用されるとき、構築物などの外来性DNA分子が導入されている細胞、組織、器官又は生物を指す。導入されたDNA分子は、導入されたDNA分子が後続の子孫に伝わるようにレシピエント細胞、組織、器官又は生物のゲノムDNAに組み込まれ得る。これらの実施形態において、「形質転換」又は「トランスジェニック」細胞又は植物には、その細胞又は植物の子孫及び交雑でかかる形質転換植物を親として用いる育種計画から作り出された、且つ導入されたDNA分子の存在によって生じる表現型の変化を呈する子孫も含まれ得る。好ましくは、トランスジェニック植物は稔性であり、導入されたDNAを、有性生殖を通じて子孫に伝えることが可能である。

【0286】

トランスジェニック植物の子孫など、用語「子孫」は、植物又はトランスジェニック植物から生まれるか、それから作り出されたか、又はそれに由来するものである。導入DNA分子は、レシピエント細胞に一過性にも導入され得、そのため、導入DNA分子は、後続の子孫によって受け継がれないことになり、従って「トランスジェニック」とは見なされない。従って、本明細書で使用されるとき、「非トランスジェニック」植物又は植物細胞は、そのゲノムに安定に組み込まれた外来DNAを含有しない植物である。

【0287】

用語「植物プロモーター」は、本明細書で使用されるとき、その起源が植物細胞であるか否かに関わらず、植物細胞において転写を開始させる能力を有するプロモーターである。例示的な適した植物プロモーターとしては、限定はされないが、植物、植物ウイルス及び植物細胞で発現する遺伝子を含むアグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*) 又はリゾビウム属 (*Rhizobium*) などの細菌から得られるものが挙げられる。

【0288】

本明細書で使用されるとき、「真菌細胞」は、真菌類の界内にある任意の種類の真核細胞を指す。真菌類の界内にある門としては、子囊菌門 (*Ascomycota*)、担子菌門 (*Basidiomycota*)、コウマクノウキン門 (*Blastocladiomycota*)、ツボカビ門 (*Chytridiomycota*)、グロムス門 (*Glomeromycota*)、微孢子虫門 (*Microsporidia*) 及びネオカリマスティアクス門 (*Neocallimastigomycota*) が挙げられる。真菌細胞には、酵母、カビ及び糸状菌類が含まれ得る。一部の実施形態において、真菌細胞は酵母細胞である。

【0289】

本明細書で使用されるとき、用語「酵母細胞」は、子囊菌門 (*Ascomycota*) 及び担子菌門 (*Basidiomycota*) の範囲内にある任意の真菌細胞を指す。酵母細胞には、出芽酵母細胞、分裂酵母細胞及びカビ細胞が含まれ得る。これらの生物に限定されないが、研究室及び工業環境で使用される多くの種類の酵母が、子囊菌門 (*Ascomycota*) の一部である。一部の実施形態において、酵母細胞は *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae*)、クルイベロミセス・マルクシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*) 又はイサチェンキア・オリエンタリス (*Issatchenkia orientalis*) 細胞である。他の酵母細胞としては、限定なしに、カンジダ属種 (*Candida* spp.) (例えば、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*))、ヤロウイア属種 (*Yarrowia* spp.) (例えば、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*))、ピキア属種 (*Pichia* spp.) (例えば、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*))、クルイベロミセス属種 (*Kluyveromyces* spp.) (例えば、クルイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*) 及びクルイベロミセス・マルクシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*))、アカパンカビ属種 (*Neurospora* spp.) (例えば、アカパンカビ (*Neurospora crassa*))、フザリウム属種 (*Fusarium* spp.) (例えば、フザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)) 及びイサチェンキア属種 (*Issatchenkia* spp.) (例えば、イサ

チェンキア・オリエンタリス (*Issatchenkia orientalis*)、別名ピキア・クドリャフツェフイ (*Pichia kudriavzevii*) 及びカンジダ・アシドサーモフィルム (*Candida acidothermophilum*) を挙げることができる。一部の実施形態において、真菌細胞は糸状菌細胞である。本明細書で使用されるとき、用語「糸状菌細胞」は、フィラメント状に、即ち菌糸又は菌糸体として成長する任意の種類の真菌細胞を指す。糸状菌細胞の例としては、限定なしに、アスペルギルス属種 (*Aspergillus* spp.) (例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*))、トリコデルマ属種 (*Trichoderma* spp.) (例えば、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*))、リゾプス属種 (*Rhizopus* spp.) (例えば、リゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*)) 及びモルティエラ属種 (*Mortierella* spp.) (例えば、モルティエラ・イザベリナ (*Mortierella isabellina*)) を挙げることができる。

10

【0290】

一部の実施形態において、真菌細胞は、工業用菌株である。本明細書で使用されるとき、「工業用菌株」は、工業的プロセス、例えば商業的又は工業的規模での製品の生産において使用されるか又はそれから単離される真菌細胞の任意の株を指す。工業用菌株は、典型的に工業的プロセスで使用される真菌種を指し得るか、又はそれは、非工業目的 (例えば、実験研究) にも使用され得る真菌種の分離株を指し得る。工業的プロセスの例としては、発酵 (例えば、食品又は飲料製品の生産における)、蒸留、バイオ燃料生産、化合物の生産及びポリペプチドの生産を挙げることができる。工業用菌株の例としては、限定なしに、JAY 270 及び ATCC 4124 を挙げることができる。

20

【0291】

一部の実施形態において、真菌細胞は、倍数体細胞である。本明細書で使用されるとき、「倍数体」細胞は、ゲノムが2つ以上のコピーで存在する任意の細胞を指し得る。倍数体細胞は、天然で倍数体状態において見られる種類の細胞を指し得るか、又はそれは、倍数体状態で存在するように (例えば、減数分裂、細胞質分裂又はDNA複製の特異的な調節、変化、不活性化、活性化又は改変によって) 誘導された細胞を指し得る。倍数体細胞は、ゲノム全体が倍数体である細胞を指し得るか、又はそれは、特定の目的のゲノム遺伝子座において倍数体である細胞を指し得る。理論に拘束されることを望むものではないが、一倍体細胞と比べて倍数体細胞のゲノムエンジニアリングではガイドRNAの存在量が律速成分となることが多くなり得るため、本明細書に記載される Cas13b CRISPR系を用いた方法は特定の真菌細胞タイプの使用を生かし得ると考えられる。

30

【0292】

一部の実施形態において、真菌細胞は、二倍体細胞である。本明細書で使用されるとき、「二倍体」細胞は、ゲノムが2つのコピーで存在する任意の細胞を指し得る。二倍体細胞は、天然で二倍体状態において見られる種類の細胞を指し得るか、又はそれは、二倍体状態で存在するように (例えば、減数分裂、細胞質分裂又はDNA複製の特異的な調節、変化、不活性化、活性化又は改変によって) 誘導された細胞を指し得る。例えば、*S. cerevisiae* 株 S228C は、一倍体又は二倍体状態で維持され得る。二倍体細胞は、ゲノム全体が二倍体である細胞を指し得るか、又はそれは、特定の目的のゲノム遺伝子座において二倍体である細胞を指し得る。一部の実施形態において、真菌細胞は一倍体細胞である。本明細書で使用されるとき、「一倍体」細胞は、ゲノムが1つのコピーで存在する任意の細胞を指し得る。一倍体細胞は、天然で一倍体状態において見られる種類の細胞を指し得るか、又はそれは、一倍体状態で存在するように (例えば、減数分裂、細胞質分裂又はDNA複製の特異的な調節、変化、不活性化、活性化又は改変によって) 誘導された細胞を指し得る。例えば、*S. cerevisiae* 株 S228C は、一倍体又は二倍体状態で維持され得る。一倍体細胞は、ゲノム全体が一倍体である細胞を指し得るか、又はそれは、特定の目的のゲノム遺伝子座において一倍体である細胞を指し得る。

40

50

【0293】

本明細書で使用されるとき、「酵母発現ベクター」は、RNA及び／又はポリペプチドをコードする1つ以上の配列を含有する核酸であって、且つその核酸の発現を制御する任意の所望のエレメント並びに酵母細胞内部における発現ベクターの複製及び維持を可能にする任意のエレメントを更に含有し得る核酸を指す。多くの好適な酵母発現ベクター及びそれらの特徴が当該技術分野において公知である。例えば、様々なベクター及び技法が、Yeast Protocols, 2nd edition, Xiao, W., ed. (Humana Press, New York, 2007) 及びBuckholz, R. G. and Gleeson, M. A. (1991) Biotechnology (NY) 9 (11): 1067-72に例示されている。酵母ベクターは、限定なしに、セントロメア (CEN) 配列、自己複製配列 (ARS)、目的の配列又は遺伝子に作動可能に連結されるRNAポリメラーゼIIIプロモーターなどのプロモーター、RNAポリメラーゼIIIターミネーターなどのターミネーター、複製起点及びマーカー遺伝子 (例えば、栄養要求体、抗生物質又は他の選択可能マーカー) を含有し得る。酵母において用いられる発現ベクターの例としては、プラスミド、酵母人工染色体、2 μ プラスミド、酵母組込みプラスミド、酵母複製プラスミド、シャトルベクター及びエピソームプラスミドを挙げることができる。

10

【0294】

植物及び植物細胞のゲノムにおけるRNAターゲティングCRISPR系構成成分の安定組込み

20

詳細な実施形態では、植物細胞のゲノムへの安定組込みのためRNAターゲティングCRISPR系の構成成分をコードするポリヌクレオチドを導入することが想定される。これらの実施形態において、形質転換ベクター又は発現系の設計は、いつ、どこで及びどのような条件下でガイドRNA及び／又はRNAターゲティング遺伝子を発現させるかに応じて調整することができる。

【0295】

詳細な実施形態では、RNAターゲティングCRISPR系の構成成分を植物細胞のゲノムDNAに安定に導入することが想定される。それに加えて又は代えて、限定はされないがプラスチド、ミトコンドリア又は葉緑体などの植物細胞小器官のDNAへの安定組込みのためRNAターゲティングCRISPR系の構成成分を導入することが想定される。

30

【0296】

植物細胞のゲノムに安定に組み込むための発現系は、以下のエレメントの1つ以上を含有し得る：植物細胞においてガイドRNA及び／又はRNAターゲティング酵素を発現させるために使用し得るプロモーターエレメント；発現を増強する5'非翻訳領域；単子葉植物細胞など、特定の細胞における発現を更に増強するイントロンエレメント；1つ以上のガイドRNA及び／又はRNAターゲティング遺伝子配列及び他の所望のエレメントを挿入するのに好都合な制限部位を提供する多クローニング部位；及び発現した転写物の効率的な終結をもたらす3'非翻訳領域。

【0297】

発現系のエレメントは、プラスミド又は形質転換ベクターのように環状又は線状二本鎖DNAのように非環状のいずれかである1つ以上の発現構築物上にあり得る。詳細な実施形態では、RNAターゲティングCRISPR発現系は、少なくとも、

40

(a) 植物の標的配列とハイブリダイズするガイドRNA (gRNA) であって、ガイド配列とダイレクトリピート配列とを含むガイドRNAをコードするヌクレオチド配列、及び

(b) RNAターゲティングタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、構成成分(a)又は(b)は、同じ又は異なる構築物上に位置し、これにより、異なるヌクレオチド配列は、植物細胞において作動可能な同じ又は異なる調節エレメントの制御下にあることができる。

【0298】

50

RNAターゲティングCRISPR系の構成成分及び該当する場合には鋳型配列を含有するDNA構築物は、種々の従来技術によって植物、植物部位又は植物細胞のゲノムに導入し得る。このプロセスには、概して、好適な宿主細胞又は宿主組織を選択するステップ、宿主細胞又は宿主組織に構築物を導入するステップ及びそれから植物細胞又は植物を再生するステップが含まれる。

詳細な実施形態では、DNA構築物は、限定はされないが、電気穿孔、マイクロインジェクション、植物細胞プロトプラストのエアロゾルビーム注入などの技法を用いて植物細胞に導入し得るか、又はDNA構築物は、DNAパーティクルボンバードメントなどの微粒子銃法を用いて植物組織に直接導入することもできる (Fuet al., Transgenic Res. 2000 Feb; 9 (1): 11-9 も参照されたい)。パーティクルボンバードメントの基本は、目的の遺伝子で被覆された粒子を細胞に向けて加速させることにより粒子を原形質に侵入させて、典型的にはゲノムへの安定組込みを得るというものである (例えば、Klein et al, Nature (1987)、Klein et al, Bio/Technology (1992)、Casas et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) を参照されたい)。

【0299】

詳細な実施形態では、RNAターゲティングCRISPR系の構成成分を含有するDNA構築物は、アグロバクテリウム属 (Agrobacterium) 媒介性形質転換によって植物に導入し得る。DNA構築物を好適なT-DNAフランキング領域と組み合わせて、従来のアグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) 宿主ベクターに導入し得る。外来DNAは、植物を感染させることによるか、又は植物プロトプラストを、1つ以上のTi (腫瘍誘発) プラスミドを含有するアグロバクテリウム属 (Agrobacterium) 細菌と共にインキュベートすることにより、植物のゲノムに取り入れることができる (例えば、Fraleley et al., (1985), Rogers et al., (1987) 及び米国特許第5, 563, 055号明細書を参照されたい)。

【0300】

植物プロモーター

植物細胞における適切な発現を確実にするため、本明細書に記載されるCas13b CRISPR系の構成成分は、典型的には植物プロモーター、即ち植物細胞において作動可能なプロモーターの制御下に置かれる。様々な種類のプロモーターの使用が想定される。

【0301】

構成的植物プロモーターは、それが制御するオープンリーディングフレーム (ORF) を植物の全て又はほぼ全ての発生段階において全て又はほぼ全ての植物組織で発現 (「構成的発現」と称される) させることが可能なプロモーターである。構成的プロモーターの非限定的な1つの例はカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターである。本発明は、RNA配列の改変方法を想定し、そのため植物生体分子の発現を調節することも想定する。従って、本発明の詳細な実施形態では、RNAターゲティングCRISPR系の1つ以上のエレメントを調節型であり得るプロモーターの制御下に置くことが有利である。

「調節型プロモーター」は、構成的でないものの時間的及び/又は空間的に調節された形で遺伝子発現を導くプロモーターを指し、組織特異的、組織優先的及び誘導性プロモーターが含まれる。異なるプロモーターは、異なる組織又は細胞型において、又は異なる発生段階で、又は異なる環境条件に応答して遺伝子の発現を導き得る。詳細な実施形態では、RNAターゲティングCRISPR構成成分の1つ以上がカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターなどの構成的プロモーターの制御下で発現し、組織優先的 (issue-preferred) プロモーターを利用することにより、特定の植物組織内のある種の細胞型、例えば葉又は根の維管束細胞又は種子の特異的細胞における発現の増強を標的化することができる。RNAターゲティングCRISPR系において用いられる詳細なプロモーターの例については、Kawamata et al., (1997) Plan

t Cell Physiol 38:792-803; Yamamoto et al., (1997) Plant J 12:255-65; Hire et al., (1992) Plant Mol Biol 20:207-18、Kuster et al., (1995) Plant Mol Biol 29:759-72及びCapana et al., (1994) Plant Mol Biol 25:681-91が参照される。誘導性で、且つ遺伝子編集又は遺伝子発現の時空間的制御を可能にするプロモーターの例は、ある形態のエネルギーを使用し得る。エネルギーの形態としては、限定はされないが、音響エネルギー、電磁放射線、化学エネルギー及び／又は熱エネルギーを挙げることができる。誘導性系の例としては、テトラサイクリン誘導性プロモーター（Tet-On又はTet-Off）、小分子ツーハイブリッド転写活性化システム（FKBP、ABA等）又は光誘導性系（フィトクロム、LOVドメイン又はクリプトクロム）、例えば転写活性の配列特異的变化を導く光誘導性転写エフェクター（LITE）が挙げられる。光誘導性系の構成成分には、RNAターゲティングCRISPR酵素、光応答性シクロヘテロ二量体（例えば、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）由来）及び転写活性化／抑制ドメインが含まれ得る。誘導性DNA結合タンパク質及びその使用方法の更なる例が、米国仮特許出願第61/736465号明細書及び米国仮特許出願第61/721,283号明細書（本明細書によって全体として参照により援用される）に提供される。

10

【0302】

詳細な実施形態では、例えば化学物質調節型プロモーターを使用して一過性又は誘導性発現を実現することができ、即ちこれによれば外因性化学物質を加えると遺伝子発現が誘導される。遺伝子発現の調節は、化学物質抑制性プロモーターによっても達成することができ、ここで、化学物質を加えると遺伝子発現が抑制される。化学物質誘導性プロモーターとしては、限定はされないが、ベンゼンスルホンアミド系除草剤解毒剤によって活性化するトウモロコシln2-2プロモーター（De Veylder et al., (1997) Plant Cell Physiol 38:568-77）、発芽前除草剤として使用される疎水性求電子化合物によって活性化するトウモロコシGSTプロモーター（GST-II-27、国際公開第93/01294号パンフレット）及びサリチル酸によって活性化するタバコPR-1aプロモーター（Ono et al., (2004) Biosci Biotechnol Biochem 68:803-7）が挙げられる。テトラサイクリン誘導性及びテトラサイクリン抑制性プロモーターなど、抗生物質によって調節されるプロモーター（Gatz et al., (1991) Mol Gen Genet 227:229-37；米国特許第5,814,618号明細書及び同第5,789,156号明細書）も本明細書において使用することができる。

20

30

【0303】

特定の植物細胞小器官における移行及び／又はそこでの発現

発現系は、特定の植物細胞小器官への移行及び／又はそこでの発現のためのエレメントを含み得る。

【0304】

葉緑体ターゲティング

詳細な実施形態では、RNAターゲティングCRISPR系を使用して葉緑体遺伝子の発現及び／又は翻訳を特異的に改変するか、又は葉緑体での発現を確実にすることが想定される。この目的で、葉緑体形質転換方法又はRNAターゲティングCRISPR構成成分の葉緑体への区画化が用いられる。例えば、プラスチドゲノムに遺伝子改変を導入すると、花粉を通じた遺伝子流動などのバイオセーフティ問題を軽減することができる。

40

【0305】

葉緑体形質転換方法は、当該技術分野において公知であり、パーティクルボンバードメント、PEG処理及びマイクロインジェクションが挙げられる。加えて、国際公開第2010061186号パンフレットに記載されるとおり、核ゲノムからプラスチドへの形質転換カセットの移行が関わる方法を用いることができる。

50

【0306】

代わりに、RNAターゲティングCRISPR構成成分の1つ以上を植物葉緑体に標的化することが想定される。これは、RNAターゲティングタンパク質をコードする配列の5'領域に作動可能に連結された、葉緑体輸送ペプチド（CTP）又はプラスチド輸送ペプチドをコードする配列を発現構築物に取り込むことにより実現する。CTPは葉緑体への移行中にプロセッシング段階で除去される。発現タンパク質の葉緑体ターゲティングは当業者に周知である（例えば、Protein Transport into Chloroplasts, 2010, Annual Review of Plant Biology, Vol. 61: 157-180を参照されたい）。かかる実施形態では、1つ以上のガイドRNAを植物葉緑体に標的化することも望ましい。葉緑体局在化配列を用いてガイドRNAを葉緑体に移行させるために用いることのできる方法及び構築物については、例えば、米国特許出願公開第20040142476号明細書（参照により本明細書に援用される）に記載されている。かかる各種構築物を本発明の発現系に取り込むことにより、RNAターゲティングガイドRNAを効率的に移行させることができる。

10

【0307】

藻類細胞におけるCRISPR-RNAターゲティング系をコードするポリヌクレオチドの導入

トランスジェニック藻類（又はセイヨウアブラナなどの他の植物）は、植物油又はバイオ燃料、例えばアルコール類（特にメタノール及びエタノール）又は他の生産物の生産に特に有用であり得る。これらは、油又はバイオ燃料産業で使用される高レベルの油又はアルコールを発現又は過剰発現するようにエンジニアリングされ得る。

20

【0308】

米国特許第8945839号明細書は、Cas9を用いた微細藻類（コナミドリムシ（*Chlamydomonas reinhardtii*）細胞）種のエンジニアリング方法について記載している。同様のツールを使用して、本明細書に記載されるRNAターゲティングCRISPR系の方法をクラミドモナス属（*Chlamydomonas*）種及び他の藻類に適用することができる。詳細な実施形態では、Hsp70A-RbcS2又はβ2-チューブリンなどの構成的プロモーターの制御下でRNAターゲティングタンパク質を発現するベクターを使用して藻類にRNAターゲティングタンパク質及びガイドRNAを導入し、発現させる。ガイドRNAは、任意選択で、T7プロモーターを含有するベクターを使用して送達される。代わりに、藻類細胞にRNAターゲティングmRNA及びインビトロ転写ガイドRNAが送達され得る。当業者には、GeneArtクラミドモナスエンジニアリングキットからの標準的な推奨プロトコルなど、電気穿孔プロトコルが利用可能である。

30

【0309】

酵母細胞におけるRNAターゲティング構成成分をコードするポリヌクレオチドの導入

詳細な実施形態では、本発明は、酵母細胞におけるRNA編集のためのRNAターゲティングCRISPR系の使用に関する。RNAターゲティングCRISPR系構成成分をコードするポリヌクレオチドの導入に用いることのできる酵母細胞の形質転換方法は当業者に周知であり、Kawai et al., 2010, Bioeng Bugs. 2010 Nov-Dec; 1(6): 395-403) によってレビューされている。非限定的な例としては、酢酸リチウム処理による酵母細胞の形質転換（これはキャリアDNA及びPEG処理を更に含み得る）、ボンバードメント又は電気穿孔によるものが挙げられる。

40

【0310】

植物及び植物細胞におけるRNAターゲティングCRISPR系構成成分の一過性発現

詳細な実施形態では、ガイドRNA及び／又はRNAターゲティング遺伝子を植物細胞において一過性に発現させることが想定される。これらの実施形態では、細胞内にガイドRNA及びRNAターゲティングタンパク質の両方が存在するときに限りRNAターゲティングCRISPR系がRNA標的分子を改変することが確実となり、従って遺伝子発現

50

を更に制御することができる。RNAターゲティング酵素の発現は一過性であるため、かかる植物細胞から再生した植物は、典型的には外来DNAを含有しない。詳細な実施形態では、RNAターゲティング酵素は植物細胞によって安定に発現し、ガイド配列が一過性に発現する。

【0311】

特に好ましい実施形態において、RNAターゲティングCRISPR系構成成分は植物ウイルスベクターを使用して植物細胞に導入することができる (Scholtz et al., 1996, Annu Rev Phytopathol., 1996; 34: 299-323)。更なる詳細な実施形態では、前記ウイルスベクターはDNAウイルス由来のベクターである。例えば、ジェミニウイルス (例えば、キャベツ巻葉ウイルス、マメ萎黄ウイルス、コムギ萎縮ウイルス、トマト巻葉ウイルス、トウモロコシ条斑ウイルス、タバコ巻葉ウイルス又はトマトゴールデンモザイクウイルス) 又はナノウイルス (例えば、ソラマメ黄化えそウイルス)。他の詳細な実施形態では、前記ウイルスベクターはRNAウイルス由来のベクターである。例えば、トブラウイルス (例えば、タバコ茎えそウイルス、タバコモザイクウイルス)、ポテックスウイルス (例えば、ジャガイモXウイルス) 又はホルデイウイルス (例えば、ムギ斑葉モザイクウイルス)。植物ウイルスの複製ゲノムは非組込みベクターであり、これはGMO植物の作製の回避との関連で有利である。

【0312】

詳細な実施形態では、RNAターゲティングCRISPR構築物の一過性発現に使用されるベクターは、例えばpEAQベクターであり、これはプロトプラストにおけるアグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*) 媒介性一過性発現に合わせて調整されているものである (Sainsbury F. et al., Plant Biotechnol J., 2009 Sep; 7 (7): 682-93)。CRISPR酵素を発現する安定トランスジェニック植物において改変キャベツ巻葉ウイルス (CaLCuV) ベクターを使用してgRNAを発現させた、ゲノム位置の正確なターゲティングが実証された (Scientific Reports 5, Article number: 14926 (2015), doi: 10.1038/srep14926)。

【0313】

詳細な実施形態では、ガイドRNA及び／又はRNAターゲティング遺伝子をコードする二本鎖DNA断片を植物細胞に一過性に導入することができる。かかる実施形態において、導入される二本鎖DNA断片は、細胞においてRNA分子を改変するのに十分な、しかし企図された時間が経った後又は1回以上の細胞分裂後に残らない量で提供される。植物においてDNAトランスファーを導く方法は当業者に公知である (例えば、Davey et al., Plant Mol Biol., 1989 Sep; 13 (3): 273-85を参照されたい)

【0314】

他の実施形態では、RNAターゲティングタンパク質をコードするRNAポリヌクレオチドが、RNA分子細胞を (少なくとも1つのガイドRNAの存在下で) 改変するのに十分な、しかし企図された時間が経った後又は1回以上の細胞分裂後に残らない量で植物細胞に導入され、次にこれが宿主細胞によって翻訳及びプロセッシングされて、タンパク質が生成される。植物プロトプラストにmRNAを一過性発現のため導入する方法は当業者に公知である (例えば、Gallie, Plant Cell Reports (1993), 13; 119-122を参照されたい)。上記に記載される異なる方法の組み合わせも想定される。

【0315】

植物細胞へのRNAターゲティングCRISPR構成成分の送達

詳細な実施形態では、RNAターゲティングCRISPR系の1つ以上の構成成分を植物細胞に直接送達することが有益である。これは特に、非トランスジェニック植物の作成に有益である (下記を参照されたい)。詳細な実施形態では、RNAターゲティング構成成分の1つ以上が植物又は植物細胞の外部で調製され、細胞に送達される。例えば、詳細

な実施形態では、RNAターゲティングタンパク質がインビトロで調製された後、植物細胞に導入される。RNAターゲティングタンパク質は当業者に公知の、組換え産生を含めた様々な方法によって調製することができる。発現後、RNAターゲティングタンパク質が単離され、必要に応じてリフォールディングされ、精製され、且つ任意選択でHisタグなどの任意の精製タグを除去するため処理される。粗製の、部分的に精製された又はより完全に精製されたRNAターゲティングタンパク質が得られると、そのタンパク質が植物細胞に導入され得る。

【0316】

詳細な実施形態では、RNAターゲティングタンパク質が、目的のRNAを標的とするガイドRNAと混合されて、予めアセンブルされたりボ核タンパク質が形成される。

10

【0317】

個々の構成成分又は予めアセンブルされたりボ核タンパク質は、電気穿孔を用いるか、RNAターゲティング関連遺伝子産物で被覆した粒子のボンバードメントによるか、化学的トランスフェクションによるか、又は細胞膜を越えて輸送する他の何らかの手段によって植物細胞に導入することができる。例えば、予めアセンブルされたCRISPRリボ核タンパク質による植物プロトプラストのトランスフェクションは、植物ゲノムの標的化した改変を確実にすることが実証されている(Woo et al. Nature Biotechnology, 2015; DOI: 10.1038/nbt.3389による記載のとおり)。これらの方法を修正して、植物におけるRNA分子の標的化した改変を実現することができる。

20

【0318】

詳細な実施形態では、RNAターゲティングCRISPR系構成成分はナノ粒子を用いて植物細胞に導入される。構成成分は、タンパク質又は核酸のいずれとしても、又は代わりにそれらの組み合わせでも、ナノ粒子上にアップロードするか又はそれにパッケージングして植物に適用することができる(例えば、国際公開第2008042156号パンフレット及び米国特許出願公開第20130185823号明細書の記載など)。詳細には、本発明の実施形態は、国際公開第2015089419号パンフレットに記載されるとおり、RNAターゲティングタンパク質をコードするDNA分子、ガイドRNAをコードするDNA分子及び／又は単離ガイドRNAがアップロード又はパッケージングされたナノ粒子を含む。

30

【0319】

RNAターゲティングCRISPR系の1つ以上の構成成分を植物細胞に導入する更なる手段は、細胞透過性ペプチド(CPP)を用いることによるものである。従って、詳細には、本発明の実施形態は、RNAターゲティングタンパク質に連結された細胞透過性ペプチドを含む組成物を含む。本発明の詳細な実施形態において、RNAターゲティングタンパク質及び／又はガイドRNAは、それらを植物プロトプラストの内部に有効に輸送するため1つ以上のCPPにカップリングされる(ヒト細胞におけるCas9については、Ramakrishna (2014 Genome Res. 2014 Jun; 24(6): 1020-7)。他の実施形態において、RNAターゲティング遺伝子及び／又はガイドRNAは、植物プロトプラスト送達のため1つ以上のCPPにカップリングされた1つ以上の環状又は非環状DNA分子によってコードされる。次に、植物プロトプラストは、植物細胞及び更に植物に再生される。CPPは、概して、生体分子を、受容体非依存的に細胞膜を越えて輸送する能力を有するタンパク質又はキメラ配列のいずれかに由来する35アミノ酸未満の短鎖ペプチドとして記載される。CPPは、カチオン性ペプチド、疎水性配列を有するペプチド、両親媒性ペプチド、プロリンリッチな抗微生物性の配列を有するペプチド及びキメラ又は二部ペプチドであり得る(Pooga and Langle 2005)。CPPは生体膜を透過することが可能であり、そのため様々な生体分子の細胞膜を越えて細胞質に入る移動を引き起こし、且つそれらの細胞内輸送を改善することが可能であり、従って生体分子(biomolecule)と標的の相互作用を促進する。CPPの例としては、中でも特に、HIV-1型によるウイルス複製に必要な

40

50

核内転写活性化タンパク質である Tat、ペネトラチン、カボジ線維芽細胞成長因子（FGF）シグナルペプチド配列、インテグリンβ3シグナルペプチド配列；ポリアルギニンペプチドArg配列、グアニンリッチ分子輸送体、スィートアローペプチド等が挙げられる。

【0320】

植物、藻類又は真菌適用が想定される標的RNA

標的RNA、即ち目的のRNAは、本発明によって標的化されるRNAであり、標的RNA上の目的の標的部位へのRNAターゲティングタンパク質の動員及びそこにおける結合につながる。標的RNAは、任意の好適な形態のRNAであり得る。これには、一部の実施形態では、mRNAが含まれ得る。他の実施形態では、標的RNAにはトランスファーRNA（tRNA）又はリボソームRNA（rRNA）が含まれ得る。他の実施形態では、標的RNAには、干渉性RNA（RNAi）、マイクロRNA（miRNA）、マイクロスイッチ、マイクロザイム、サテライトRNA及びRNAウイルスが含まれ得る。標的RNAは植物細胞の細胞質に、又は細胞核に、又はミトコンドリア、葉緑体若しくはプラスチドなどの植物細胞小器官に位置し得る。

【0321】

詳細な実施形態において、RNAターゲティングCRISPR系を使用してRNAが切断されるか、又は他にRNA発現が阻害される。

【0322】

RNA調節による植物遺伝子発現の調節のためのRNAターゲティングCRISPR系の使用

RNAターゲティングタンパク質は、好適なガイドRNAと共に、RNAプロセシングの制御による遺伝子発現のターゲティングにも使用され得る。RNAプロセシングの制御には、選択的スプライシング又は特定のスプライス変異体若しくはアイソフォームの特異的ターゲティングを含めたRNAスプライシング；ウイルス複製（詳細には、植物のウィロイドを含めた植物ウイルスのもの及びtRNA生合成などのRNAプロセシング反応が含まれ得る。好適なガイドRNAと組み合わせたRNAターゲティングタンパク質は、RNA活性化（RNAa）の制御にも使用され得る。RNAaは遺伝子発現の促進につながり、そのため遺伝子発現の制御はRNAaの破壊又は低減、従って遺伝子発現の促進低下による形で実現し得る。

【0323】

本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質は、更に、植物における、特にRNAウイルスに対する抗ウイルス活性に使用することができる。エフェクタータンパク質は、選択のウイルスRNA配列に選択的な好適なガイドRNAを使用してウイルスRNAに標的化することができる。詳細には、エフェクタータンパク質は、一本鎖RNAなど、RNAを切断する活性ヌクレアーゼであり得る。従って、抗ウイルス剤としての本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質の使用が提供される。このように拮抗し得るウイルスの例としては、限定はされないが、タバコモザイクウイルス（TMV）、トマト黄化えそウイルス（TSWV）、キュウリモザイクウイルス（CMV）、ジャガイモウイルスY（PVY）、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）（RTウイルス）、プラムポックスウイルス（PPV）、ブロムモザイクウイルス（BMV）及びジャガイモXウイルス（PVX）が挙げられる。

【0324】

標的遺伝子改変の代替手段としての、植物、藻類又は真菌におけるRNA発現の調節の例は、本明細書に更に記載される。

【0325】

特に、調節されたmRNA切断による調節された遺伝子発現制御が興味深い。これは、RNAターゲティングのエレメントを本明細書に記載されるとおりの調節型プロモーターの制御下に置くことにより実現し得る。

【0326】

tRNA分子の機能を回復させるためのRNAターゲティングCRISPR系の使用

Pring et alが、DNAと異なるタンパク質をコードするようにmRNA配列を変化させる植物ミトコンドリア及び葉緑体におけるRNA編集について記載している。(Plant Mol. Biol. (1993) 21(6):1163-1170. doi:10.1007/BF00023611)。本発明の詳細な実施形態において、ミトコンドリア及び葉緑体mRNAを特異的に標的化するRNAターゲティングCRISPR系のエレメントを植物又は植物細胞に導入することにより、かかる植物細胞小器官で異なるタンパク質を発現させて、インビボで起こる過程を模倣することができる。

【0327】

RNA発現を阻害するためのRNA干渉の代替手段としてのRNAターゲティングCRISPR系の使用

RNAターゲティングCRISPR系は、RNA阻害又はRNA干渉と同様の用途があり、従ってかかる方法に代えることもできる。詳細な実施形態において、本発明の方法は、例えば、干渉リボ核酸(sRNA又はshRNA又はdsRNAなど)の代わりとしてのRNAターゲティングCRISPRの使用を含む。標的遺伝子改変の代替手段としての植物、藻類又は真菌におけるRNA発現の阻害の例は、本明細書に更に記載される。

【0328】

RNA干渉を制御するためのRNAターゲティングCRISPR系の使用

干渉性RNA又はmiRNAの制御は、インビボ又はインビトロで干渉性RNA又はmiRNAの寿命を短縮することによる手法で見られるオフターゲット効果(OTE)を低減することを促進し得る。詳細な実施形態において、標的RNAには干渉性RNA、即ちRNA干渉経路に関与するRNA、例えばshRNA、sRNAなどが含まれ得る。他の実施形態において、標的RNAにはマイクロRNA(miRNA)又は二本鎖RNA(dsRNA)が含まれ得る。

【0329】

他の詳細な実施形態において、RNAターゲティングタンパク質及び好適なガイドRNAが(例えば、空間的又は時間的に調節型プロモーター、例えば組織特異的又は細胞周期特異的プロモーター及び/又はエンハンサーの制御下で)選択的に発現する場合、これを用いて細胞又は系を(インビボ又はインビトロで)その細胞におけるRNAiから「保護」することができる。これは、RNAiが必要な隣接組織又は細胞において、又はエフェクタータンパク質及び好適なガイドが発現する及び発現しない(即ちそれぞれRNAiが制御されない及びそれが制御される)細胞又は組織を比較する目的で有用であり得る。RNAターゲティングタンパク質を使用して、リボザイム、リボソーム又はリボスイッチなど、RNAを含むか又はそれからなる分子を制御するか又はそれに結合し得る。本発明の実施形態では、ガイドRNAがRNAターゲティングタンパク質をそうした分子に動員することにより、RNAターゲティングタンパク質はそれらに結合することが可能になる。

【0330】

本発明のRNAターゲティングCRISPR系は、本願がこの系を情報に基づいてエンジニアリングするための基礎を提供するため、本開示から、過度の実験を行うことなく、害虫管理、植物病害管理及び除草剤耐性管理を含めた、且つ植物アッセイにおける及び他の適用に向けたインプラントRNAi技術の領域において適用することができる(例えば、Kim et al., Pesticide Biochemistry and Physiology (Impact Factor: 2.01). 01/2015; 120. DOI:10.1016/j.pestbp.2015.01.002; Sharma et al. in Academic Journals (2015), Vol. 12(18) pp 2303-2312; Green J. M, in Pest Management Science, Vol 70(9), pp 1351-1357を参照されたい)。

【0331】

植物、藻類及び真菌においてリボスイッチを改変し、且つ代謝調節を制御するためのRNAターゲティングCRISPR系の使用

リボスイッチ（アプタザイムとしても知られる）はメッセンジャーRNAの調節性セグメントであり、小分子に結合して、従って遺伝子発現を調節する。この機構により、細胞はそれらの小分子の細胞内濃度を検知することが可能になる。特定のリボスイッチは、典型的にはその隣接遺伝子を、その遺伝子の転写、翻訳又はスプライシングを変化させることによって調節する。従って、本発明の詳細な実施形態では、リボスイッチを標的とする好適なガイドRNAと組み合わせたRNAターゲティングタンパク質を使用することによるリボスイッチ活性の制御が想定される。これは、リボスイッチの切断又はそれへの結合によるものであり得る。詳細な実施形態では、リボスイッチ活性の低減が想定される。最近になってチアミンピロリン酸（TPP）に結合するリボスイッチが特徴付けられ、植物及び藻類におけるチアミン生合成を調節することが分かった。更に、このエレメントは植物における一次代謝の必須調節因子であるものと見られる（Bocobza and Aharoni, Plant J. 2014 Aug; 79 (4): 693-703. doi: 10.1111/tpj.12540. Epub 2014 Jun 17）。TPPリボスイッチは、アカパンカビ（*Neurospora crassa*）など、ある種の真菌にも見られ、ここで、それは、選択的スプライシングを制御して上流オープンリーディングフレーム（uORF）を条件的に産生し、それにより下流遺伝子の発現に影響を及ぼす（Cheah MT et al., (2007) Nature 447 (7143): 497-500. doi: 10.1038/nature05769）。本明細書に記載されるRNAターゲティングCRISPR系を使用して植物、藻類又は真菌の内因性リボスイッチ活性を操作し、そのようにしてそれにより制御される下流遺伝子の発現を変化させ得る。詳細な実施形態において、RNAターゲティングCRISPR系は、インビボ又はインビトロでのリボスイッチ機能のアッセイ及び代謝ネットワークに対するその関連性の研究において使用し得る。詳細な実施形態において、RNAターゲティングCRISPR系は、潜在的には、植物及び遺伝子制御プラットフォームにおける代謝産物センサーとしてのリボスイッチのエンジニアリングに使用し得る。

【0332】

植物、藻類又は真菌のRNA i スクリーンにおけるRNAターゲティングCRISPR系の使用

RNA i スクリーンにより、そのノックダウンが表現型の変化に関連する遺伝子産物を同定して、生物学的経路を調べ及び構成要素を同定することができる。本発明の詳細な実施形態では、本明細書に記載されるCas13bタンパク質及び好適なガイドRNAを使用してスクリーンにおけるRNA i の活性を除去し又は低下させ、従って（それまで干渉を受けていた）遺伝子産物の活性を（干渉／抑制を除去し又は低下させることで）回復させることにより、こうしたスクリーンにも又はスクリーンの間も制御を及ぼし得る。

【0333】

インビボ及びインビトロでRNA分子を可視化するためのRNAターゲティングタンパク質の使用

詳細な実施形態において、本発明は核酸結合系を提供する。RNAと相補的プローブとのインサイチュハイブリダイゼーションは、強力な技法である。典型的には、ハイブリダイゼーションによる核酸の検出には蛍光DNAオリゴヌクレオチドが使用される。ロックド核酸（LNA）など、ある種の改変によって効率の増加が達成されているが、効率的且つ汎用的な代替手段が依然として必要とされている。このように、インサイチュハイブリダイゼーション用の効率的且つ適合可能な系の代替手段として、RNAターゲティング系の標識エレメントを使用することができる。

【0334】

植物及び酵母におけるRNAターゲティングCRISPR系の更なる適用
バイオ燃料生産におけるRNAターゲティングCRISPR系の使用

用語「バイオ燃料」は、本明細書で使用されるとき、植物及び植物由来の資源から作ら

れる代替燃料である。再生可能バイオ燃料は、炭素固定の過程を通じてエネルギーを得てきた有機物から抽出することができるか、又はバイオマスの使用若しくは変換によって作られる。このバイオマスはバイオ燃料に直接使用し得るか、又は熱変換、化学変換及び生化学変換によって好都合なエネルギー含有物質に変換され得る。このバイオマス変換により、固体、液体又は気体形態の燃料が得られ得る。バイオ燃料には、バイオエタノールとバイオディーゼルとの2種類がある。バイオエタノールは、主として、大部分がトウモロコシ及びサトウキビに由来するセルロース（デンプン）の糖発酵プロセスによって生産される。他方でバイオディーゼルは、主として、ナタネ、ヤシ及びダイズなどの油料作物から生産される。バイオ燃料は主として輸送機関に用いられる。

【0335】

10

バイオ燃料生産のための植物特性の増強

詳細な実施形態において、発酵に際して糖類がより効率的に放出されるよう主要な加水分解剤を到達し易くするため、本明細書に記載されるとおりのRNAターゲティングCRISPRを使用する方法を用いて細胞壁の特性を変化させる。詳細な実施形態では、セルロース及び／又はリグニンの生合成が改変される。セルロースは細胞壁の主要な構成成分である。セルロース及びリグニンの生合成は共調節される。植物中のリグニンの割合を低下させることにより、セルロースの割合が増加し得る。詳細な実施形態では、本明細書に記載される方法を用いて植物におけるリグニン生合成が下方制御され、それにより発酵性糖質を増加させる。より詳細には、国際公開第2008064289 A2号パンフレットに開示されるとおり、本明細書に記載される方法を用いて、4-クマル酸3-ヒドロキシラーゼ（C3H）、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）、桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼ（C4H）、ヒドロキシシナモイルトランスフェラーゼ（HCT）、コーヒー酸O-メチルトランスフェラーゼ（COMT）、カフェオイルCoA3-O-メチルトランスフェラーゼ（CCoAOMT）、フェルラ酸5-ヒドロキシラーゼ（F5H）、シナミルアルコールデヒドロゲナーゼ（CAD）、シナモイルCoA-レダクターゼ（CCR）、4-クマル酸-CoAリガーゼ（4CL）、モノリグノール-リグニン特異的グリコシルトランスフェラーゼ及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ALDH）からなる群から選択される少なくとも第1のリグニン生合成遺伝子が下方制御される。

20

【0336】

詳細な実施形態において、本明細書に記載される方法を用いて、発酵中に発生する酢酸レベルがより低い植物マスが作製される（国際公開第2010096488号パンフレットも参照されたい）。

30

【0337】

バイオ燃料生産のための酵母の改変

詳細な実施形態において、本明細書に提供されるRNAターゲティング酵素は組換え微生物によるバイオエタノールの生産に使用される。例えば、RNAターゲティング酵素を使用して酵母などの微生物をエンジニアリングすることにより、発酵性糖類からバイオ燃料又はバイオポリマーを作成することができ、且つ任意選択で発酵性糖類の供給源としての農業廃棄物から得られた植物由来のリグノセルロースを分解することが可能である。より詳細には、本発明は、RNAターゲティングCRISPR複合体を使用してバイオ燃料生産に必要な内因性遺伝子の発現を改変し、且つ／又はバイオ燃料合成を妨げ得る内因性遺伝子を改変する方法を提供する。より詳細には、本方法は、ピルビン酸からエタノール又は別の目的産物への変換に関与する酵素をコードする1つ以上のヌクレオチド配列の酵母などの微生物における発現を刺激することを含む。詳細な実施形態では、本方法は、セルラーゼなど、微生物によるセルロースの分解を実現する1つ以上の酵素の発現の刺激を確実にする。更に別の実施形態では、RNAターゲティングCRISPR複合体を使用して、バイオ燃料生産経路と競合する内因性代謝経路が抑制される。

40

【0338】

植物油又はバイオ燃料の生産のための藻類及び植物の改変

トランスジェニック藻類又はセイヨウアブラナなどの他の植物は、植物油又はバイオ燃

50

料、例えばアルコール類（特にメタノール及びエタノール）の生産に特に有用であり得る。これらは、油又はバイオ燃料産業で使用される高レベルの油又はアルコールを発現又は過剰発現するようにエンジニアリングされ得る。

【0339】

米国特許第8945839号明細書は、Cas9を用いた微細藻類（コナミドリムシ（*Chlamydomonas reinhardtii*）細胞）のエンジニアリング方法について記載している。同様のツールを使用して、本明細書に記載されるRNAターゲティングCRISPR系の方法をクラミドモナス属（*Chlamydomonas*）種及び他の藻類に適用することができる。詳細な実施形態では、Hsp70A-RbcS2又はβ2-チューブリンなどの構成的プロモーターの制御下でRNAターゲティングエフェクタータンパク質を発現するベクターを使用して藻類にRNAターゲティングエフェクタータンパク質及びガイドRNAを導入し、発現させる。ガイドRNAは、T7プロモーターを含有するベクターを使用して送達されることになる。代わりに、インビトロ転写されたガイドRNAが藻類細胞に送達され得る。電気穿孔プロトコルは、GeneArtクラミドモナスエンジニアリングキットの標準的な推奨プロトコルに従う。

10

【0340】

植物におけるRNAターゲティング酵素の詳細な適用

詳細な実施形態では、本発明は、ウイルスRNAを切断することが可能であるため、植物系におけるウイルス除去用治療薬として使用することができる。ヒト系における先行研究は、一本鎖RNAウイルス、C型肝炎（A. Price, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2015）のターゲティングにおけるCRISPRの利用の成功を実証している。これらの方法は、植物におけるRNAターゲティングCRISPR系の使用にも適合させ得る。

20

【0341】

改良植物

本発明は、本明細書に提供される方法によって得ることのできる及びそれによって得られた植物及び酵母細胞も提供する。本明細書に記載される方法によって得られた改良植物は、例えば、植物害虫、除草剤、乾燥、低温又は高温、過剰な水等に対する耐性を確実にする遺伝子の発現の改変により、食品又は飼料製造において有用となり得る。

【0342】

本明細書に記載される方法によって得られた改良植物、特に作物及び藻類は、例えば、通常野生型に見られるであろうよりも高いタンパク質、炭水化物、栄養素又はビタミンレベルの発現により、食品又は飼料製造において有用となり得る。この点で、改良植物、特に豆類及び塊茎が好ましい。

30

【0343】

改良藻類又はセイヨウアブラナなどの他の植物は、植物油又はバイオ燃料、例えばアルコール類（特にメタノール及びエタノール）の生産に特に有用であり得る。これらは、油又はバイオ燃料産業で使用される高レベルの油又はアルコールを発現又は過剰発現するようにエンジニアリングされ得る。

【0344】

本発明は、植物の改良された部位も提供する。植物部位としては、限定はされないが、葉、茎、根、塊茎、種子、胚乳、胚珠及び花粉が挙げられる。本明細書において想定されたとおりの植物部位は、生育可能、生育不能、再生可能及び／又は再生不能であり得る。

40

【0345】

また、本明細書には、本発明の方法によって作成された植物細胞及び植物を提供することも包含される。従来の育種方法によって作製された、遺伝子改変を含む植物の配偶子、種子、胚（接合胚であれ又は体細胞胚であれ）、子孫又は雑種も本発明の範囲内に含まれる。かかる植物は、標的配列に挿入されるか又はその代わりに挿入された異種又は外来性DNA配列を含有し得る。代わりに、かかる植物は、1つ以上のヌクレオチドに、ある変化（突然変異、欠失、挿入、置換）のみを含有し得る。そのため、かかる植物はその先

50

祖植物と特定の改変の存在のみが異なるに過ぎないことになる。

【0346】

本発明のある実施形態では、Cas13b系を使用して、例えば細菌、真菌又はウイルスによって引き起こされる疾患に対する抵抗性を作り出すことにより、病原体抵抗性植物がエンジニアリングされる。特定の実施形態において、病原体抵抗性は、害虫が摂取して死亡につながるであろうCas13b系が作り出されるように作物をエンジニアリングすることにより達成され得る。本発明のある実施形態では、Cas13b系を使用して非生物学的ストレス耐性がエンジニアリングされる。別の実施形態では、Cas13b系を使用して干ばつストレス耐性又は塩ストレス耐性又は低温若しくは熱ストレス耐性がエンジニアリングされる。Younis et al. 2014, Int. J. Biol. Sci. 10; 1150は植物育種方法の潜在的標的をレビューしており、その全てが本明細書に記載されるCas13b系を使用した修正又は改良に適している。一部の非限定的な標的作物としては、イネ (*Oryza sativa* L.)、セイヨウスモモ (*Prunus domestica* L.)、ワタ (*Gossypium hirsutum*)、ニコチアナ・ルスティカ (*Nicotiana rustica*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、ムラサキウマゴヤシ (*Medicago sativa*)、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) 及びシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) が挙げられる。

10

【0347】

本発明のある実施形態では、Cas13b系は作物害虫の管理に使用される。例えば、作物害虫において作動可能なCas13b系を植物宿主から発現させるか、又は例えばウイルスベクターを使用して標的に直接トランスファーすることができる。

20

【0348】

ある実施形態において、本発明は、ヘテロ接合非ヒト出発生物からホモ接合生物を効率的に作製する方法を提供する。ある実施形態において、本発明は植物育種に使用される。別の実施形態において、本発明は動物育種に使用される。かかる実施形態において、植物又は動物などのホモ接合生物は、二本鎖切断、染色体対合及び／又は鎖交換に参与する少なくとも1つの標的遺伝子への干渉によって組換えを防止又は抑制することにより作られる。

【0349】

最適化された機能性RNAターゲティング系におけるCas13bタンパク質の適用

30

ある態様において、本発明は、機能性構成成分をRNA環境に特異的に送達するための系を提供する。これは、RNAへの種々の構成成分の特異的ターゲティングを可能にする本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を含むCRISPR系を使用して確実にすることができる。より詳細には、かかる構成成分には、RNA翻訳、分解等のアクチベーター又はリプレッサーなど、アクチベーター又はリプレッサーが含まれる。この系の適用については、本明細書の他の部分に記載される。

【0350】

一態様によれば、本発明は、細胞の目的のゲノム遺伝子座内にある標的配列にハイブリダイズ可能なガイド配列を含むガイドRNAを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物を提供し、ここで、ガイドRNAは、アダプタータンパク質に結合する1つ以上の個別のRNA配列の挿入によって改変される。詳細な実施形態において、RNA配列は2つ以上のアダプタータンパク質（例えば、アダプター）に結合することができ、且つ各アダプタータンパク質が1つ以上の機能ドメインと会合している。本明細書に記載されるCas13b酵素のガイドRNAは、ガイド配列の改変に適していることが示される。詳細な実施形態において、ガイドRNAは、ダイレクトリピートの5'側、ダイレクトリピート内又はガイド配列の3'側への個別のRNA配列の挿入によって改変される。2つ以上の機能ドメインがあるとき、それらの機能ドメインは、同じであるか又は異なり得、例えば同じ2つの又は2つの異なるアクチベーター又はリプレッサーであり得る。ある態様において、本発明は、本明細書において考察される組成物を提供し、ここで、1つ

40

50

以上の機能ドメインがRNAターゲティング酵素に付加されているため、機能ドメインは標的RNAに結合すると、機能ドメインがその帰属機能で機能することが可能な空間的配置となる。ある態様において、本発明は、本明細書において考察される組成物を提供し、ここで、組成物は、少なくとも3つの機能ドメインであって、その少なくとも1つがRNAターゲティング酵素と会合し、且つその少なくとも2つがgRNAと会合している機能ドメインを有するCRISPR-Cas複合体を含む。

【0351】

従って、ある態様において、本発明は、本明細書において考察するとおりのガイドRNAとRNAターゲティング酵素であるCas13bとを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされたCRISPR-Cas13b複合体組成物を提供し、ここで、任意選択で、RNAターゲティング酵素は、RNAターゲティング酵素がその少なくとも1つの突然変異を有しない酵素の5%以下のヌクレアーゼ活性を有することになる少なくとも1つの突然変異及び任意選択で少なくとも1つ以上の核局在化配列を含む1つ以上を含む。詳細な実施形態において、ガイドRNAは、それに加えて又は代えて、RNAターゲティング酵素の結合はなおも確実にするが、RNAターゲティング酵素による切断は防ぐように（本明細書の他の部分で詳説するとおり）改変される。

【0352】

詳細な実施形態において、RNAターゲティング酵素は、少なくとも1つの突然変異を有しないCas13b酵素と比較したとき、少なくとも97%又は100%の低下したヌクレアーゼ活性を有するCas13b酵素である。ある態様において、本発明は、本明細書において考察される組成物を提供し、ここで、Cas13b酵素は、本明細書で他に記載されるような2つ以上の突然変異を含む。

【0353】

詳細な実施形態において、2つ以上の機能ドメインを含む本明細書において上記に記載されるとおりのRNAターゲティング系が提供される。詳細な実施形態において、2つ以上の機能ドメインは異種機能ドメインである。詳細な実施形態において、この系は、機能ドメインを含む融合タンパク質であるアダプタータンパク質を含み、融合タンパク質は、任意選択で、アダプタータンパク質と機能ドメインとの間にリンカーを含む。詳細な実施形態において、リンカーはGlySerリンカーを含む。それに加えて又は代えて、1つ以上の機能ドメインがリンカー、任意選択でGlySerリンカーによってRNAエフェクタータンパク質に付加される。詳細な実施形態において、1つ以上の機能ドメインはHEPNドメインの一方又は両方でRNAターゲティング酵素に付加される。

【0354】

ある態様において、本発明は、本明細書において考察される組成物を提供し、ここで、アダプタータンパク質又はRNAターゲティング酵素と会合している1つ以上の機能ドメインは、RNA翻訳を活性化又は抑制する能力を有するドメインである。ある態様において、本発明は、本明細書において考察される組成物を提供し、ここで、アダプタータンパク質に会合している1つ以上の機能ドメインの少なくとも1つは、メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写終結因子活性、ヒストン修飾活性、DNA組込み活性、RNA切断活性、DNA切断活性又は核酸結合活性又は分子スイッチ活性又は化学誘導能若しくは光誘導能を含む1つ以上の活性を有する。

【0355】

ある態様において、本発明は、アプタマー配列を含む本明細書において考察される組成物を提供する。詳細な実施形態において、アプタマー配列は、同じアダプタータンパク質に特異的な2つ以上のアプタマー配列である。ある態様において、本発明は、本明細書において考察される組成物を提供し、ここで、アプタマー配列は、異なるアダプタータンパク質に特異的な2つ以上のアプタマー配列である。ある態様において、本発明は、本明細書において考察される組成物を提供し、ここで、アダプタータンパク質は、MS2、PP7、Q β 、F2、GA、fr、JP501、M12、R17、BZ13、JP34、JP500、KU1、M11、MX1、TW18、VK、SP、FI、ID2、NL95、T

10

20

30

40

50

W19、AP205、 ϕ Cb5、 ϕ Cb8r、 ϕ Cb12r、 ϕ Cb23r、7s、PRR1を含む。従って、詳細な実施形態では、アダプタータンパク質のいずれか1つを特異的に結合する結合タンパク質から選択される。ある態様において、本発明は、本明細書において考察される組成物を提供し、ここで、細胞は、真核細胞である。ある態様において、本発明は、本明細書において考察される組成物を提供し、ここで、真核細胞は、哺乳類細胞、植物細胞又は酵母細胞であり、それによって哺乳類細胞は、任意選択で、マウス細胞である。ある態様において、本発明は、本明細書において考察される組成物を提供し、ここで、哺乳類細胞は、ヒト細胞である。

【0356】

ある態様において、本発明は、本明細書において上記で考察した組成物を提供し、ここで、2つ以上のgRNAがあり、及びこれらのgRNAは、異なる配列を標的化し、それによって本組成物が用いられるとき、多重化がある。ある態様において、本発明は、1つ以上のアダプタータンパク質に結合する個別のRNA配列の挿入によって改変された2つ以上のgRNAがある組成物を提供する。

【0357】

ある態様において、本発明は、本明細書において考察される組成物を提供し、ここで、1つ以上の機能ドメインと会合した1つ以上のアダプタータンパク質が存在して、ガイドRNAに挿入された個別のRNA配列に結合する。

【0358】

ある態様において、本発明は、本明細書において考察される組成物を提供し、ここで、ガイドRNAは、少なくとも1つの非コード機能性ループを有するように改変され、例えば、少なくとも1つの非コード機能性ループは、抑制性であり、例えば、少なくとも1つの非コード機能性ループは、A1uを含む。

【0359】

ある態様において、本発明は、本明細書において考察するとおりの組成物の1つ以上の宿主への投与又は宿主におけるインビボ発現を含む遺伝子発現の改変方法を提供する。

【0360】

ある態様において、本発明は、組成物又はそれをコードする核酸分子の送達を含む、本明細書において考察される方法を提供し、ここで、前記核酸分子は、調節配列に作動可能に連結され、且つインビボで発現する。ある態様において、本発明は、本明細書において考察される方法を提供し、ここで、インビボでの発現は、レンチウイルス、アデノウイルス又はAAVを介する。

【0361】

ある態様において、本発明は、本明細書において考察するとおりの細胞の哺乳類細胞株を提供し、ここで、細胞株は、任意選択で、ヒト細胞株又はマウス細胞株である。ある態様において、本発明は、トランスジェニック哺乳類モデル、任意選択でマウスを提供し、ここで、このモデルは、本明細書において考察される組成物で形質転換されているか、又は前記形質転換体の子孫である。

【0362】

ある態様において、本発明は、本明細書において考察するとおりのガイドRNA又はRNAターゲティングCRISPR-Cas複合体又は組成物をコードする核酸分子を提供する。ある態様において、本発明は、細胞の目的のゲノム遺伝子座にある標的配列にハイブリダイズ可能なガイド配列を含むガイドRNA (gRNA) をコードする核酸分子を含むベクターを提供し、ここで、gRNAのダイレトリートは、2つ以上のアダプタータンパク質に結合する個別のRNA配列の挿入によって改変され、及び各アダプタータンパク質は1つ以上の機能ドメインと会合しているか、又はgRNAは、少なくとも1つの非コード機能性ループを有するように改変される。ある態様において、本発明は、本明細書において考察されるgRNAと、RNAターゲティング酵素〔任意選択でRNAターゲティング酵素は少なくとも1つの突然変異を含み、そのためRNAターゲティング酵素は少なくとも1つの突然変異を有しないRNAターゲティング酵素の5%以下のヌクレアー

10

20

30

40

50

ゼ活性を有し、且つ任意選択で、少なくとも1つ以上の核局在化配列を含む1つ以上を含む]とを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされたCRISPR-Cas複合体組成物をコードする核酸分子を含むベクターを提供する。ある態様において、ベクターは、ガイドRNA (gRNA) をコードする核酸分子及び／又はRNAターゲティング酵素をコードする核酸分子及び／又は任意選択の核局在化配列に作動可能に連結された真核細胞において作動可能な調節エレメントを更に含み得る。

【0363】

一態様において、本発明は、上記に記載した構成成分の1つ以上を含むキットを提供する。一部の実施形態において、本キットは、上記に記載したとおりのベクター系とキットの使用説明書とを含む。

10

【0364】

ある態様において、本発明は、機能獲得 (GOF) 又は機能喪失 (LOF) に関してスクリーニングする方法又は非コードRNA又は潜在的な調節領域 (例えば、エンハンサー、リプレッサー) のスクリーニング方法を提供し、この方法は、RNAターゲティング酵素を含有し又はそれを発現する本明細書において考察するとおりの細胞株又は本明細書において考察されるモデルの細胞及び本明細書において考察するとおりの組成物を細胞株又はモデルの細胞に導入し、それによってgRNAがアクチベーター又はリプレッサーのいずれかを含むこと、及びそれらの細胞に関して導入されたgRNAがアクチベーターを含むのはどれかに関して又はそれらの細胞に関して導入されたgRNAがリプレッサーを含むのはどれかに関して、それぞれGOF又はLOFをモニタすることを含む。

20

【0365】

ある態様において、本発明は、細胞の目的の標的RNA配列にハイブリダイズ可能なガイド配列を含むRNAターゲティングCRISPRガイドRNA (gRNA)、RNAターゲティング酵素を各々が含む天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物のライブラリを提供し、ここで、RNAターゲティング酵素は、少なくとも1つの突然変異を含み、そのため、RNAターゲティング酵素は、少なくとも1つの突然変異を有しないRNAターゲティング酵素の5%以下のヌクレアーゼ活性を有し、gRNAは、1つ以上のアダプタータンパク質に結合する個別のRNA配列の挿入によって改変され、及びアダプタータンパク質は、1つ以上の機能ドメインと会合し、この組成物は、1つ以上又は2つ以上のアダプタータンパク質を含み、各タンパク質は、1つ以上の機能ドメインと会合し、及びgRNAは、複数のRNAターゲティングガイドRNA (gRNA) を含むゲノムワイドライブラリを含む。ある態様において、本発明は、本明細書において考察するとおりのライブラリを提供し、ここで、RNAターゲティングRNAターゲティング酵素は、少なくとも1つの突然変異を有しないRNAターゲティング酵素と比較したとき、少なくとも97%又は100%の低下したヌクレアーゼ活性を有する。ある態様において、本発明は、本明細書において考察するとおりのライブラリを提供し、ここで、アダプタータンパク質は、機能ドメインを含む融合タンパク質である。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されるとおりのライブラリを提供し、ここで、gRNAは、1つ又は2つ以上のアダプタータンパク質に結合する個別のRNA配列の挿入によって改変されない。ある態様において、本発明は、本明細書において考察するとおりのライブラリを提供し、ここで、1つ又2つ以上の機能ドメインは、RNAターゲティング酵素と会合している。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されるとおりのライブラリを提供し、ここで、細胞の細胞集団は、真核細胞の集団である。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されるとおりのライブラリを提供し、ここで、真核細胞は、哺乳類細胞、植物細胞又は酵母細胞である。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されるとおりのライブラリを提供し、ここで、哺乳類細胞は、ヒト細胞である。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されるとおりのライブラリを提供し、ここで、細胞の集団は、胚性幹 (ES) 細胞の集団である。

30

40

【0366】

ある態様において、本発明は、本明細書で考察するとおりのライブラリを提供し、こ

50

で、ターゲティングは、約100以上のRNA配列である。ある態様において、本発明は、本明細書で考察するとおりのライブラリを提供し、ここで、ターゲティングは、約1000以上のRNA配列である。ある態様において、本発明は、本明細書で考察するとおりのライブラリを提供し、ここで、ターゲティングは、約20,000以上の配列である。ある態様において、本発明は、本明細書で考察するとおりのライブラリを提供し、ここで、ターゲティングは、トランスクリプトーム全体である。ある態様において、本発明は、本明細書で考察するとおりのライブラリを提供し、ここで、ターゲティングは、関連性のある又は望ましい経路に焦点を置いた標的配列のパネルである。ある態様において、本発明は、本明細書で考察するとおりのライブラリを提供し、ここで、経路は、免疫経路である。ある態様において、本発明は、本明細書で考察するとおりのライブラリを提供し、ここで、経路は、細胞分裂経路である。

10

【0367】

一態様において、本発明は、発現が改変された遺伝子を含むモデル真核細胞を作成する方法を提供する。一部の実施形態において、疾患遺伝子は、疾患の罹患又は発症リスクの増加に関連する任意の遺伝子である。一部の実施形態において、本方法は、(a)本明細書において上記に記載される系の構成成分をコードする1つ以上のベクターを真核細胞に導入すること、及び(b)CRISPR複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて遺伝子の発現を改変し、それにより遺伝子発現の改変を含むモデル真核細胞を作成することを含む。

【0368】

本明細書に提供される構造情報により、標的RNA及びRNAターゲティング酵素とのガイドRNA相互作用を調べることが可能であり、RNAターゲティングCRISPR-Cas系全体の機能性が最適化されるようにガイドRNA構造をエンジニアリングし又は変化させることが可能になる。例えば、RNAに結合することのできるアダプタータンパク質の挿入によりRNAターゲティングタンパク質との衝突なしにガイドRNAを伸長させることができる。これらのアダプタータンパク質は、1つ以上の機能ドメインを含むエフェクタータンパク質又は融合物を更に動員することができる。

20

【0369】

本発明のある態様は、上記のエLEMENTが単一の組成物に含まれるか、又は個々の組成物に含まれるものである。これらの組成物は、有利には、ゲノムレベルで機能的効果を誘発するため宿主に適用され得る。

30

【0370】

当業者は、ガイドRNAに対する改変で、アダプター+機能ドメインの結合を可能にするが、アダプター+機能ドメインを適切に位置させることは(例えば、CRISPR複合体の三次元構造(three dimensional structure)内の立体障害に起因して)できないものは、意図されない改変であることを理解するであろう。1つ以上の改変ガイドRNAは、ダイレクトリピートの5'側、ダイレクトリピート内又はガイド配列の3'側への個別のRNA配列の導入によって改変され得る。

【0371】

改変ガイドRNA、不活性化RNAターゲティング酵素(機能ドメインを有する又は有しない)及び1つ以上の機能ドメインを有する結合タンパク質は、各々が個別に組成物に含まれ、宿主に個別に又はまとめて投与され得る。代わりに、これらの構成成分は、宿主への投与用の単一の組成物中に提供され得る。宿主への投与は、宿主への送達に関して当業者に公知の又は本明細書に記載されるウイルスベクター(例えば、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、AAVベクター)を用いて実施し得る。本明細書に説明されるとおり、異なる選択マーカー(例えば、レンチウイルスgRNA選択用のもの)及びgRNAの濃度(例えば、複数のgRNAが用いられるかどうかに依存する)を使用することが、向上した効果を生じさせるのに有利であり得る。

40

【0372】

当業者は、提供される組成物を用いて、同じ又は異なる機能ドメインで単一又は複数の

50

遺伝子座を有利に且つ特異的に標的化して、1つ以上のゲノムイベントを誘発することができる。本組成物は、細胞のライブラリにおけるスクリーニング及びインビボでの機能モデリング（例えば、lincRNAの遺伝子活性化及び機能の同定（identification）；機能獲得モデリング；機能喪失モデリング；最適化及びスクリーニング目的の細胞株及びトランスジェニック動物を樹立するための本発明の組成物の使用）のための多種多様な方法に適用され得る。

【0373】

本発明は、条件的又は誘導性CRISPR RNAターゲティングイベントを樹立し及び利用するための本発明の組成物の使用を包含する。（例えば、Platt et al., Cell (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.014>又は本明細書に引用されるPCT特許公報、例えば国際公開第2014/093622号パンフレット（PCT/米国特許出願公開第2013/074667号明細書）（これらは本発明若しくは本願に先行するとは考えられない）を参照されたい）。例えば、標的細胞がRNAターゲティングCRISPR酵素を条件的に又は誘導性に（例えば、Cre依存性構築物の形態で）含み、且つ／又はアダプタータンパク質を条件的に又は誘導性に含み、及び標的細胞に導入されたベクターの発現時、ベクターは、標的細胞におけるRNAターゲティング酵素発現及び／又はアダプター発現を誘導するか、又はその条件を生じるように発現する。CRISPR複合体を作成する公知の方法と共に本発明の教示及び組成物を適用することにより、機能ドメインによって影響を受ける誘導性遺伝子発現も本発明の態様である。代わりに、条件的又は誘導性RNAターゲティング酵素と共にアダプタータンパク質が条件的又は誘導性エレメントとして提供されることにより、スクリーニング目的に有効なモデルが提供され得、これは有利には、多種多様な適用に対して、特異的なgRNAの最小限の設計及び投与のみを必要とするものである。

【0374】

デッドガイド配列を含む本発明に係るガイドRNA

一態様において、本発明は、CRISPR複合体の形成及び標的への結合の成功を可能にすると同時にヌクレアーゼ活性の成功を許容しない（即ちヌクレアーゼ活性がない／インデル活性がない）ように改変されるガイド配列を提供する。説明上の問題で、かかる改変ガイド配列は「デッドガイド」又は「デッドガイド配列」と称される。これらのデッドガイド又はデッドガイド配列は、ヌクレアーゼ活性の点で触媒的に不活性である又は立体構造的に不活性であると考えることができる。実際、デッドガイド配列は、触媒活性を促進する能力又はオンターゲットとオフターゲットとの結合活性を区別する能力の点で生産的な塩基対合に十分に関与しないものであり得る。簡潔に言えば、このアッセイには、CRISPR標的RNA及び標的RNAとのミスマッチを含むガイドRNAを合成すること、それらをRNAターゲティング酵素と組み合わせて、切断産物によって生成されるバンドの存在に基づいたゲルに基づいて切断を分析すること、及び相対バンド強度に基づいて切断を定量化することが関わる。

【0375】

従って、関連する態様において、本発明は、本明細書に記載されたとおりの機能性RNAターゲティング及びガイドRNA（gRNA）を含む天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物RNAターゲティングCRISPR-Cas系を提供し、ここで、gRNAは、デッドガイド配列を含み、それにより、gRNAは、この系の非突然変異RNAターゲティング酵素の検出可能なRNA切断活性なしにRNAターゲティングCRISPR-Cas系が細胞内の目的のゲノム遺伝子座へと導かれるような標的配列へのハイブリダイゼーション能力を有するものとなる。本明細書の他の部分に記載されたとおりの本発明に係るgRNAのいずれも、本明細書において以下に記載されたとおりのデッドgRNA／デッドガイド配列を含むgRNAとして使用し得ることが理解されるべきである。本明細書の他の部分に記載されたとおりの方法、生成物、組成物及び使用のいずれも、以下に更に詳述されたとおりのデッドgRNA／デッドガイド配列を含むgRNAで等しく適用

可能である。更なる指針として、以下の詳細な態様及び実施形態を提供する。

【0376】

RNA 標的配列への CRISPR 複合体の配列特異的結合を導くデッドガイド配列の能力は、任意の好適なアッセイによって評価し得る。例えば、CRISPR 複合体を形成するのに十分な CRISPR 系の構成成分が、試験しようとするデッドガイド配列を含め、対応する標的配列を有する宿主細胞へと、CRISPR 配列の構成成分をコードするベクターのトランスフェクションによるなどして提供され得、続いて標的配列内における優先的な切断が評価され得る。例えば、標的 RNA ポリヌクレオチド配列の切断は、標的配列、試験しようとするデッドガイド配列を含めた CRISPR 複合体の構成成分及び供試デッドガイド配列と異なる対照ガイド配列を提供して、それらの供試ガイド配列と対照ガイド配列との反応間で標的配列における結合又は切断速度を比較することにより、試験管内で判定することができる。他のアッセイも可能であり、当業者に想起されるであろう。デッドガイド配列は、任意の標的配列を標的化するように選択し得る。一部の実施形態において、標的配列は、細胞のゲノム内の配列である。

10

【0377】

本明細書に更に説明されるとおり、幾つかの構造パラメータによって適切なフレームワークをかけるデッドガイドに至らせることが可能である。デッドガイド配列は、典型的には、活性 RNA 切断をもたらすそれぞれのガイド配列よりも短い。詳細な実施形態において、デッドガイドは、同じものに対するそれぞれのガイドよりも 5%、10%、20%、30%、40%、50% 短い。

20

【0378】

以下に説明し且つ当該技術分野において公知のとおり、gRNA の一態様 — RNA ターゲティング特異性はダイレトリート配列であり、これはかかるガイドに適切に連結されるべきである。詳細には、これは、ダイレトリート配列が RNA ターゲティング酵素の起源に応じて設計されることを含意する。従って、Cas13b 特異的均等物の設計には、検証されたデッドガイド配列に利用可能な構造データが用いられ得る。例えば、2 つ以上の Cas13b エフェクタータンパク質のオルソログスなヌクレアーゼドメイン HE PN の間の構造的類似性を用いることにより、均等な設計のデッドガイドをトランスファーし得る。従って、本明細書におけるデッドガイドは、かかる Cas13b 特異的均等物を反映するように長さ及び配列が適切に改変され得、それにより CRISPR 複体の形成及び標的 RNA への結合の成功が実現すると同時に、ヌクレアーゼ活性の成功が許容されなくなる。

30

【0379】

本明細書並びに当該技術分野の技術水準に関連して、デッドガイドの使用は、インビトロ、エキソビボ及びインビボ適用の両方でのネットワーク生物学及び／又はシステム生物学の意外且つ予想外のプラットフォームをもたらして、多重遺伝子ターゲティング、詳細には両方向性多重遺伝子ターゲティングを可能にする。デッドガイドを使用する以前は、複数の標的に対処することは難題であり、場合により不可能であった。デッドガイドを使用すると、例えば同じ細胞、同じ動物又は同じ患者における複数の標的、従って複数の活性に対処し得る。かかる多重化は同時に起こり得るか、又は所望の時間フレームで時差的に起こり得る。

40

【0380】

例えば、デッドガイドは、ヌクレアーゼ活性を伴うことのない、遺伝子ターゲティングの手段としての gRNA の使用を可能にすると同時に、誘導的な活性化又は抑制手段を提供する。デッドガイドを含むガイド RNA は、遺伝子活性の活性化又は抑制を可能にする形でエレメント、詳細には遺伝子エフェクター（例えば、遺伝子活性のアクチベーター又はリプレッサー）を機能的に置くことを可能にする本明細書の他の部分に記載されるとおりのタンパク質アダプター（例えば、アプタマー）を更に含むように改変し得る。一例は、本明細書及び当該技術分野の技術水準で説明されるとおりの、アプタマーの取込みである。デッドガイドを含む gRNA がタンパク質相互作用性アプタマーを取り込むようにエ

50

ンジニアリングすることにより (Koner mann et al., “Genome-scale transcription activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex”, doi:10.1038/nature14136、参照により本明細書に援用される)、複数の個別のエフェクタードメインをアセンブルし得る。これは、天然の過程の後にモデル化し得る。

【0381】

提供概要

ある態様において、本発明は核酸結合系を提供する。RNAと相補的プローブとのインサイチュハイブリダイゼーションは、強力な技法である。典型的には、ハイブリダイゼーションによる核酸の検出には蛍光DNAオリゴヌクレオチドが使用される。ロックド核酸 (LNA) など、ある種の改変によって効率の増加が達成されているが、効率的且つ汎用的な代替手段が依然として必要とされている。本発明は、インサイチュハイブリダイゼーションのための効率的且つ適合可能な系を提供する。

【0382】

本発明の実施形態において、用語のガイド配列及びガイドRNAは、国際公開第2014/093622号パンフレット (PCT/米国特許出願公開第2013/074667号明細書) などの前述の引用文献にあるとおりの同義的に使用される。一般に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズして標的配列に対するCRISPR複合体の配列特異的結合を導くのに十分な標的ポリヌクレオチド配列との相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列である。一部の実施形態において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを用いて最適にアラインメントしたとき、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%以上であるか又はそれより高い。最適アラインメントは、配列のアラインメントに好適な任意のアルゴリズムを用いて決定することができ、その非限定的な例としては、スミューウォーターマンアルゴリズム、ニードルマン-ブッシュアルゴリズム、バローズ・ホイラー変換に基づくアルゴリズム (例えば、バローズ・ホイラーアライナー)、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign (Novocraft Technologies; www.novocraft.comにおいて利用可能)、ELAND (Illumina, San Diego, CA)、SOAP (soap.genomics.org.cnにおいて利用可能) 及びMaq (maq.sourceforge.netにおいて利用可能) が挙げられる。一部の実施形態において、ガイド配列は、約5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75ヌクレオチド長以上であるか又はそれより長い。一部の実施形態において、ガイド配列は、約75、50、45、40、35、30、25、20、15、12ヌクレオチド長未満であるか又はそれより短い。好ましくは、ガイド配列は、10~30ヌクレオチド長である。ガイド配列が標的配列へのCRISPR複合体の配列特異的結合を導く能力は、任意の好適なアッセイによって評価し得る。例えば、CRISPR複合体を形成するのに十分なCRISPR系の構成成分が、試験しようとするガイド配列を含め、CRISPR配列の構成成分をコードするベクターのトランスフェクションによるなどして対応する標的配列を有する宿主細胞に提供され得、続いて本明細書に記載されるとおりのSurvayorアッセイなどにより、標的配列内における優先的な切断を評価し得る。同様に、標的ポリヌクレオチド配列の切断は、標的配列、試験しようとするガイド配列を含めたCRISPR複合体の構成成分及び供試ガイド配列と異なる対照ガイド配列を提供して、それらの供試ガイド配列と対照ガイド配列との反応間の標的配列における結合又は切断速度を比較することにより、試験管内で判定することができる。他のアッセイも可能であり、当業者に想起されるであろう。ガイド配列は、任意の標的配列を標的化するように選択することができる。一部の実施形態において、標的配列は、細胞のゲノム内の配列である。例示的標的配列には、標的ゲノムにおいてユニークなものが含まれる。

【0383】

一般に且つ本明細書全体を通じて、用語「ベクター」は、それに連結されている別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を指す。ベクターとしては、限定はされないが、一本鎖、二本鎖又は部分的二本鎖の核酸分子；1つ以上の遊離末端を含む、遊離末端のない（例えば、環状の）核酸分子；DNA、RNA又は両方を含む核酸分子；及び当該技術分野において公知の他の種類のポリヌクレオチドが挙げられる。ある種のベクターは「プラスミド」であり、これは、標準的な分子クローニング技術によるなどして追加のDNAセグメントを挿入することのできる環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターはウイルスベクターであり、ここで、ベクターには、ウイルス（例えば、レトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス）へのパッケージングのためのウイルス由来DNA又はRNA配列が存在する。ウイルスベクターは、宿主細胞へのトランスフェクションのためのウイルスによって担持されるポリヌクレオチドも含む。特定のベクターは、それが導入される宿主細胞での自己複製能を有する（例えば、細菌性複製起点を有する細菌ベクター及びエピソード哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳類ベクター）は宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより宿主ゲノムと共に複製される。更に、特定のベクターは、それが作動可能に連結された遺伝子の発現を導くことが可能である。かかるベクターは、本明細書では「発現ベクター」と称される。真核細胞における発現用の及びそこでの発現をもたらすベクターは、本明細書では、「真核細胞発現ベクター」と称することができる。組換えDNA技法において有用な一般的な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。

10

20

【0384】

組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に好適な形態の本発明の核酸を含むことができ、これは、即ち、組換え発現ベクターが、発現させる核酸配列に作動可能に連結された1つ以上の調節エレメント（これは、発現に用いられる宿主細胞に基づいて選択され得る）を含むことを意味する。組換え発現ベクターの範囲内において、「作動可能に連結された」は、ヌクレオチド配列の（例えば、インビトロ転写／翻訳系における又はベクターが宿主細胞に導入される場合に宿主細胞における）発現が可能となる形で目的のヌクレオチド配列が調節エレメントに連結されていることを意味するように意図される。

【0385】

用語「調節エレメント」には、プロモーター、エンハンサー、内部リボソーム侵入部位（IRES）及び他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル及びポリU配列などの転写終結シグナル）が含まれることが意図される。かかる調節エレメントについては、例えば、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載されている。調節エレメントには、多くの種類の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を導くもの及び特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を導くもの（例えば、組織特異的調節配列）が含まれる。組織特異的プロモーターは、主として、所望の目的組織、例えば筋肉、ニューロン、骨、皮膚、血液、特定の臓器（例えば、肝臓、脾臓）又は特定の細胞型（例えば、リンパ球）において発現を導き得る。調節エレメントは、細胞周期依存的又は発生段階依存的様式など、時間依存的様式でも発現を導き得、この発現も組織又は細胞型特異的であることも又はそうでないこともある。一部の実施形態において、ベクターは、1つ以上のpol IIIプロモーター（例えば、1、2、3、4、5個又はそれより多いpol IIIプロモーター）、1つ以上のpol IIプロモーター（例えば、1、2、3、4、5個又はそれより多いpol IIプロモーター）、1つ以上のpol Iプロモーター（例えば、1、2、3、4、5個又はそれより多いpol Iプロモーター）又はこれらの組み合わせを含む。pol IIIプロモーターの例としては、限定はされないが、U6及びH1プロモーターが挙げられる。pol IIプロモーターの例としては、限定はされないが、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター（任意選択でRSVエンハンサーと共に）、サイトメガロウイルス（CMV）プロモ

30

40

50

ーター（任意選択でCMVエンハンサーと共に）〔例えば、Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)を参照されたい〕、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、 β -アクトチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）プロモーター及びEF1 α プロモーターが挙げられる。また、用語「調節エレメント」には、WPREなどのエンハンサーエレメント；CMVエンハンサー；HTLV-IのLTRにおけるR-U5'セグメント（Mol. Cell. Biol., Vol. 8 (1), p. 466-472, 1988）；SV40エンハンサー；及びウサギ β -グロビンのエクソン2と3との間のイントロン配列（Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 78 (3), p. 1527-31, 1981）も包含される。当業者によれば、発現ベクターの設計が、形質転換する宿主細胞の選択、所望の発現レベルなどの要因に依存し得ることが理解されるであろう。ベクターは宿主細胞に導入することができ、それにより、本明細書に記載されるとおりの核酸によってコードされる転写物、タンパク質又はペプチドが、融合タンパク質又はペプチド（例えば、クラスター化した規則的な間隔の短いパリンドローム反復（CRISPR）転写物、タンパク質、酵素、それらの突然変異型、それらの融合タンパク質等）を含め、産生され得る。

【0386】

有利なベクターとしては、レンチウイルス及びアデノ随伴ウイルスが挙げられ、かかるベクターのタイプも、特定のタイプの細胞を標的化するように選択することができる。

【0387】

本明細書で使用されるとき、V型又はVI型CRISPR-Cas遺伝子座エフェクタータンパク質の「crRNA」又は「ガイドRNA」又は「シングルガイドRNA」又は「sgRNA」又は「1つ以上の核酸成分」という用語には、標的核酸配列とハイブリダイズして標的核酸配列への核酸ターゲティング複合体の配列特異的結合を導くのに十分な標的核酸配列との相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列が含まれる。

【0388】

特定の実施形態において、本明細書に提供されるとおりのCRISPR系は、crRNA又はガイド配列を含む同様のポリヌクレオチドを利用することができ、ここで、ポリヌクレオチドは、RNA、DNA又はRNAとDNAとの混合物であり、及び／又はポリヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオチド類似体を含む。この配列は、限定はされないが、バルジ、ヘアピン又はステムループ構造など、天然crRNAの構造を含め、任意の構造を含み得る。特定の実施形態において、ガイド配列を含むポリヌクレオチドは、RNA又はDNA配列であり得る第2のポリヌクレオチド配列と二重鎖を形成する。

【0389】

特定の実施形態において、化学的に改変されたガイドRNAが利用される。ガイドRNAの化学的改変の例としては、限定なしに、1つ以上の末端ヌクレオチドにおける2'-O-メチル（M）、2'-O-メチル3'ホスホロチオエート（MS）又は2'-O-メチル3'チオPACE（MSP）の取込みが挙げられる。かかる化学的に改変されたガイドRNAは、改変されていないガイドRNAと比較したとき、高い安定性及び高い活性を含むことができ、しかしながら、オンターゲット対オフターゲット特異性は、予測不可能である（Hendel, 2015, Nat Biotechnol. 33 (9): 985-9, doi:10.1038/nbt.3290, published online 29 June 2015を参照されたい）。化学的に改変されたガイドRNAには、限定なしに、ホスホロチオエート結合を有するRNA及びリボース環の2'及び4'炭素間にメチレン架橋を含むロックド核酸（LNA）ヌクレオチドが更に含まれる。

【0390】

一部の実施形態において、相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを用いて最適にアラインメントしたとき、約50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%以上であるか又はそれより高い。最適アラインメントは、配列のアラインメントに好適な任意のアルゴリズムを用いて決定することができ、その非限定的な例としては、スミス-ウォーターマンアルゴリズム、ニードルマン-ブンシュア

ルゴリズム、パローズ・ホイーラー変換に基づくアルゴリズム（例えば、パローズ・ホイーラーライナー）、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign（Novocraft Technologies；www.novocraft.comにおいて利用可能）、ELAND（Illumina、San Diego, CA）、SOAP（soap.genomics.org.cnにおいて利用可能）及びMaq（maq.sourceforge.netにおいて利用可能）が挙げられる。ガイド配列（核酸ターゲティングガイドRNA内にある）が標的核酸配列への核酸ターゲティング複合体の配列特異的結合を導く能力は、任意の好適なアッセイによって評価し得る。例えば、核酸ターゲティング複合体を形成するのに十分な核酸ターゲティングCRISPR系の構成成分が、試験しようとするガイド配列を含め、対応する標的核酸配列を有する宿主細胞へと、核酸ターゲティング複合体の構成成分をコードするベクターのトランスフェクションによるなどして提供され得、続いて本明細書に記載されるとおりのSurveyorアッセイなどにより、標的核酸配列内における優先的なターゲティング（例えば、切断）を評価し得る。同様に、標的核酸配列の切断は、標的核酸配列、試験しようとするガイド配列を含めた核酸ターゲティング複合体の構成成分及び供試ガイド配列と異なる対照ガイド配列を提供して、それらの供試ガイド配列と対照ガイド配列との反応間で標的配列における結合又は切断速度を比較することにより、試験管内で判定することができる。他のアッセイも可能であり、当業者に想起されるであろう。ガイド配列、従って核酸ターゲティングガイドRNAは、任意の標的核酸配列を標的化するように選択し得る。標的配列はDNAであり得る。標的配列は、任意のRNA配列であり得る。一部の実施形態において、標的配列は、メッセンジャーRNA（mRNA）、プレmRNA、リボソームRNA（rRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、マイクロRNA（miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、核内低分子RNA（snRNA）、核小体低分子RNA（snoRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、非コードRNA（ncRNA）、長い非コードRNA（lncRNA）及び小さい細胞質RNA（scRNA）からなる群から選択されるRNA分子内の配列であり得る。一部の好ましい実施形態において、標的配列は、mRNA、プレmRNA及びrRNAからなる群から選択されるRNA分子内の配列であり得る。一部の好ましい実施形態において、標的配列は、ncRNA及びlncRNAからなる群から選択されるRNA分子内の配列であり得る。一部のより好ましい実施形態において、標的配列はmRNA分子又はプレmRNA分子内の配列であり得る。

【0391】

一部の実施形態において、核酸ターゲティングガイドRNAは、RNAターゲティングガイドRNA内の二次構造度が低下するように選択される。一部の実施形態において、核酸ターゲティングガイドRNAのヌクレオチドのうち、最適に折り畳まれたとき、自己相補性塩基対合に関与するのは約75%、50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%以下であるか又はそれより少ない。最適な折り畳みは、任意の好適なポリヌクレオチド折り畳みアルゴリズムによって決定し得る。一部のプログラムは最小ギブズ自由エネルギーの計算に基づく。かかる1つのアルゴリズムの例は、Zuker and Stiegler（Nucleic Acids Res. 9（1981），133-148）により記載されるとおりのmFoldである。別の例示的な折り畳みアルゴリズムは、ウィーン大学（University of Vienna）のInstitute for Theoretical Chemistryにおいて開発された、セントロイド構造予測アルゴリズムを用いるオンラインウェブサーバーRNAfoldである（例えば、A. R. Gruber et al., 2008, Cell 106（1）：23-24；及びPA Carr and GM Church, 2009, Nature Biotechnology 27（12）：1151-62を参照されたい）。

【0392】

特定の実施形態において、ガイドRNA又はcrRNAは、ダイレトリート（DR）配列とガイド配列又はスパーサー配列とを含むか、それから本質的になるか、又はそれ

からなり得る。特定の実施形態において、ガイドRNA又はcrRNAは、ガイド配列又はスパーサー配列に融合又は連結したダイレクトリピート配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなり得る。特定の実施形態において、ダイレクトリピート配列はガイド配列又はスパーサー配列の上流（即ち5'側）に位置し得る。他の実施形態において、ダイレクトリピート配列はガイド配列又はスパーサー配列の下流（即ち3'側）に位置し得る。

【0393】

特定の実施形態において、crRNAはステムループ、好ましくは単一のステムループを含む。特定の実施形態において、ダイレクトリピート配列はステムループ、好ましくは単一のステムループを形成する。

10

【0394】

特定の実施形態において、ガイドRNAのスパーサー長さは15～35ntである。特定の実施形態において、ガイドRNAのスパーサー長さは少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも18nt、例えば少なくとも19、20、21、22nt又はそれを超える。特定の実施形態において、スパーサー長さは、15～17nt、例えば15、16又は17nt、17～20nt、例えば17、18、19又は20nt、20～24nt、例えば20、21、22、23又は24nt、23～25nt、例えば23、24又は25nt、24～27nt、例えば24、25、26又は27nt、27～30nt、例えば27、28、29又は30nt、30～35nt、例えば30、31、32、33、34、又は35nt、又は35nt以上である。

20

【0395】

毒性及びオフターゲット効果を最小限に抑えるため、送達されるRNAターゲティングガイドRNAの濃度を制御することが重要となり得る。核酸ターゲティングガイドRNAの最適濃度は、細胞モデル又は非ヒト真核動物モデルにおける種々の濃度の試験及びディープシーケンシングを用いた潜在的なオフターゲットゲノム遺伝子座における改変の程度 of the analysisによって決定することができる。インビボ送達には、最も高いレベルのオンターゲット改変をもたらす一方、オフターゲット改変レベルを最小限に抑える濃度が選択されるべきである。RNAターゲティング系は、有利には、CRISPR-Cas13b系から送達される。一部の実施形態において、RNAターゲティング系の1つ以上のエレメントは、本明細書において考察するとおりのCas13bエフェクタータンパク質系の内因性RNAターゲティング系を含む特定の生物に由来する。

30

【0396】

用語「オルソログ(orthologue)」(本明細書では「オルソログ(orthologue)」とも称される)及び「ホモログ(homologue)」(本明細書では「ホモログ(homologue)」とも称される)は、当該技術分野において周知である。更なる指針として、本明細書で使用されたとおりのタンパク質の「ホモログ」は、それがそのホモログであるところのタンパク質と同じ又は同様の機能を果たす同じ種のタンパク質である。しかし、ホモログタンパク質は、構造上関係がなくてもよく、又は構造上部分的にのみ関係している。本明細書で使用されたとおりのタンパク質の「オルソログ」は、それがそのオルソログであるところのタンパク質と同じ又は同様の機能を果たす異なる種のタンパク質である。しかし、オルソログタンパク質は、構造上関係がなくてもよく、又は構造上部分的にのみ関係している。詳細な実施形態において、本明細書で言及されたとおりのCas13bタンパク質のホモログ又はオルソログは、図1に示されるCas13bエフェクタータンパク質と少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、更により好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも95%などの配列相同性又は同一性を有する。

40

【0397】

本明細書に記載される機能のいずれも、複数のオルソログ由来の断片を含むキメラ酵素を含め、他のオルソログ由来のCRISPR酵素にエンジニアリングし得ることが理解されるであろう。かかるオルソログの例は、本明細書の他の部分に記載される。従って、キ

50

メラ酵素は、限定はされないが、バージイエラ属 (*Bergeyella*)、プレボテラ属 (*Prevotella*)、ポルフィロモナス属 (*Porphyromonas*)、バクテロイデス属 (*Bacteroides*)、アリストイペス属 (*Alistipes*)、リエメラ属 (*Riemerella*)、ミロイデス属 (*Myroides*)、フラボバクテリウム属 (*Flavobacterium*)、キャプノサイトファーガ属 (*Capnocytophaga*)、クリセオバクテリウム属 (*Chryseobacterium*)、フェオダクチリバクター属 (*Phaeodactylibacter*)、パルディバクター属 (*Paludibacter*) 又はサイクロフレクサス属 (*Psychroflexus*) を含む生物の CRISPR 酵素オルソログの断片を含み得る。キメラ酵素は、第1の断片と第2の断片とを含むことができ、これらの断片、ここでは第1及び第2の断片の一方は、第1の種の Cas13b エフェクタータンパク質 (例えば、図1に掲載するおりの Cas13b エフェクタータンパク質) のもの又はそれ由来であり、他方の断片は、別の種の CRISPR 酵素オルソログのもの又はそれ由来である。

10

【0398】

本発明のある実施形態において、ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*) Cas13b (受託番号 WP__039434803)、プレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5-125 Cas13b (受託番号 WP__044065294)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) Cas13b (受託番号 WP__053444417)、ポルフィロモナス属種 (*Porphyromonas* sp.) COT-052 OH4946 Cas13b (受託番号 WP__039428968)、バクテロイデス・ピオゲネス (*Bacteroides pyogenes*) Cas13b (受託番号 WP__034542281)、リエメラ・アナティペステイファー (*Riemerella anatipestifer*) Cas13b (受託番号 WP__004919755) からなる群から選択される野生型 Cas13b エフェクタータンパク質と少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれを超えて相同又は同一のアミノ酸配列を含むエフェクタータンパク質が提供される。最も好ましいエフェクタータンパク質は、ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*) Cas13b (受託番号 WP__039434803)、プレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5-125 Cas13b (受託番号 WP__044065294)、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) Cas13b (受託番号 WP__0534444417)、ポルフィロモナス属種 (*Porphyromonas* sp.) COT-052 OH4946 Cas13b (受託番号 WP__039428968) からなる群から選択される野生型 Cas13b エフェクタータンパク質と少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれを超えて相同又は同一のものであり、及び最も特別に好ましいのは、ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*) Cas13b (受託番号 WP__039434803) 又はプレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5-125 Cas13b (受託番号 WP__044065294) である。

20

30

40

【0399】

幾つもの Cas13b オルソログが共通のモチーフによって特徴付けられることが分かっている。従って、詳細な実施形態において、Cas13b エフェクタータンパク質は、DKHXFGAFLNLA RHN (配列番号1)、GLLFFVSLFLDK (配列番号2)、SKIXGFK (配列番号3)、DMLNELXRCP (配列番号4)、RXZDRFPYFALRYXD (配列番号5) 及び LRFQVBLGXY (配列番号6) からなる配列の1つ以上と少なくとも 70% の配列同一性を有する配列を含むタンパク質である。更なる詳細な実施形態において、Cas13b エフェクタータンパク質は、これらの配列の少なくとも 2、3、4、5つ又は6つ全てと少なくとも 70% の配列同一性を有する

50

配列を含む。更なる詳細な実施形態において、これらの配列との配列同一性は、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%又は100%である。更なる詳細な実施形態において、C a s 1 3 b エフェクタータンパク質は、G L L F F V S L F L（配列番号7）及びR H Q X R F P Y F（配列番号8）と100%の配列同一性を有する配列を含むタンパク質である。更なる詳細な実施形態において、C a s 1 3 b エフェクターは、R H Q D R F P Y（配列番号9）と100%の配列同一性を有する配列を含むC a s 1 3 b エフェクタータンパク質である。

【0400】

本発明のある実施形態において、エフェクタータンパク質は、限定はされないが本明細書に記載されるコンセンサス配列を含め、V I - B 型エフェクタータンパク質コンセンサス配列と少なくとも80%、少なくとも85%、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99%又はそれを超える配列相同性又は同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0401】

本発明のある実施形態において、エフェクタータンパク質は、限定はされないが、本明細書に記載されるH E P N ドメイン、当該技術分野において公知のH E P N ドメイン並びにコンセンサス配列及びモチーフとの比較によってH E P N ドメインと認識されるドメインを含め、少なくとも1つのH E P N ドメインを含む。1つの非限定的な例において、コンセンサス配列は、本明細書に提供されるC a s 1 3 b オルソログの配列に由来することができる。

【0402】

本発明のある実施形態において、エフェクタータンパク質は、R x x x x Hモチーフ配列を含む1つ以上のH E P N ドメインを含む。R x x x x Hモチーフ配列は、限定なしに、本明細書に記載されるH E P N ドメイン又は当該技術分野において公知のH E P N ドメインからのものであり得る。R x x x x Hモチーフ配列には、2つ以上のH E P N ドメインの一部を組み合わせるにより作り出されるモチーフ配列が更に含まれる。

【0403】

一部の実施形態において、エフェクタータンパク質は、2つのH E P N ドメインを含む。一部の実施形態において、エフェクタータンパク質は、R x x x x Hモチーフを含む少なくとも1つの触媒活性H E P N ドメインを含む。一部の実施形態において、エフェクタータンパク質は、R x x x x Hモチーフをそれぞれ含む2つの触媒活性H E P N ドメインを含む。一部の実施形態において、エフェクタータンパク質は、野生型R x x x x HモチーフのR又はHの少なくとも一方の突然変異から得られる少なくとも1つの触媒不活性H E P N ドメインを含む。一部の実施形態において、エフェクタータンパク質は、野生型R x x x x HモチーフのR又はHの少なくとも一方の突然変異からそれぞれ得られる2つの触媒不活性H E P N ドメインを含む。

【0404】

ある実施形態において、V I - B 型R N A ターゲティングエフェクタータンパク質をコードする核酸分子は、真核細胞での発現にコドン最適化され得る。真核生物は、本明細書に考察されるとおりのものであり得る。核酸分子は、エンジニアリングされたもの又は天然に存在しないものであり得る。

【0405】

ある実施形態において、V I - B 型R N A ターゲティングエフェクタータンパク質、詳細にはC a s 1 3 b 又はそのオルソログ若しくはホモログは1つ以上の突然変異を含み得る（従って、それをコードする核酸分子が突然変異を有し得る）。突然変異は人工的に導入された突然変異であり得、限定はされないが、触媒ドメインにおける1つ以上の突然変異が含まれ得る。C a s 9 酵素に関連する触媒ドメインの例としては、限定はされないが、R u v C I、R u v C I I、R u v C I I I 及びH N H ドメインを挙げることができる。C a s 1 3 b 酵素に関連する触媒ドメインの例としては、限定はされないが、H

10

20

30

40

50

EPNDメインを挙げることができる。

【0406】

ある実施形態において、Cas13bなどのVI-B型タンパク質又はそのオルソログ若しくはホモログは1つ以上の突然変異を含み得る。突然変異は人工的に導入された突然変異であり得、限定はされないが、触媒ドメインにおける1つ以上の突然変異を挙げることができる。Cas酵素に関連する触媒ドメインの例としては、限定はされないがHEPNDメインを挙げることができる。

【0407】

ある実施形態において、Cas13b又はそのオルソログ若しくはホモログなどのVI-B型タンパク質は、機能ドメインと融合した又はそれに作動可能に連結された汎用核酸結合タンパク質として用いられ得る。例示的機能ドメインとしては、限定はされないが、翻訳開始因子、翻訳活性化因子、翻訳抑制因子、ヌクレアーゼ、詳細にはリボヌクレアーゼ、スプライソソーム、ビーズ、光誘導性／制御性ドメイン又は化学物質誘導性／制御性ドメインを挙げることができる。

【0408】

一部の実施形態において、非改変核酸ターゲティングエフェクタータンパク質は切断活性を有し得る。一部の実施形態において、RNAターゲティングエフェクタータンパク質は、標的配列内及び／又は標的配列の相補体内又は標的配列と会合した配列においてなど、標的配列の位置又はその近傍における一方又は両方の核酸(DNA又はRNA)鎖の切断を導き得る。一部の実施形態において、核酸ターゲティングCasタンパク質は、標的配列の最初又は最後のヌクレオチドから約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500又はそれを超える塩基対以内にあるRNA鎖の切断を導き得る。一部の実施形態において、ベクターは、対応する野生型酵素と比べて突然変異し得る核酸ターゲティングCasタンパク質をコードし、そのため突然変異型核酸ターゲティングCasタンパク質は、標的配列を含有する標的ポリヌクレオチドの一方又は両方のDNA鎖又はRNA鎖を切断する能力を欠くことになる。更なる例として、Casの2つ以上の触媒ドメイン(例えば、HEPNDメイン)を突然変異させることにより、実質的に全てのRNA切断活性を欠く突然変異型Casが作製され得る。一部の実施形態において、核酸ターゲティングエフェクタータンパク質は、突然変異酵素のRNA切断活性が非突然変異型の酵素の核酸切断活性の約25%、10%、5%、1%、0.1%、0.01%以下又はそれ未満であるとき、実質的に全てのRNA切断活性を欠いていると見なされ得る。一例は、突然変異型の核酸切断活性が非突然変異型と比較したときにゼロ又は無視できる程度のときであり得る。エフェクタータンパク質は、VI-B型CRISPR系からの複数のヌクレアーゼドメインを有する最も大型のヌクレアーゼと相同性を共有する一般的な酵素クラスを参照して同定し得る。由来するとは、本出願人らは、由来酵素が野生型酵素と高度な配列相同性を有するという意味で概して野生型酵素をベースとするが、しかし、それは、当該技術分野において公知のとおり又は本明細書に記載されるとおりの何らかの方法で突然変異している(改変されている)ことを意味する。

【0409】

この場合にも、用語のCas及びCRISPR酵素及びCRISPRタンパク質及びCasタンパク質は、概して同義的に用いられ、Cas9に具体的に言及することによるなど、特に明らかでない限り、本明細書で言及する際には常に類推から、本願に更に記載される新規CRISPRエフェクタータンパク質を指すことが理解されるであろう。上述のとおり、本明細書において用いられる残基付番の多くは、VI型CRISPR遺伝子座からのエフェクタータンパク質を参照する。しかしながら、本発明には、他の微生物種由来の更に多くのエフェクタータンパク質が含まれることが理解されるであろう。特定の実施形態において、Casは構成的に存在するか、又は誘導可能に存在するか、又は条件的に存在するか、又は投与されるか、又は送達され得る。Cas最適化を用いて機能を増強するか又は新規機能を開発し得、キメラCasタンパク質を作成することができる。及びCasを汎用核酸結合タンパク質として用いられ得る。

【0410】

一部の実施形態において、核酸ターゲティング系の1つ以上のエレメントの発現をドライブする1つ以上のベクターが宿主細胞に導入され、核酸ターゲティング系のエレメントが発現すると、1つ以上の標的部位において核酸ターゲティング複合体の形成が導かれる。例えば、核酸ターゲティングエフェクター酵素及び核酸ターゲティングガイドRNAが、各々別個のベクター上で別個の調節エレメントに作動可能に連結され得る。核酸ターゲティング系のRNAは、トランスジェニック核酸ターゲティングエフェクタータンパク質動物又は哺乳動物、例えば核酸ターゲティングエフェクタータンパク質を構成的に又は誘導性に又は条件的に発現する動物又は哺乳動物；又は本来核酸ターゲティングエフェクタータンパク質を発現しているか又は核酸ターゲティングエフェクタータンパク質を含有する細胞を有する動物又は哺乳動物へと、核酸ターゲティングエフェクタータンパク質をインビボでコードし及び発現するベクターをそれに事前投与するなどして送達することができる。代わりに、同じ又は異なる調節エレメントから発現するエレメントの2つ以上が単一のベクターに組み合わせられ得、1つ以上の追加のベクターが、第1のベクターに含まれない核酸ターゲティング系の任意の構成成分を提供する。単一のベクターに組み合わせられる核酸ターゲティング系エレメントは、あるエレメントが第2のエレメントに対して5'側（その「上流」）に位置するか、又はそれに対して3'側（その「下流」）に位置するなど、任意の好適な向きで配置され得る。あるエレメントのコード配列は第2のエレメントのコード配列と同じ鎖上又は逆鎖上に位置し得、同じ又は逆の方向に向き得る。一部の実施形態において、単一のプロモーターが、1つ以上のイントロン配列内に組み込まれた（例えば、各々が異なるイントロンにあるか、2つ以上が少なくとも1つのイントロンにあるか、又は全てが単一のイントロンにある）、核酸ターゲティングエフェクタータンパク質及び核酸ターゲティングガイドRNAをコードする転写物の発現をドライブする。一部の実施形態において、核酸ターゲティングエフェクタータンパク質と核酸ターゲティングガイドRNAとは同じプロモーターに作動可能に連結されていて、そこから発現し得る。核酸ターゲティング系の1つ以上のエレメントを発現させるための送達媒体、ベクター、粒子、ナノ粒子、製剤及びその構成成分については、国際公開第2014/093622号パンフレット（PCT/米国特許出願公開第2013/074667号明細書）など、前述の文献で使用されているとおりである。一部の実施形態において、ベクターは制限エンドヌクレアーゼ認識配列などの1つ以上の挿入部位（「クローニング部位」とも称される）を含む。一部の実施形態において、1つ以上の挿入部位（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上又はそれより多い挿入部位）は、1つ以上のベクターの1つ以上の配列エレメントの上流及び／又は下流に位置する。一部の実施形態において、ベクターは2つ以上の挿入部位を含み、従って各部位へのガイド配列の挿入が可能である。かかる構成において、2つ以上のガイド配列は、単一のガイド配列の2つ以上のコピー、2つ以上の異なるガイド配列又はこれらの組み合わせを含み得る。複数の異なるガイド配列を使用すると、単一の発現構築物を用いて細胞内の複数の異なる対応する標的配列へと核酸ターゲティング活性を標的化させることができる。例えば、単一のベクターが、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20個以上又はそれより多いガイド配列を含み得る。一部の実施形態において、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上又はそれより多いかかるガイド配列含有ベクターが提供され、且つ任意選択で細胞に送達され得る。一部の実施形態において、ベクターは、核酸ターゲティングエフェクタータンパク質をコードする酵素コード配列に作動可能に連結された調節エレメントを含む。核酸ターゲティングエフェクタータンパク質又は核酸ターゲティングガイドRNAは別個に送達し得、及び有利には、これらの少なくとも1つが粒子又はナノ粒子複合体によって送達される。核酸ターゲティングエフェクタータンパク質が発現する時間を与えるため、核酸ターゲティングエフェクタータンパク質mRNAを核酸ターゲティングガイドRNAより先に送達し得る。核酸ターゲティングエフェクタータンパク質mRNAは核酸ターゲティングガイドRNAの投与の1～12時間前（好ましくは約2～6時間前）に投与され得る。代わりに、核酸ターゲティングエフェクタータンパク質mRNA及び核酸

10

20

30

40

50

ターゲティングガイドRNAと一緒に投与され得る。有利には、核酸ターゲティングエフェクタータンパク質mRNA+ガイドRNAの初回投与から1～12時間後（好ましくは約2～6時間後）にガイドRNAの第2のブースター用量が投与され得る。核酸ターゲティングエフェクタータンパク質mRNA及び／又はガイドRNAの追加の投与は、最も効率的なゲノム及び／又はトランスクリプトーム改変レベルを達成するのに有用であり得る。

【0411】

一態様において、本発明は、核酸ターゲティング系の1つ以上のエレメントの使用方法を提供する。本発明の核酸ターゲティング複合体は、標的RNAを改変する有効な手段を提供する。本発明の核酸ターゲティング複合体は、非常に多数の細胞型における標的RNAの改変（例えば、欠失、挿入、転位、不活性化、活性化）を含め、多岐にわたる有用性を有する。このように本発明の核酸ターゲティング複合体は、例えば、遺伝子療法、薬物スクリーニング、疾患診断及び予後判定において、広範な適用性を有する。例示的核酸ターゲティング複合体は、目的の標的遺伝子座内の標的配列にハイブリダイズするガイドRNAと複合体を形成したRNAターゲティングエフェクタータンパク質を含む。

【0412】

一実施形態において、本発明は、標的RNAを切断する方法を提供する。本方法は、標的RNAに結合して前記標的DNAの切断を生じさせる核酸ターゲティング複合体を用いて標的RNAを改変するステップを含み得る。ある実施形態において、本発明の核酸ターゲティング複合体は、細胞に導入されると、RNA配列に切断（例えば、一本鎖又は二本鎖切断）を作り出し得る。例えば、本方法を用いて細胞内の疾患RNAを切断することができる。例えば、組み込もうとする配列に上流配列及び下流配列が隣接した外因性RNA鋳型が細胞に導入され得る。これらの上流及び下流配列は、RNAにおける組み込み部位の両側と配列類似性を共有している。必要に応じて、ドナーRNAはmRNAであり得る。外因性RNA鋳型は、組み込もうとする配列（例えば、突然変異型RNA）を含む。組み込み配列は、細胞にとって内因性又は外因性の配列であり得る。組み込もうとする配列の例としては、タンパク質をコードするRNA又は非コードRNA（例えば、マイクロRNA）が挙げられる。従って、組み込み配列は、適切な制御配列に作動可能に連結され得る。代わりに、組み込み配列が調節機能を提供し得る。外因性RNA鋳型中の上流及び下流配列は、目的のRNA配列とドナーRNAとの間の組換えを促進するように選択される。上流配列は、標的組み込み部位の上流のRNA配列と配列類似性を共有するRNA配列である。同様に、下流配列は、標的組み込み部位の下流のRNA配列と配列類似性を共有するRNA配列である。外因性RNA鋳型中の上流及び下流配列は、標的RNA配列と75%、80%、85%、90%、95%又は100%の配列同一性を有し得る。好ましくは、外因性RNA鋳型中の上流及び下流配列は、標的RNA配列と約95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有する。一部の方法において、外因性RNA鋳型中の上流及び下流配列は、標的RNA配列と約99%又は100%の配列同一性を有する。上流又は下流配列は、約20bp～約2500bp、例えば約50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400又は2500bpを含み得る。一部の方法において、例示的上流又は下流配列は、約200bp～約2000bp、約600bp～約1000bp又はより詳細には約700bp～約1000bpを有する。一部の方法において、外因性RNA鋳型はマーカを更に含み得る。かかるマーカは標的組み込みのスクリーニングを容易にし得る。好適なマーカの例としては、制限部位、蛍光タンパク質又は選択可能マーカが挙げられる。本発明の外因性RNA鋳型は組換え技術を用いて構築することができる（例えば、Sambrook et al., 2001及びAusubel et al., 1996を参照されたい）。外因性RNA鋳型を組み込むことによる標的RNAの改変方法では、核酸ターゲティング複合体によってDNA又はRNA配列に切断（例えば、二本鎖又は一本鎖DNA又はRNAにおける二本鎖又は一本鎖切断）

が導入され、外因性RNA鋳型との相同組換えによってこの切断が修復されると、鋳型がRNA標的に組み込まれる。二本鎖切断の存在が鋳型の組込みを促進する。他の実施形態において、本発明は、真核細胞におけるRNAの発現を改変する方法を提供する。本方法は、RNA（例えば、mRNA又はプレmRNA）に結合する核酸ターゲティング複合体を用いて標的ポリヌクレオチドの発現を増加又は減少させるステップを含む。一部の方法では、標的RNAを不活性化させて細胞の発現の改変を生じさせることができる。例えば、RNAターゲティング複合体が細胞内の標的配列に結合すると、標的RNAが不活性化され、そのためその配列は翻訳されないか、コードされたタンパク質が産生されないか、又は配列が野生型配列のようには機能しなくなる。例えば、タンパク質又はマイクロRNAをコードする配列を不活性化して、タンパク質又はマイクロRNA又はプレマイクロRNA転写物が産生されないようにし得る。RNAターゲティング複合体の標的RNAは、真核細胞にとって内因性又は外因性の任意のRNAであり得る。例えば、標的RNAは、真核細胞の核に存在するRNAであり得る。標的RNAは、遺伝子産物（例えば、タンパク質）をコードする配列（例えば、mRNA又はプレmRNA）又は非コード配列（例えば、ncRNA、lncRNA、tRNA又はrRNA）であり得る。標的RNAの例としては、生化学的シグナル伝達経路に関連する配列、例えば生化学的シグナル伝達経路関連RNAが挙げられる。標的RNAの例としては、疾患関連RNAが挙げられる。「疾患関連」RNAは、非疾患対照の組織又は細胞と比較して罹患組織に由来する細胞において翻訳産物を異常なレベルで又は異常な形態で産生している任意のRNAを指す。それは異常に高いレベルで発現するようになる遺伝子から転写されるRNAであり得、それは、異常に低いレベルで発現するようになる遺伝子から転写されるRNAであり得、ここで、発現の変化は、疾患の発生率及び／又は進行と相関する。疾患関連RNAは、疾患の病因に直接関与するか、又はそれに関与する遺伝子との連鎖不平衡がある突然変異又は遺伝的変異を有する遺伝子から転写されるRNAも指す。翻訳産物は既知又は未知であり得、且つ正常レベル又は異常レベルであり得る。RNAターゲティング複合体の標的RNAは、真核細胞にとって内因性又は外因性の任意のRNAであり得る。例えば、標的RNAは、真核細胞の核に存在するRNAであり得る。標的RNAは、遺伝子産物（例えば、タンパク質）をコードする配列（例えば、mRNA又はプレmRNA）又は非コード配列（例えば、ncRNA、lncRNA、tRNA又はrRNA）であり得る。

【0413】

一部の実施形態において、本方法は、核酸ターゲティング複合体を標的RNAに結合させて前記標的RNA又はRNAの切断を生じさせ、それにより標的RNAを改変するステップを含むことができ、ここで、核酸ターゲティング複合体は、前記標的RNA内の標的配列にハイブリダイズするガイドRNAと複合体を形成した核酸ターゲティングエフェクタータンパク質を含む。一態様において、本発明は、真核細胞におけるRNAの発現を改変する方法を提供する。一部の実施形態において、本方法は、核酸ターゲティング複合体をRNAに結合させて、前記結合により前記RNAの発現の増加又は減少を生じさせるステップを含み、ここで、核酸ターゲティング複合体は、ガイドRNAと複合体を形成した核酸ターゲティングエフェクタータンパク質を含む。同様の考察及び条件が、標的RNAを改変する方法にも上記のとおり適用される。實際上、これらの試料採取、培養及び再導入の選択肢は本発明の全態様に適用される。一態様において、本発明は、真核細胞の標的RNAを改変する方法を提供し、これはインビボ、エキソビボ又はインビトロであり得る。一部の実施形態において、本方法は、ヒト又は非ヒト動物から細胞又は細胞集団を試料採取するステップ及び1つ又は複数の細胞を改変するステップを含む。培養は、任意の段階においてエキソビボで行われ得る。この1つ又は複数の細胞が更に非ヒト動物又は植物に再導入され得る。再導入される細胞について、細胞は幹細胞であることが特に好ましい。

【0414】

実際、本発明の任意の態様において、核酸ターゲティング複合体は、標的配列にハイブリダイズするガイドRNAと複合体を形成した核酸ターゲティングエフェクタータンパク

質を含み得る。

【0415】

本発明は、核酸ターゲティング系及びその構成成分に関係した、RNA配列ターゲティングが関わる遺伝子発現の制御に用いられる系、方法及び組成物のエンジニアリング及び最適化に関する。有利な実施形態において、エフェクタータンパク質は、Cas13bなどのVI-B型タンパク質である。本方法の利点は、CRISPR系がオフターゲット結合及びその結果として生じる副作用を最小限に抑えるか又はそれを回避することである。これは、標的RNAに対して高度な配列特異性を有するように構成された系を用いて達成される。

【0416】

2つの異なるアダプター（各々が個別の核酸ターゲティングガイドRNAと会合している）を用いると、アクチベーターアダプタータンパク質融合物及びリプレッサーアダプタータンパク質融合物を異なる核酸ターゲティングガイドRNAと共に使用して、1つのDNA又はRNAの発現を活性化する一方、別のDNA又はRNAの発現を抑制することが可能になる。これらは、その異なるガイドRNAと共に、多重化手法で一緒に又は実質的に一緒に投与することができる。比較的少数のエフェクタータンパク質分子を多数の改変ガイドと共に使用することができるため、例えば10又は20又は30個など、多数のかかる改変された核酸ターゲティングガイドRNAを全て同時に使用し得る一方、1つのみの（又は少なくとも最小数の）エフェクタータンパク質分子を送達するのみで十分である。アダプタータンパク質は1つ以上のアクチベーター又は1つ以上のリプレッサーと会合（好ましくは連結又は融合）し得る。例えば、アダプタータンパク質は第1のアクチベーター及び第2のアクチベーターと会合し得る。第1及び第2のアクチベーターは同じであり得るが、これらは、好ましくは、異なるアクチベーターである。3つ以上又は更に4つ以上のアクチベーター（又はリプレッサー）を使用し得、しかし、パッケージサイズにより、個数が5を超える異なる機能ドメインとなることは制限され得る。アダプタータンパク質との直接的な融合と比べて、好ましくはリンカーが用いられ、ここで、2つ以上の機能ドメインがアダプタータンパク質と会合する。好適なリンカーとしてはGlySerリンカーを挙げることができる。

【0417】

核酸ターゲティングエフェクタータンパク質ガイドRNA複合体が全体として2つ以上の機能ドメインと会合し得ることも想定される。例えば、核酸ターゲティングエフェクタータンパク質と会合した2つ以上の機能ドメインがあり得るか、又はガイドRNAと（1つ以上のアダプタータンパク質を介して）会合した2つ以上の機能ドメインがあり得るか、又は核酸ターゲティングエフェクタータンパク質と会合した1つ以上の機能ドメイン及びガイドRNAと（1つ以上のアダプタータンパク質を介して）会合した1つ以上の機能ドメインがあり得る。

【0418】

アダプタータンパク質とアクチベーター又はリプレッサーとの間の融合は、リンカーを含み得る。例えば、GlySerリンカーGGGSを使用することができる。これらを3個（（GGGS）₃）又は6個、9個又は更に12個又はそれを超える反復で使用するにより、必要に応じて好適な長さを提供することができる。リンカーは、ガイドRNAと機能ドメイン（アクチベーター又はリプレッサー）との間又は核酸ターゲティングエフェクタータンパク質と機能ドメイン（アクチベーター又はリプレッサー）との間に使用することができる。リンカー、使用者は適切な量の「機械的柔軟性」を操作する。

【0419】

本発明は、核酸ターゲティングエフェクタータンパク質とガイドRNAとを含む核酸ターゲティング複合体を包含し、ここで、核酸ターゲティングCasタンパク質は、少なくとも1つの突然変異〔そのため、核酸ターゲティングCasタンパク質は、その少なくとも1つの突然変異を有しない核酸ターゲティングエフェクタータンパク質の5%以下の活性を有する〕及び任意選択で少なくとも1つ以上の核局在化配列を含み、ガイドRNAは

、細胞内の目的のRNAにおける標的配列にハイブリダイズ可能なガイド配列を含み、ここで、核酸ターゲティングCasタンパク質は、2つ以上の機能ドメインと会合するか、又はガイドRNAの少なくとも1つのループが、1つ以上のアダプタータンパク質に結合する個別的なRNA配列の挿入によって改変され、ここで、アダプタータンパク質は、2つ以上の機能ドメインと会合するか、又は核酸ターゲティングCasタンパク質は1つ以上の機能ドメインと会合し、及びガイドRNAの少なくとも1つのループが、1つ以上のアダプタータンパク質に結合する個別のRNA配列の挿入によって改変され、ここで、アダプタータンパク質は、1つ以上の機能ドメインと会合する。

【0420】

Cas13bエフェクタータンパク質複合体は機能エフェクターを送達することができるRNAレベルで突然変異させることにより発現を消失させるCRISPR-Cas13b媒介性ノックアウトと異なり、CRISPR-Cas13bノックダウンは、例えば、Cas13bタンパク質の切断ドメインにある突然変異残基を介して、人工転写因子を用いて遺伝子発現を一時的に低下させることが可能であり、触媒的に不活性なCas13bが生成される。触媒的に不活性なCas13bは、ガイドRNA又はcrRNAと複合体を形成し、そのガイドRNA又はcrRNAのターゲティングドメインによって特定されるRNA配列に局在化するが、しかしながら、これは、標的を切断しない。不活性Cas13bタンパク質をエフェクタードメイン、例えば転写抑制ドメインと融合させると、ガイドRNAによって特定される任意の部位へとそのエフェクターをリクルートすることが可能になる。

【0421】

最適化された機能性RNAターゲティング系

ある態様において、従って、本発明は、機能性構成成分をRNA環境に特異的に送達するための系を提供する。これは、RNAへの種々の構成成分の特異的ターゲティングを可能にする本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を含むCRISPR系を使用して確実にすることができる。より詳細には、かかる構成成分には、RNA翻訳、分解等のアクチベーター又はリプレッサーなど、アクチベーター又はリプレッサーが含まれる。

【0422】

一態様によれば、本発明は、細胞内の目的の標的配列にハイブリダイズ可能なガイド配列を含むガイドRNA又はcrRNAを含む天然に存在しない又はエンジニアリングされた組成物を提供し、ここで、ガイドRNA又はcrRNAは、アダプタータンパク質に結合する1つ以上の個別のRNA配列の挿入によって改変される。詳細な実施形態において、RNA配列は、2つ以上のアダプタータンパク質に結合し得（例えば、アダプター）、ここで、各アダプタータンパク質は、1つ以上の機能ドメインと会合している。2つ以上の機能ドメインがあるとき、それらの機能ドメインは、同じであるか又は異なり得、例えば2つの同じ又は2つの異なるアクチベーター又はリプレッサーであり得る。ある態様において、本発明は、本明細書において考察される組成物を提供し、ここで、1つ以上の機能ドメインがRNAターゲティング酵素に付加されているため、機能ドメインは、標的RNAへの結合時、機能ドメインがその帰属機能で機能することが可能な空間的配置となる。ある態様において、本発明は、本明細書において考察される組成物を提供し、ここで、組成物は、少なくとも3つの機能ドメインであって、その少なくとも1つがRNAターゲティング酵素と会合し、且つその少なくとも2つがgRNA又はcrRNAと会合している機能ドメインを有するCRISPR-Cas13b複合体を含む。

【0423】

Cas13bエフェクタータンパク質複合体又はその構成成分の送達

【0424】

本開示及び当該技術分野における知識から、TALE、CRISPR-Cas系又はその構成成分、若しくはその核酸分子（例えば、HDR鋳型を含む）、若しくはその構成成分をコードし又は提供する核酸分子は、本明細書に概略的にも詳細にも記載される送達系

によって送達し得る。

【0425】

ベクター送達、例えばプラスミド、ウイルス送達：C R I S P R酵素及び／又は任意の本RNA、例えばガイドRNAは、任意の適切なベクター、例えばプラスミド又はウイルスベクター、例えばアデノ随伴ウイルス（AAV）、レンチウイルス、アデノウイルス若しくは他の種類のウイルスベクター又はこれらの組み合わせを用いて送達することができる。エフェクタータンパク質及び1つ以上のガイドRNAを1つ以上のベクター、例えばプラスミド又はウイルスベクターにパッケージングすることができる。一部の実施形態において、ベクター、例えばプラスミド又はウイルスベクターは、例えば筋肉注射によって目的の組織に送達される一方、送達は、静脈内、経皮、鼻腔内、口腔、粘膜又は他の送達方法によることもある。かかる送達は、単回投与又は複数回投与によるものであり得る。当業者は、本明細書で送達される実際の投薬量が、ベクターの選択、標的細胞、生物又は組織、治療する対象の全身状態、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、種々の要因に応じて大きく異なり得ることを理解する。

10

【0426】

かかる用量は、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、ピーナツ油、ゴマ油など）、希釈剤、薬学的に許容可能な担体（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、薬学的に許容可能な賦形剤及び／又は当該技術分野で公知の他の化合物を更に含み得る。投薬量は、1つ以上の薬学的に許容可能な塩、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；及び酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などの有機酸塩を更に含み得る。加えて、湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝物質、ゲル又はゲル化物質、香料、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この中に存在し得る。加えて、1つ以上の他の従来の医薬成分、例えば防腐剤、湿潤剤、懸濁剤、界面活性剤、酸化防止剤、固化防止剤、充填剤、キレート化剤、コーティング剤、化学安定剤なども、特に投薬形態が再構成可能な形態である場合に存在し得る。好適な例示的成分として、微結晶性セルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリソルベート80、フェニルエチルアルコール、クロロブタノール、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン類、エチルパニリン、グリセリン、フェノール、パラクロロフェノール、ゼラチン、アルブミン及びこれらの組み合わせが挙げられる。薬学的に許容可能な賦形剤の徹底的な考察は、RE M I N G T O N ' S P H A R M A C E U T I C A L S C I E N C E S (M a c k P u b . C o . , N . J . 1 9 9 1) (参照により本明細書に援用される) において利用可能である。

20

30

【0427】

本明細書のある実施形態において、送達はアデノウイルスを介し、これは、少なくとも 1×10^5 粒子（粒子単位、puとも称される）のアデノウイルスベクターを含有する単回ブースター用量であり得る。本明細書のある実施形態において、用量は、好ましくは、少なくとも約 1×10^6 粒子（例えば、約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ 粒子）、より好ましくは少なくとも約 1×10^7 粒子、より好ましくは少なくとも約 1×10^8 粒子（例えば、約 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11}$ 粒子又は約 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{12}$ 粒子）及び最も好ましくは少なくとも約 1×10^0 粒子（例えば、約 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 粒子又は約 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{12}$ 粒子）又は更に少なくとも約 1×10^{10} 粒子（例えば、約 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{12}$ 粒子）のアデノウイルスベクターである。代わりに、用量は、約 1×10^{14} 粒子以下、好ましくは約 1×10^{13} 粒子以下、更により好ましくは約 1×10^{12} 粒子以下、更により好ましくは約 1×10^{11} 粒子以下及び最も好ましくは約 1×10^{10} 粒子以下（例えば、約 1×10^9 粒子（articles）以下）を含む。従って、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 4×1

40

50

0.9 pu 、約 $1 \times 10^{10} \text{ pu}$ 、約 $2 \times 10^{10} \text{ pu}$ 、約 $4 \times 10^{10} \text{ pu}$ 、約 $1 \times 10^{11} \text{ pu}$ 、約 $2 \times 10^{11} \text{ pu}$ 、約 $4 \times 10^{11} \text{ pu}$ 、約 $1 \times 10^{12} \text{ pu}$ 、約 $2 \times 10^{12} \text{ pu}$ 又は約 $4 \times 10^{12} \text{ pu}$ のアデノウイルスベクターを含む単回用量のアデノウイルスベクターを含有し得る。例えば、2013年6月4日に付与された Nabel, et al. に対する米国特許第 8,454,972 B2 号明細書（参照によって本明細書に援用される）のアデノウイルスベクター及びその第 29 欄第 36～58 行にある投薬量を参照されたい。本明細書のある実施形態において、アデノウイルスは複数回用量で送達される。

【0428】

本明細書のある実施形態において、送達は AAV を介する。ヒトに対する AAV のインビボ送達についての治療上有効な投薬量は、約 1×10^{10} ～約 1×10^{10} の機能性 AAV/ml 溶液を含有する約 20 ～約 50 ml の生理食塩水の範囲であると考えられる。投薬量は、治療利益と任意の副作用との均衡がとれるように調整され得る。本明細書のある実施形態において、AAV 用量は、概して、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} ゲノム又は約 1×10^{11} ～約 1×10^{16} ゲノム AAV の濃度範囲である。ヒト投薬量は約 1×10^{13} ゲノム AAV であり得る。かかる濃度は、約 0.001 ml ～約 100 ml、約 0.05 ～約 50 ml 又は約 10 ～約 25 ml の担体溶液で送達され得る。他の効果的な投薬量が、当業者により、用量反応曲線を作成するルーチンの試験を用いて容易に確立され得る。例えば、2013年3月26日に付与された Hajjar, et al. に対する米国特許第 8,404,658 B2 号明細書、第 27 欄、第 45～60 行を参照されたい。

【0429】

本明細書のある実施形態において、送達はプラスミドを介する。かかるプラスミド組成物では、投薬量は、反応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 の好適な分量は、個体 70 kg 当たり約 0.1 ～約 2 mg 又は約 1 μ g ～約 10 μ g であり得る。本発明のプラスミドは、概して、(i) プロモーター；(ii) 前記プロモーターに作動可能に連結された、核酸ターゲティング CRISPR 酵素をコードする配列；(iii) 選択可能マーカー；(iv) 複製起点；及び (v) (ii) の下流で (ii) に作動可能に連結された転写ターミネーターを含有し得る。プラスミドは CRISPR 複合体の RNA 構成成分もコードし得るが、これらの 1 つ以上は、代わりに異なるベクター上にコードされ得る。

【0430】

本明細書の用量は、平均 70 kg の個体に基づく。投与頻度は医学又は獣医学の実務者（例えば、医師、獣医師）又は当該技術分野の科学者の裁量の範囲内にある。また、実験に使用されるマウスは、典型的には約 20 g であり、マウス実験から 70 kg の個体にスケールアップし得ることも注記される。

【0431】

一部の実施形態では、本発明の RNA 分子はリボソーム製剤又はリボフェクチン製剤などで送達され、当業者に周知の方法により調製することができる。かかる方法は、例えば、米国特許第 5,593,972 号明細書、同第 5,589,466 号明細書及び同第 5,580,859 号明細書（これらは参照により本明細書に援用される）に記載されている。特に哺乳類細胞への siRNA 送達の増強及び改良を目的とした送達系が開発されており（例えば、Shen et al. FEBS Lett. 2003, 539:111-114; Xia et al., Nat. Biotech. 2002, 20:1006-1010; Reich et al., Mol. Vision. 2003, 9:210-216; Sorensen et al., J. Mol. Biol. 2003, 327:761-766; Lewis et al., Nat. Gen. 2002, 32:107-108 及び Simeoni et al., NAR 2003, 31, 11:2717-2724 を参照されたい）、本発明に適用し得る。siRNA は近年、霊長類における

遺伝子発現の抑制への使用が成功しており（例えば、Tolentino et al., Retina 24 (4) : 660を参照されたい）、これは本発明にも適用し得る。

【0432】

実際、RNA送達インビボ送達の有効な方法である。リボソーム又は粒子を用いて核酸ターゲティングCas13bタンパク質及びガイドRNA若しくはcrRNA（及び例えばHR修復鋳型）を細胞内に送達することが可能である。従って、核酸ターゲティングCas13bタンパク質の送達及び／又は本発明のガイドRNA若しくはcrRNAの送達は、RNA形態で、微小胞、リボソーム又は粒子を介することができる。例えば、Cas mRNA及びガイドRNAをインビボ送達用にリボソーム粒子にパッケージングすることができる。リボソームトランスフェクション試薬、例えばLife Technologiesのリボフェクタミン及び市販の他の試薬は、RNA分子を肝臓に効果的に送達することができる。

【0433】

同様に好ましいRNAの送達手段としては、RNAのナノ粒子による送達（Cho, S., Goldberg, M., Son, S., Xu, Q., Yang, F., Mei, Y., Bogatyrev, S., Langer, R. and Anderson, D., “Lipid-like nanoparticles for small interfering RNA delivery to endothelial cells”, Advanced Functional Materials, 19:3112-3118, 2010）又はエキソソームによる送達（Schroeder, A., Levins, C., Cortez, C., Langer, R., and Anderson, D., “Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery”, Journal of Internal Medicine, 267:9-21, 2010, PMID:20059641）も挙げられる。実際、エキソソームは、RNAターゲティング系とある程度の類似性を有する系であるsiRNAの送達に特に有用であることが示されている。例えば、El-Andalousi S, et al. (“Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo” Nat Protoc. 2012 Dec; 7 (12) : 2112-26. doi:10.1038/nprot.2012.131. Epub 2012 Nov 15) は、エキソソームがいかに種々の生物学的障壁を越えた薬物送達に有望なツールであるか、及びsiRNAのインビトロ及びインビボ送達に利用できるかを記載している。その手法は、発現ベクターのトランスフェクションにより、ペプチドリガンドに融合したエキソソームタンパク質を含む標的エキソソームを作成するものである。次に、トランスフェクト細胞上清からエキソソームが精製され、特徴付けられた後、RNAがエキソソームにロードされる。本発明に係る送達又は投与はエキソソームを用いて、詳細には、限定はされないが脳に対して行うことができる。ビタミンE（ α -トコフェロール）を核酸ターゲティングCasタンパク質にコンジュゲートさせて、例えばUno et al. (HUMAN GENE THERAPY 22:711-719 (June 2011)) によって行われた脳への低分子干渉RNA (siRNA) の送達と同じように、高密度リポタンパク質 (HDL) と共に脳に送達することができる。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 又はフリーToocsibACE又はToocsibACE/HDLが充填され且つBrain Infusion Kit 3 (Alzet) に接続された浸透圧ミニポンプ (モデル1007D; Alzet, Cupertino, CA) でマウスが注入された。背側第三脳室内への注入のため、正中線上でブレグマから約0.5mm後方に脳注入カニューレが留置された。Uno et al. は、HDLを含む僅か3nmolのToocsibRNAが、同じICV注入法による同程度の標的の減少を誘導可能であったことを見出した。脳を標的としてHDLと共投与される、 α -トコフェロールにコンジュゲートされた同様の投薬量の核酸ターゲティングエフェクタータンパク質を本発明においてヒトで企図することができ、例えば脳を標的とする約3nmol～約3 μ molの核酸ターゲティングエフェクタータンパク質を企図

し得る。Zou et al. (HUMAN GENE THERAPY 22:465-475 (April 2011)) は、ラットの脊髄におけるインビボでの遺伝子サイレンシングのための PKC γ を標的とする短鎖ヘアピン RNA のレンチウイルス媒介送達方法を記載している。Zou et al. は、 1×10^9 形質導入単位 (TU) / ml の力価を有する約 10 μ l の組換えレンチウイルスをくも膜下カテーテルによって投与した。脳を標的とするレンチウイルスベクターにおいて発現する同様の投薬量の核酸ターゲティングエフェクタータンパク質を本発明においてヒトに企図することができ、例えば 1×10^9 形質導入単位 (TU) / ml の力価を有するレンチウイルスにおける脳を標的とする約 10 ~ 50 ml の核酸ターゲティングエフェクタータンパク質を企図し得る。

【0434】

脳への局所送達に関して、これは様々な方法で達成することができる。例えば、物質を線条体内に例えば注入によって送達することができる。注入は、開頭により定位的に行うことができる。

【0435】

パッケージング及びプロモーター概要

インビボでゲノム改変を媒介するために RNA ターゲティングエフェクタータンパク質 (Cas13b タンパク質) コード核酸分子、例えば DNA をベクター、例えばウイルスベクターにパッケージングする方法は、以下を含む：

シングルウイルスベクター：

2 つ以上の発現カセットを含むベクター：

プロモーター—核酸ターゲティングエフェクタータンパク質コード核酸分子—ターミネーター

プロモーター—ガイド RNA 1—ターミネーター

プロモーター—ガイド RNA (N)—ターミネーター (ベクターサイズの限界まで)

ダブルウイルスベクター：

RNA ターゲティングエフェクタータンパク質 (Cas13b) の発現をドライブするための 1 つの発現カセットを含むベクター 1

プロモーター—RNA ターゲティングエフェクター (Cas13b) タンパク質コード核酸分子—ターミネーター

1 つ以上のガイド RNA 又は crRNA の発現をドライブするためのもう 1 つの発現カセットを含むベクター 2

プロモーター—ガイド RNA 1 又は crRNA 1—ターミネーター

プロモーター—ガイド RNA 1 (N) 又は crRNA 1 (N)—ターミネーター (ベクターサイズの限界まで)。

【0436】

RNA ターゲティングエフェクタータンパク質コード核酸分子発現のドライブに用いられるプロモーターには、以下が含まれ得る。AAV ITR はプロモーターとして役立ち得る：これは、追加のプロモーターエレメント (ベクター内で場所をとり得る) の必要性がなくなるため有利である。空いた追加のスペースを用いて、追加のエレメント (gRNA など) の発現をドライブすることができる。また、ITR 活性は比較的弱いので、核酸ターゲティングエフェクタータンパク質の過剰発現による潜在的な毒性を低減するために用いることができる。偏在発現には、CMV、CAG、CBh、PGK、SV40、フェリチン重鎖又は軽鎖等のプロモーターを使用し得る。脳又は他の CNS での発現には、プロモーター：全てのニューロン用のシナプシン I、興奮性ニューロン用の CaMKII α 、GABA 作動性ニューロン用の GAD67 又は GAD65 又は VGAT 等を使用することができる。肝臓での発現には、アルブミンプロモーターを使用することができる。肺での発現には、SP-B を使用することができる。内皮細胞には、ICAM を使用することができる。造血細胞には、IFN β 又は CD45 を使用することができる。骨芽細胞には、OG-2 を使用することができる。ガイド RNA のドライブに用いられるプロモーターには、以下が含まれ得る：U6 又は H1 などの Pol I IIR プロモーター、ガイド RNA

10

20

30

40

50

A又はcrRNAを発現させるためのPol IIプロモーター及びイントロンカセット。

【0437】

アデノ随伴ウイルス(AAV)

Cas13b及び1つ以上のガイドRNA又はcrRNAは、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レンチウイルス、アデノウイルス又は他のプラスミド又はウイルスベクタータイプを使用して、詳細には、例えば、米国特許第8,454,972号明細書(アデノウイルス用の製剤、用量)、同第8,404,658号明細書(AAV用の製剤、用量)及び同第5,846,946号明細書(DNAプラスミド用の製剤、用量)並びにレンチウイルス、AAV及びアデノウイルスが関わる臨床試験及びそのような臨床試験に関する刊行物からの製剤及び用量を用いて送達することができる。例えば、AAVについて、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第8,454,972号明細書及びAAVが関わる臨床試験にあるとおりであり得る。アデノウイルスについて、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第8,404,658号明細書及びアデノウイルスが関わる臨床試験にあるとおりであり得る。プラスミド送達について、投与経路、製剤及び用量は、米国特許第5,846,946号明細書及びプラスミドが関わる臨床試験にあるとおりであり得る。用量は、平均70kgの個体(例えば、男性成人ヒト)に基づくか又はそれに当てはめられ得、異なる体重及び種の患者、対象、哺乳動物用に調整することができる。投与頻度は、患者又は対象の年齢、性別、全般的な健康、他の条件並びに対処される特定の状態又は症状を含めた通常の要因に応じて、医学又は獣医学実務者(例えば、医師、獣医師)の範囲内である。ウイルスベクターは、目的の組織に注射することができる。細胞型特異的ゲノム改変について、RNAターゲティングエフェクタータンパク質(Cas13bエフェクタータンパク質)の発現は、細胞型特異的プロモーターによってドライブすることができる。例えば、肝臓特異的発現にはアルブミンプロモーターが用いられ得、及びニューロン特異的発現には(例えば、CNS障害を標的化するため)シナプシンIプロモーターが用いられ得る。インビボ送達に関して、他のウイルスベクターと比べて幾つかの理由でAAVが有利である:低毒性(これは、免疫応答を活性化させ得る細胞粒子の超遠心が不要な精製方法に起因し得る)、及び宿主ゲノムに組み込まれないため、挿入突然変異誘発を引き起こす確率の低さ。

【0438】

AAVのパッケージング限界は、4.5又は4.75Kbである。これは、RNAターゲティングエフェクタータンパク質(Cas13bエフェクタータンパク質)コード配列並びにプロモーター及び転写ターミネーターを全て同じウイルスベクターに収める必要があることを意味する。AAVに関して、AAVは、AAV1、AAV2、AAV5又はこれらの任意の組み合わせであり得る。標的化しようとする細胞に関連するAAVのAAVを選択することができる。例えば、脳又は神経細胞の標的化にはAAV血清型1、2、5又はハイブリッドカプシドAAV1、AAV2、AAV5又はこれらの任意の組み合わせを選択することができ、及び心臓組織の標的化にはAAV4を選択することができる。AAV8は肝臓への送達に有用である。本明細書におけるプロモーター及びベクターが個々に好ましい。これらの細胞に関する特定のAAV血清型の一覧は以下のとおりである(Grimm, D. et al, J. Virol. 82:5887-5911(2008)を参照されたい)。

【表 1】

細胞株	AAV-1	AAV-2	AAV-3	AAV-4	AAV-5	AAV-6	AAV-8	AAV-9
Huh-7	13	100	2.5	0.0	0.1	10	0.7	0.0
HEK293	25	100	2.5	0.1	0.1	5	0.7	0.1
HeLa	3	100	2.0	0.1	6.7	1	0.2	0.1
HepG2	3	100	16.7	0.3	1.7	5	0.3	ND
Hep1A	20	100	0.2	1.0	0.1	1	0.2	0.0
911	17	100	11	0.2	0.1	17	0.1	ND
CHO	100	100	14	1.4	333	50	10	1.0
COS	33	100	33	3.3	5.0	14	2.0	0.5
MeWo	10	100	20	0.3	6.7	10	1.0	0.2
NIH3T3	10	100	2.9	2.9	0.3	10	0.3	ND
A549	14	100	20	ND	0.5	10	0.5	0.1
HT1180	20	100	10	0.1	0.3	33	0.5	0.1
単球	1111	100	ND	ND	125	1429	ND	ND
未成熟 DC	2500	100	ND	ND	222	2857	ND	ND
成熟 DC	2222	100	ND	ND	333	3333	ND	ND

【0439】

レンチウイルス

レンチウイルスは、有糸分裂細胞及び分裂終了細胞の両方でその遺伝子の感染能及び発現能を有する複合的レトロウイルスである。最も一般的には、公知のレンチウイルスはヒト免疫不全ウイルス（HIV）であり、これは他のウイルスのエンベロープ糖タンパク質を用いて広範囲の細胞型を標的化する。レンチウイルスは以下のとおり調製し得る。pCasES10（これはレンチウイルストランスファープラスミド骨格を含有する）のクローニング後、低継代（ $p=5$ ）のHEK293FTをT-75フラスコに50%コンフルエンスとなるように播種し、その翌日、10%ウシ胎仔血清含有及び抗生物質不含のDMEM中でトランスフェクトした。20時間後、培地をOptiMEM（無血清）培地に交換し、4時間後にトランスフェクションを行った。細胞に10 μ gのレンチウイルストランスファープラスミド（pCasES10）及び以下のパッケージングプラスミド：5 μ gのpMD2.G（VSV-gシュードタイプ）及び7.5 μ gのpsPAX2（gag/pol/rev/tat）をトランスフェクトした。トランスフェクションは、カチオン性脂質デリバリー剤（50 μ L Lipofectamine 2000及び100 μ L Plus試薬）を含む4mL OptiMEM中で行った。6時間後、培地を、10%ウシ胎仔血清を含む抗生物質不含DMEMに交換した。これらの方法では細胞培養中に血清を使用するが、無血清方法が好ましい。

【0440】

レンチウイルスは以下のとおり精製し得る。48時間後にウイルス上清を回収した。初めに上清から残屑を除去し、0.45 μ m低タンパク質結合（PVDF）フィルタでろ過した。次に、それを超遠心機において24,000rpmで2時間スピンのした。ウイルスペレットを50 μ LのDMEM中に4℃で一晩再懸濁した。次に、それをアリコートに分け、直ちに-80℃で凍結した。

【0441】

10

20

30

40

50

別の実施形態において、ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）をベースとする最小限の非霊長類レンチウイルスベクターも特に眼遺伝子療法に企図される（例えば、Balagan, J Gene Med 2006; 8: 275-285を参照されたい）。別の実施形態において、滲出型（web form）の加齢黄斑変性症の治療のため網膜下注射によって送達される血管新生抑制タンパク質エンドスタチン及びアンジオスタチンを発現するウマ伝染性貧血ウイルスベースのレンチウイルス遺伝子療法ベクターであるRetinoStat（登録商標）も企図され（例えば、Binley et al., HUMAN GENE THERAPY 23: 980-991 (September 2012)を参照されたい）、このベクターは本発明の核酸ターゲティング系向けに改変し得る。

10

【0442】

別の実施形態において、HIV tat/revによって共有される共通のエクソンを標的化するsiRNAと、核小体局在TARデコイト、抗CCR5特異的ハンマーヘッド型リボザイムとを含む自己不活性化レンチウイルスベクター（例えば、DiGiusto et al. (2010) Sci Transl Med 2: 36ra43を参照されたい）を本発明の核酸ターゲティング系に使用及び／又は適合され得る。患者の体重1キログラム当たり最低 2.5×10^6 個のCD34+細胞を収集し、 $2 \mu\text{mol/L}$ のグルタミン、幹細胞因子（ 100 ng/ml ）、Flt-3リガンド（Flt-3L）（ 100 ng/ml ）及びトロンボポエチン（ 10 ng/ml ）（CellGenix）を含有するX-VIVO 15培地（Lonza）中 2×10^6 細胞/mlの密度で16

20

【0443】

レンチウイルスベクターについては、パーキンソン病の治療にあるとおり開示されており、例えば米国特許出願公開第20120295960号明細書及び米国特許第7303910号明細書及び同第7351585号明細書を参照されたい。レンチウイルスベクターは、眼疾患の治療についても開示されており、例えば米国特許出願公開第20060281180号明細書、20090007284号明細書、米国特許出願公開第20110117189号明細書；米国特許出願公開第20090017543号明細書；米国特許出願公開第20070054961号明細書、米国特許出願公開第20100317109号明細書を参照されたい。レンチウイルスベクターは、脳への送達についても開示されており、例えば米国特許出願公開第20110293571号明細書；米国特許出願公開第20110293571号明細書、米国特許出願公開第20040013648号明細書、米国特許出願公開第20070025970号明細書、米国特許出願公開第20090111106号明細書及び米国特許第7259015号明細書を参照されたい。

30

【0444】

RNA送達

RNA送達：核酸ターゲティングCas13bタンパク質及び／又はガイドRNAは、RNAの形態で送達することもできる。mRNAは、以下のエレメントを含むPCRカセットを用いて合成することができる： β グロビン-ポリAテール（120以上の一連のアデニン）由来のT7__プロモーター-コザック配列（GCCACC）-エフェクタータンパク質-3'UTRを含有するPCRカセットを用いて合成することができる。このカセットは、T7ポリメラーゼによる転写に使用することができる。ガイドRNA又はcrRNAは、T7__プロモーター-GG-ガイドRNA又はcrRNA配列を含有するカセットからのインビトロ転写を用いて転写することもできる。

40

【0445】

粒子送達系及び／又は製剤：

幾つかのタイプの粒子送達系及び／又は製剤が、多様な生物医学的適用において有用で

50

あることが知られている。一般に、粒子は、その輸送及び特性の点で一単位として挙動する小さい物体として定義される。粒子は、更に直径に基づいて分類される。粗粒子は2, 500~10, 000ナノメートルの範囲を包含する。微粒子は100~2, 500ナノメートルのサイズを有する。超微粒子又はナノ粒子は、概して1~100ナノメートルのサイズである。100nm程度の基準は、粒子をバルク材料と区別する新規特性が典型的には100nm未満の臨界長さスケールで生じるという事実である。

【0446】

本明細書で使用されるとき、粒子送達系／製剤は、本発明におけ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。本発明における粒子は、100ミクロン(μm)未満の最大径(例えば、直径)を有する任意の実体である。一部の実施形態において、本発明の粒子は10μm未満の最大径を有する。一部の実施形態において、本発明の粒子は2000ナノメートル(nm)未満の最大径を有する。一部の実施形態において、本発明の粒子は1000ナノメートル(nm)未満の最大径を有する。一部の実施形態において、本発明の粒子は900nm、800nm、700nm、600nm、500nm、400nm、300nm、200nm又は100nm未満の最大径を有する。典型的には、本発明の粒子は500nm以下の最大径(例えば、直径)を有する。一部の実施形態において、本発明の粒子は250nm以下の最大径(例えば、直径)を有する。一部の実施形態において、本発明の粒子は200nm以下の最大径(例えば、直径)を有する。一部の実施形態において、本発明の粒子は150nm以下の最大径(例えば、直径)を有する。一部の実施形態において、本発明の粒子は100nm以下の最大径(例えば、直径)を有する。より小さい粒子、例えば50nm以下の最大径を有する粒子が、本発明の一部の実施形態で使用される。一部の実施形態において、本発明の粒子は25nm~200nmの範囲の最大径を有する。

【0447】

粒子の特徴付け(例えば、形態、寸法等を特徴付けることを含む)は種々の異なる技法を用いて行われる。一般的な技法は、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、二重偏光干渉法及び核磁気共鳴(NMR)である。特徴付け(寸法計測)は、天然粒子(即ち負荷前)に関して行われるか又はカーゴの負荷後に行われ得(本明細書においてカーゴとは、例えば、CRISPR-Cas13b系の1つ以上の構成成分、例えばCas13b酵素又はmRNA又はガイドRNA又はこれらの任意の組み合わせを指し、且つ更なる担体及び／又は賦形剤を含み得る)、それにより本発明の任意のインビトロ、エキソビボ及び／又はインビボ適用のための送達に最適なサイズの粒子が提供される。特定の好ましい実施形態において、粒子寸法(例えば、直径)の特徴付けは、動的レーザー散乱法(DLS)を用いた計測に基づく。粒子、その作製及び使用方法並びにその計測に関して、米国特許第8,709,843号明細書；米国特許第6,007,845号明細書；米国特許第5,855,913号明細書；米国特許第5,985,309号明細書；米国特許第5,543,158号明細書；及びJames E. Dahlman and Carmen Barnes et al. Nature Nanotechnology (2014) published online 11 May 2014, doi:10.1038/nnano.2014.84による発表が挙げられる。Dahlman et al. "Orthogonal gene control with a catalytically active Cas9 nuclease", Nature Biotechnology 33, 1159-1161 (November, 2015)も参照されたい。

【0448】

本発明の範囲内の粒子送達系は、限定はされないが、固体、半固体、エマルション又はコロイド粒子を含め、任意の形態で提供され得る。従って、限定はされないが、例えば脂質ベースのシステム、リボソーム、ミセル、微小胞、エキソソーム又は遺伝子銃を含め、

本明細書に記載される送達系の任意のものが、本発明の範囲内の粒子送達系として提供され得る。

【0449】

粒子

Cas13b mRNA及びガイドRNA又はcrRNAは、粒子又は脂質エンベロープを使用して同時に送達し得る。例えば、本発明のCRISPR酵素及びRNA（例えば、複合体としての）は、7C1など、Dahlman et al., 国際公開第2015089419 A2号パンフレット及びその引用文献にあるとおりの粒子によって送達することができ（例えば、James E. Dahlman and Carmen Barnes et al. Nature Nanotechnology (2014) published online 11 May 2014, doi:10.1038/nnano.2014.84を参照されたい）、例えば送達粒子は脂質又はリポイド及び親水性ポリマー、例えばカチオン性脂質及び親水性ポリマーを含み、例えば、カチオン性脂質には、1, 2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン（DOTAP）又は1, 2-ジテトラデカノイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン（DMPC）が含まれ、及び／又は親水性ポリマーには、エチレングリコール又はポリエチレングリコール（PEG）が含まれ、及び／又は粒子は、コレステロール（例えば、製剤1=DOTAP 100、DMPC 0、PEG 0、コレステロール 0；製剤番号2=DOTAP 90、DMPC 0、PEG 10、コレステロール 0；製剤番号3=DOTAP 90、DMPC 0、PEG 5、コレステロール 5からの粒子）を更に含み、粒子は効率的な多段階プロセスを用いて形成され、ここで、初めに、エフェクタータンパク質及びRNAを、例えば1:1モル比で、例えば室温で、例えば30分間、例えば無菌ヌクレアーゼフリー1×PBS中において共に混合し、及びそれとは別に、製剤に適用し得るとおりDOTAP、DMPC、PEG及びコレステロールをアルコール、例えば100%エタノール中に溶解し、及びこれらの2つの溶液を共に混合して、複合体を含有する粒子を形成する）。Cas13bエフェクタータンパク質mRNA及びガイドRNAは、粒子又は脂質エンベロープを使用して同時に送達し得る。このDahlman et al.の技術は、本発明に適用することができる。エポキシド改変脂質ポリマーを利用して本発明の核酸ターゲティング系を肺細胞、心血管細胞又は腎細胞に送達し得、しかしながら、当業者は、この系を他の標的器官への送達にも応用し得る。約0.05～約0.6mg/kgの範囲の投薬量が想定される。数日間又は数週間にわたる、合計投薬量を約2mg/kgとする投薬も想定される。例えば、Su X, Fricke J, Kavanagh DG, Irvine DJ (“In vitro and in vivo mRNA delivery using lipid-enveloped pH-responsive polymer nanoparticles” Mol Pharm. 2011 Jun 6; 8(3): 774-87. doi:10.1021/mp100390w. Epub 2011 Apr 1)は、ポリ(β-アミノエステル)(PBAE)コアがリン脂質二重層シェルによって被包された生分解性コア-シェル構造化粒子について記載している。これらはインビボmRNA送達のために開発された。pH応答性PBAE成分はエンドソーム破壊を促進するように選択される一方、脂質表面層はポリカチオンコアの毒性を最小限に抑えるように選択された。従って、これは本発明のRNAの送達に好ましい。

【0450】

一実施形態において、自己集合生体付着性ポリマーをベースとする粒子が企図され、これは、ペプチドの経口送達、ペプチドの静脈内送達及びペプチドの経鼻送達、脳への全てに適用し得る。疎水性薬物の経口吸収及び眼内送達など、他の実施形態も企図される。分子エンベロープ技術は、保護され且つ疾患部位に送達されるエンジニアリングされたポリマーエンベロープを含む（例えば、Mazza, M. et al. ACS Nano, 2013. 7(2): 1016-1026; Siew, A., et al. Mol Pharm, 2012. 9(1): 14-28; Lalatsa, A., et al. J Con

tr Rel, 2012. 161 (2) : 523-36; Lalatsa, A., et al., Mol Pharm, 2012. 9 (6) : 1665-80; Lalatsa, A., et al. Mol Pharm, 2012. 9 (6) : 1764-74; Garrett, N. L., et al. J Biophotonics, 2012. 5 (5-6) : 458-68; Garrett, N. L., et al. J Raman Spect, 2012. 43 (5) : 681-688; Ahmad, S., et al. J Royal Soc Interface 2010. 7 : S423-33; Uchegbu, I. F. Expert Opin Drug Deliv, 2006. 3 (5) : 629-40; Qu, X., et al. Biomacromolecules, 2006. 7 (12) : 3452-9及びUchegbu, I. F., et al. Int J Pharm, 2001. 224 : 185-199を参照されたい)。標的組織に応じて単回又は複数回用量での約5mg/kgの用量が企図される。

10

【0451】

粒子に関して、Alabi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Aug 6; 110 (32) : 12881-6; Zhang et al., Adv Mater. 2013 Sep 6; 25 (33) : 4641-5; Jiang et al., Nano Lett. 2013 Mar 13; 13 (3) : 1059-64; Karagiannis et al., ACS Nano. 2012 Oct 23; 6 (10) : 8484-7; Whitehead et al., ACS Nano. 2012 Aug 28; 6 (8) : 6922-9及びLee et al., Nat Nanotechnol. 2012 Jun 3; 7 (6) : 389-93も参照されたい。

20

【0452】

米国特許出願公開第20110293703号明細書は、リピドイド化合物に関し、同様にポリヌクレオチドの投与に特に有用であり、これは、本発明の核酸ターゲティング系の送達に適用し得る。一態様において、アミノアルコールリピドイド化合物が、細胞又は対象に送達される薬剤と組み合わせられて、マイクロパーティクル、ナノ粒子、リポソーム又はミセルを形成する。粒子、リポソーム又はミセルによって送達される薬剤は、気体、液体又は固体の形態であり得、及び薬剤はポリヌクレオチド、タンパク質、ペプチド又は小分子であり得る。アミノアルコール (amino alcohol) 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 (合成又は天然)、界面活性剤、コレステロール、炭水化物、タンパク質、脂質等と組み合わせられて粒子を形成し得る。次に、これらの粒子が任意選択で医薬賦形剤と組み合わせられて医薬組成物を形成し得る。米国特許出願公開第20110293703号明細書は、アミノアルコールリピドイド化合物を調製する方法も提供する。アミンの1つ以上の均等物をエポキシド末端化合物の1つ以上の均等物と好適な条件下で反応させると、本発明のアミノアルコールリピドイド化合物が形成される。特定の実施形態において、アミンの全てのアミノ基が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。他の実施形態において、アミンの全てのアミノ基がエポキシド末端化合物と完全には反応せずに第三級アミンを形成し、それによりアミノアルコールリピドイド化合物に第一級又は第二級アミンが生じる。これらの第一級又は第二級アミンはそのままにされるか、又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させ得る。当業者によって理解されるであろうとおり、アミンが過剰未満のエポキシド末端化合物と反応すると、様々な数の末端部を有する複数の異なるアミノアルコールリピドイド化合物が生じることになる。ある種のアミン類は2つのエポキシド由来化合物末端部で完全に官能化され得る一方、他の分子はエポキシド末端化合物末端部で完全には官能化されない。例えば、ジアミン又はポリアミンは、分子の様々なアミノ部分の1、2、3又は4つのエポキシド由来化合物末端部を含んで第一級、第二級及び第三級アミンを生じ得る。特定の実施形態において、全てのアミノ基が完全には官能化されない。特定の実施形態において、同じタイプのエポキシド末端化合物の2つが使用される。他の実施形態において、2つ以上の異なるエポキシド末端化合物が使用される。アミノアルコー

30

40

50

ルリピドイド化合物の合成は溶媒有り又は無しで実施され、及び合成は30～100℃、好ましくは約50～90℃の範囲の高温で実施され得る。調製されたアミノアルコールリピドイド化合物は、任意選択で、精製され得る。例えば、アミノアルコールリピドイド化合物の混合物を精製して、特定の数のエポキシド由来化合物末端部を有するアミノアルコールリピドイド化合物を得ることができる。又は混合物を精製して、特定の立体又は位置異性体を得ることができる。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）又は他のアルキル化剤を用いてもアルキル化され得、及び／又はそれらは、アシル化され得る。

【0453】

米国特許出願公開第20110293703号明細書は、本発明の方法によって調製されたアミノアルコールリピドイド化合物のライブラリも提供する。これらのアミノアルコールリピドイド化合物は、液体ハンドラー、ロボット、マイクロタイタープレート、コンピュータ等が関わるハイスループット技法を用いて調製され及び／又はスクリーニングされ得る。特定の実施形態において、アミノアルコールリピドイド化合物は、ポリヌクレオチド又は他の薬剤（例えば、タンパク質、ペプチド、小分子）を細胞にトランスフェクトする能力に関してスクリーニングされる。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用いて調製されたポリ（β-アミノアルコール）（PBAA）類のークラスに関する。本発明のPBAAは、コーティング（医療器具又はインプラントのフィルム又は多層フィルムコーティングなど）、添加剤、材料、賦形剤、生物付着防止剤、マイクロパターンニング剤及び細胞封入剤など、バイオテクノロジー及び生物医学的適用において用いられ得る。表面コーティングとして使用される場合、これらのPBAAは、インビトロ及びインビボの両方で、その化学構造に応じて様々なレベルの炎症を誘発した。この材料クラスの化学的多様性は大きいため、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可能であった。更に、これらのコーティングは、カルボキシル化ポリスチレンマイクロパーティクルの皮下移植後の炎症細胞の動員を低減し、且つ線維症を低減する。これらのポリマーを使用して、細胞封入用の高分子電解質複合体カプセルを形成し得る。本発明も、抗菌性コーティング、DNA又はsiRNA送達及び幹細胞組織工学など、他の多くの生物学的適用を有し得る。米国特許出願公開第20130302401号明細書の教示は、本発明の核酸ターゲティング系に適用し得る。

【0454】

別の実施形態において、脂質ナノ粒子（LNP）が企図される。抗トランスサイレチン低分子干渉RNAが脂質ナノ粒子に封入され、ヒトに送達されており（例えば、Coelet al., N Engl J Med 2013; 369: 819-29を参照されたい）、及びかかるシステムを本発明の核酸ターゲティング系に適合させて応用し得る。静脈内投与される約0.01～約1mg/kg体重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薬物投与が企図され、デキサメタゾン、アセトアミノフェン（acetaminophen）、ジフェンヒドラミン又はセチリジン及びラニチジンなどが企図される。4週間毎の5用量にわたる約0.3mg/kgの複数回用量も企図される。LNPは、siRNAの肝臓への送達に極めて有効であることが示されており（例えば、Taberner et al., Cancer Discovery, April 2013, Vol. 3, No. 4, pages 363-470を参照されたい）、従って核酸ターゲティングエフェクタータンパク質をコードするRNAの肝臓への送達に企図される。2週間毎に6mg/kgのLNPの約4用量の投薬量が企図され得る。Taberner et al. は、0.7mg/kgで投与するLNPの最初の2サイクル後に腫瘍退縮が観察され、及び6サイクルの終わりまでに患者がリンパ節転移の完全退縮及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用量後に完全奏効が得られ、26ヵ月間にわたって投与を受けた後も患者は寛解を保ったまま治療を完了した。VEGF経路阻害薬による先行治療後に進行していた、腎臓、肺及びリンパ節を含めた肝外疾患部位を有する2人のRCC患者は、約8～12ヵ月

間全ての部位で疾患の安定が得られ、及びPNET及び肝転移患者は18ヵ月間（36用量）にわたって延長試験を継続し、疾患は安定していた。しかしながら、LNPの電荷が考慮されなければならない。カチオン性脂質を負電荷脂質と組み合わせると、細胞内送達を促進する非二重層構造が誘導されるためである。荷電LNPは静脈内注射後に循環から急速に除去されるため、pKa値が7未満のイオン化可能なカチオン性脂質が開発された（例えば、Rosin et al, Molecular Therapy, vol. 19, no. 12, pages 1286-2200, Dec. 2011を参照されたい）。RNAなどの負電荷ポリマーは低pH値（例えば、pH4）でLNPに負荷することができ、ここで、イオン化可能な脂質は、正電荷を呈する。しかしながら、生理的pH値では、LNPは、より長い循環時間と適合する低い表面電荷を呈する。4種のイオン化可能なカチオン性脂質、即ち1, 2-ジリネオイル（dilinoil）-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-クト-N, N-ジメチル-3-アミノプロパン（DLinKDMA）及び1, 2-ジリノレイル-4-（2-ジメチルアミノエチル）-[1, 3]-ジオキソラン（DLinKC2-DMA）が着目されている。これらの脂質を含有するLNP siRNAシステムは、インビボで肝細胞において著しく異なる遺伝子サイレンシング特性を呈し、効力は、第VII因子遺伝子サイレンシングモデルを用いて系列DLinKC2-DMA>DLinKDMA>DLinDMA>>DLinDAPに従い様々であることが示されている（例えば、Rosin et al, Molecular Therapy, vol. 19, no. 12, pages 1286-2200, Dec. 2011を参照されたい）。LNP又はLNP中の又はそれに関連するCRISPR-Cas RNAの1µg/mlの投薬量が、特にDLinKC2-DMAを含有する製剤について企図され得る。

【0455】

LNP及びCRISPR Cas13b封入の調製は、Rosin et al, Molecular Therapy, vol. 19, no. 12, pages 1286-2200, Dec. 2011）を使用し及び／又は適合させ得る。カチオン性脂質1, 2-ジリネオイル（dilinoil）-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-クト-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-oxo-[2"-（メトキシポリエチレングリコール2000）サクシノイル]-1, 2-ジミリスチル-ス-グリコール（PEG-S-DMG）及びR-3-[(ω-メトキシ-ポリ（エチレングリコール）2000）カルバモイル]-1, 2-ジミリスチルオクスルプロピル（dimyristyloxylpropyl）-3-アミン（PEG-C-DMG）がTekmira Pharmaceuticals（Vancouver, Canada）によって供給又は合成され得る。コレステロールはSigma（St Louis, MO）から購入し得る。特定の核酸ターゲティング複合体（CRISPR-Cas）RNAは、DLinDAP、DLinDMA、DLinK-DMA及びDLinKC2-DMAを含有するLNPに封入し得る（40:10:40:10モル比のカチオン性脂質:DSPC:CHOL:PEG-S-DMG又はPEG-C-DMG）。必要な場合、0.2%SP-DiOC18（Invitrogen, Burlington, Canada）を取り入れて細胞取込み、細胞内送達及び体内分布を評価する。封入は、カチオン性脂質:DSPC:コレステロール:PEG-c-DMG（40:10:40:10モル比）で構成される脂質混合物をエタノール中に10mmol/lの最終脂質濃度となるように溶解することにより実施し得る。このエタノール脂質溶液を50mmol/lクエン酸塩、pH4.0に滴下して加えると、多層小胞が形成され、30%エタノールvol/volの最終濃度が生じ得る。エクストルーダ（Northern Lipids, Vancouver, Canada）を使用して2つの積み重ねた80nm Nucleporeポリカーボネ

ートフィルタで多層小胞を押し出した後、大きい単層小胞が形成され得る。封入は、30%エタノール vol/vol を含有する 50 mmol/l クエン酸塩、pH 4.0 中に 2 mg/ml の RNA を、押し出されて予め形成された大きい単層小胞に滴下して加え、0.06/1 wt/wt の最終 RNA/脂質重量比となるように常に混合しながら 31℃で30分間インキュベートすることにより達成し得る。Spectra/Por 2 再生セルロース透析膜を使用したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH 7.4 での16時間の透析によってエタノールの除去及び製剤化緩衝液の中和を実施した。粒径分布は NICOMP 370 粒径測定機、小胞/強度モード及びガウスフィッティング (Nicomp Particle Sizing, Santa Barbara, CA) を使用した動的光散乱によって決定し得る。3つ全ての LNP 系の粒径が直径約 70 nm であり得る。RNA 封入効率は、透析前及び透析後に収集した試料から VivaPureD MiniH カラム (Sartorius Stedim Biotech) を使用して遊離 RNA を除去することにより決定し得る。溶出した粒子から封入された RNA を抽出し、260 nm で定量化し得る。Wako Chemicals USA (Richmond, VA) からのコレステロール E 酵素アッセイを用いて小胞中のコレステロール含有量を計測することにより、RNA 対脂質比を決定した。本明細書における LNP 及び PEG 脂質の考察と併せて、PEG 化リポソーム又は LNP も同様に核酸ターゲティング系又はその構成成分の送達に好適である。大きい LNP の調製は、Rosin et al., Molecular Therapy, vol. 19, no. 12, pages 1286-2200, Dec. 2011 を使用し及び/又は応用し得る。エタノール中に DLinKC2-DMA、DSPC 及びコレステロールを 50:10:38.5 モル比で含有する脂質プレミックス溶液 (20.4 mg/ml 総脂質濃度) を調製し得る。酢酸ナトリウムを 0.75:1 (酢酸ナトリウム:DLinKC2-DMA) のモル比でこの脂質プレミックスに加え得る。続いて混合物を 1.85 容積のクエン酸塩緩衝液 (10 mmol/l、pH 3.0) と激しく攪拌しながら合わせることににより脂質を水和させると、35%エタノールを含有する水性緩衝液中でリポソームの自然形成が起こり得る。このリポソーム溶液を 37℃でインキュベートして、粒径を時間依存的に増加させ得る。インキュベーション中様々な時点でアリコートを取り出して、動的光散乱 (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) によってリポソームサイズの変化を調べ得る。所望の粒径に達したところで、総脂質の 3.5% の最終 PEG モル濃度が得られるようにリポソーム混合物に PEG 脂質水溶液 (ストック = 35% (vol/vol) エタノール中 10 mg/ml PEG-DMG) を加え得る。PEG-脂質を加えると、リポソームはそのサイズで、更なる成長が事実上クエンチされるはずである。次に、空のリポソームに約 1:10 (wt:wt) の RNA 対総脂質で RNA を加え、続いて 37℃で30分間インキュベートすると、負荷された LNP が形成され得る。続いてこの混合物を PBS で一晩透析し、0.45 µm シリンジフィルタでろ過し得る。

10

20

30

【0456】

球状核酸 (SNA (商標)) 構築物及び他の粒子 (特に金粒子) も、核酸ターゲティング系を意図した標的に送達する手段として企図される。多量のデータが、核酸機能化金粒子をベースとする AuraSense Therapeutics の球状核酸 (SNA (商標)) 構築物が有用であることを示している。

40

【0457】

本明細書の教示と併せて用い得る文献としては、Cutler et al., J. Am. Chem. Soc. 2011 133:9254-9257、Hao et al., Small. 2011 7:3158-3162、Zhang et al., ACS Nano. 2011 5:6962-6970、Cutler et al., J. Am. Chem. Soc. 2012 134:1376-1391、Young et al., Nano Lett. 2012 12:3867-71、Zheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012 109:11975-

50

80、Mirkin, Nanomedicine 2012 7:635-638 Zhang et al., J. Am. Chem. Soc. 2012 134:16488-1691、Weintraub, Nature 2013 495:S14-S16、Choi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013 110(19):7625-7630、Jensen et al., Sci. Transl. Med. 5, 209ra152 (2013) 及び Mirkin, et al., Small, 10:186-192 が挙げられる。

【0458】

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) ペプチドリガンドによってポリエチレンイミン (PEI) を PEG 化して、RNA を含む自己集合性粒子を構築し得る。この系は、例えば、インテグリンを発現する腫瘍新生血管系を標的化し、且つ血管内皮成長因子受容体-2 (VEGF R2) の発現を阻害して、それにより腫瘍血管新生を達成する siRNA を送達する手段として用いられている (例えば、Schiffellers et al., Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32, No. 19 を参照されたい)。ナノプレックスは、等容積のカチオン性ポリマーと核酸との水溶液を混合して 2~6 の範囲にわたって正味モル過剰のイオン化可能窒素 (ポリマー) 対リン酸 (核酸) を得ることにより調製し得る。カチオン性ポリマーと核酸との間の静電相互作用によって平均粒径分布が約 100 nm のポリプレックスが形成され、従ってここではナノプレックスと称された。Schiffellers et al. の自己集合性粒子での送達には、約 100~200 mg の投薬量の核酸ターゲティング複合体 RNA が想定される。

【0459】

Bartlett et al. (PNAS, September 25, 2007, vol. 104, no. 39) のナノプレックスも本発明に適用され得る。Bartlett et al. のナノプレックスは、等容積のカチオン性ポリマーと核酸との水溶液を混合して 2~6 の範囲にわたって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) を得ることにより調製される。カチオン性ポリマーと核酸との間の静電相互作用によって平均粒径分布が約 100 nm のポリプレックスが形成され、従ってここではナノプレックスと称された。Bartlett et al. の DOTA-siRNA は、以下のとおり合成された: 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-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-NHS エステル) を Macrocytics (Dallas, TX) から注文した。カーボネート緩衝液 (pH 9) 中 100 倍モル過剰の DOTA-NHS-エステルを有するアミン改変 RNA センス鎖を微量遠心管に加えた。室温で 4 時間攪拌することにより内容物を反応させた。DOTA-RNA センスコンジュゲートをエタノール沈殿させて、水中に再懸濁し、且つ非改変アンチセンス鎖とアニーリングさせることにより、DOTA-siRNA を得た。液体は、全て Chelex-100 (Bio-Rad, Hercules, CA) で前処理して微量金属の汚染が除去された。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り、Tf 標的及び非標的 siRNA 粒子を形成し得る。典型的には、3 (±) の電荷比及び 0.5 g/リットルの siRNA 濃度で水中に粒子が形成された。標的粒子の表面上にある 1 パーセントのアダマンタン-PEG 分子を Tf (アダマンタン-PEG-Tf) で改変した。注射用に 5% (wt/vol) グルコース担体溶液中に粒子を懸濁した。

【0460】

Davis et al. (Nature, Vol 464, 15 April 2010) は、標的粒子送達系を使用する RNA 臨床試験を行う (臨床試験登録番号 NCT00689065)。標準ケア療法に抵抗性の固形癌患者に対し 21 日間サイクルの 1、3、8 及び 10 日目に用量の標的粒子を 30 分間静脈内注入によって投与する。粒子は、(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) に会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) 標的リガンド、(3) 親水性ポリマー (生体液中でのナノ粒子の安定性を促進するために用いられるポリエチレングリコール (PEG))、及び(4) RRM2 の発現を低下させるように設計された siRNA (臨床で使用された配列は、以前は siR2B + 5 と称された) を含有する合成送達系を含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる。TFR は悪性細胞で上方制御されることが長く知られており、及び RRM2 は確立された抗癌標的である。これらの粒子 (臨床版は CALAA-01 と称される) は、非ヒト霊長類における複数回投与試験で良好に忍容されることが示されている。1 人の慢性骨髄性白血病患者に siRNA がリポソーム送達によって投与されているが、Davis et al. の臨床試験は、siRNA を標的送達系で全身送達して固形癌患者を治療する初期ヒト試験である。標的送達系がヒト腫瘍への機能性 siRNA の有効な送達を提供し得るかどうかを確かめるため、Davis et al. は、3 つの異なる投与コホートからの 3 人の患者の生検を調べた。患者 A、B 及び C、全員が転移性黒色腫を有し、それぞれ 18、24 及び 30 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-2}$ siRNA の CALAA-01 の投与を受けた。同程度の用量が本発明の核酸ターゲティング系にも企図され得る。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) に会合するように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) 標的リガンド及び/又は親水性ポリマー (例えば、生体液中での粒子の安定性を促進するために用いられるポリエチレングリコール (PEG)) を含有する粒子で達成され得る。

【0461】

本発明に関して、RNA ターゲティング複合体の 1 つ以上の構成成分、例えばその核酸ターゲティングエフェクター (Cas13b) タンパク質若しくは mRNA 又はガイド RNA 若しくは crRNA を粒子又は脂質エンベロープを用いて送達することが好ましい。他の送達系又はベクターを本発明の粒子の態様と併せて用い得る。本発明に包含される粒子は、例えば、固体粒子 (例えば、銀、金、鉄、チタンなどの金属)、非金属、脂質ベースの固体、ポリマー)、粒子の懸濁液又はこれらの組み合わせとして、種々の形態で提供され得る。金属、誘電体及び半導体粒子並びにハイブリッド構造 (例えば、コアシェル粒子) を調製し得る。半導体材料でできている粒子は、電子エネルギーレベルの量子化が起こるのに十分に小さい (典型的には 10 nm 未満) 場合、標識量子ドットでもあり得る。かかるナノスケール粒子は、生物医学的適用において薬物担体又は造影剤として用いられ、本発明における同様の目的に応用し得る。

【0462】

半固体及び軟質粒子が製造されており、本発明の範囲内にある。半固体の性質のプロトタイプ粒子がリポソームである。各種のリポソーム粒子が現在、抗癌薬及びワクチンの送達系として臨床で用いられている。一方の親水性の半体と他方の疎水性の半体とを有する粒子はヤヌス粒子と呼ばれ、特にエマルジョンを安定化させるのに有効である。ヤヌス粒子は水/油界面で自己集合して、固体界面活性剤としての役割を果たし得る。

【0463】

米国特許第 8,709,843 号明細書 (参照により本明細書に援用される) は、治療剤含有粒子を組織、細胞及び細胞内区画に標的化して送達するための薬物送達システムを提供する。本発明は、界面活性剤、親水性ポリマー又は脂質にコンジュゲートしたポリマーを含む標的粒子を提供する。米国特許第 6,007,845 号明細書 (参照により本明細書に援用される) は、多官能化合物を 1 つ以上の疎水性ポリマー及び 1 つ以上の親水性ポリマーと共有結合的に連結することにより形成されたマルチブロック共重合体のコアを有し、且つ生物学的に活性な材料を含有する粒子を提供する。米国特許第 5,855,913 号明細書 (参照により本明細書に援用される) は、肺系統への薬物送達のためその表面上に界面活性剤を取り込んだ、タップ密度が 0.4 g/cm^3 未満で平均直径が 5 μm ~ 30 μm の空気力学的に軽い粒子を有する粒子状組成物を提供する。米国特許第 5,985,309 号明細書 (参照により本明細書に援用される) は、界面活性剤及び/又は正電荷又は負電荷治療薬又は診断薬と肺系統への送達用の逆の電荷の荷電分子との親水性又は疎水性複合体を取り込んだ粒子を提供する。米国特許第 5,543,158 号明細書 (

参照により本明細書に援用される)は、生物学的に活性な材料を含有する生分解性固体コア及び表面上のポリ(アルキレングリコール)部分を有する生分解性注射用粒子を提供する。国際公開第2012135025号パンフレット(米国特許出願公開第20120251560号明細書としても公開されている)(参照により本明細書に援用される)は、コンジュゲート型ポリエチレンイミン(PEI)ポリマー及びコンジュゲート型アザ大環状分子(まとめて「コンジュゲート型リポマー」又は「リポマー」と称される)について記載している。特定の実施形態において、本明細書に記載のかかる方法及び材料、例えばコンジュゲート型リポマーを、インビトロ、エキソビボ及びインビボゲノム摂動を達成してタンパク質発現の改変を含めた遺伝子発現の改変を行うため核酸ターゲティング系のコンテキストで使用し得ることを想定し得る。

10

【0464】

エキソソーム

エキソソームは、RNA及びタンパク質を輸送する内因性のナノ小胞であり、これはRNAを脳及び他の標的器官に送達することができる。免疫原性を低下させるため、Alvarez-Erviti et al. (2011, Nat Biotechnol 29:341)はエキソソーム産生に自己由来の樹状細胞を使用した。ニューロン特異的RVGペプチドに融合したエキソソーム膜タンパク質Lamp2bを発現するように樹状細胞をエンジニアリングすることにより、脳への標的化が達成された。精製エキソソームに電気穿孔によって外因性RNAが負荷された。静脈内注射されるRVG標的化エキソソームが、GAPDH siRNAを脳内のニューロン、ミクログリア、オリゴデンドロサイトに特異的に送達し、特異的遺伝子ノックダウンが得られた。RVGエキソソームに予め曝露してもノックダウンは減弱しなかったと共に、他の組織における非特異的取込みは観察されなかった。アルツハイマー病の治療標的であるBACE1の強力なmRNA(60%)及びタンパク質(62%)ノックダウンにより、エキソソーム媒介siRNA送達の治療可能性が実証された。

20

【0465】

免疫学的に不活性なエキソソームのプールを得るため、Alvarez-Erviti et al. は、同種主要組織適合遺伝子複合体(MHC)ハプロタイプの近交系C57BL/6マウスから骨髓を採取した。未熟樹状細胞は、MHC-II及びCD86など、T細胞アクチベーターを欠くエキソソームを多量に産生するため、Alvarez-Erviti et al. は、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を有する樹状細胞を7日間選択した。翌日、十分に確立された超遠心法プロトコルを用いて培養上清からエキソソームを精製した。産生されたエキソソームは物理的に均一であり、粒子トラッキング解析(NTA)及び電子顕微鏡法によって決定したとき、分布サイズのピークが直径80nmであった。Alvarez-Erviti et al. は、 10^6 細胞当たり(タンパク質濃度に基づいて計測して)6~12µgのエキソソームを得た。次に、Alvarez-Erviti et al. は、ナノスケール適用に適合させた電気穿孔プロトコルを用いて改変エキソソームに外因性カーゴを負荷する可能性を調べた。ナノメートルスケールでの膜粒子に対する電気穿孔は十分に特徴付けられていないため、非特異的Cy5標識RNAを使用して電気穿孔プロトコルを経験的に最適化した。超遠心法及びエキソソームの溶解後に、封入されるRNAの量をアッセイした。400V及び125µFでの電気穿孔が最大のRNA保持をもたらし、以降の全ての実験でこれを使用した。Alvarez-Erviti et al. は、150µgのRVGエキソソームに封入された150µgの各BACE1 siRNAを正常C57BL/6マウスに投与し、4つの対照とノックダウン効率を比較した:未治療マウス、RVGエキソソームのみを注入したマウス、インビボカチオン性リポソーム試薬と複合体化したBACE1 siRNAを注入したマウス及びRVG-9R(siRNAに静電的に結合する9つのD-アルギニンとコンジュゲートしたRVGペプチド)と複合体化したBACE1 siRNAを注入したマウス。投与3日後に皮質組織試料を分析し、siRNA-RVG-9R治療マウス及びsiRNA RVGエキソソーム治療マウスの両方で有意なタンパク

30

40

50

質ノックダウン（45%、 $P < 0.05$ 、対62%、 $P < 0.01$ ）が観察され、BACE1 mRNAレベルの有意な低下がもたらされた（それぞれ66%±15%、 $P < 0.001$ 及び61%±13%、 $P < 0.01$ ）。更に、本出願人らは、RVG-エキソソーム治療動物においてアルツハイマー病におけるアミロイド斑の主要な構成成分である総β-アミロイド1-42レベルの有意な低下（55%、 $P < 0.05$ ）を実証した。観察された低下は、正常マウスでBACE1阻害薬の脳室内注射後に実証されたβ-アミロイド1-40の低下よりも大きかった。Alvarez-Erviti et al. はBACE1切断産物でcDNA末端の5'迅速増幅（RACE）を実施し、これは、siRNAによるRNAi媒介性ノックダウンのエビデンスを提供した。最後に、Alvarez-Erviti et al. は、IL-6、IP-10、TNFα及びIFN-α血清濃度を評価することにより、RNA-RVGエキソソームがインビボで免疫応答を誘導したかどうかを調べた。エキソソーム治療後、siRNA-RVG-9Rと対照的にsiRNA-トランスフェクション試薬治療と同様に全てのサイトカインにおける有意でない変化を記録し、これはIL-6分泌を強力に刺激したことから、エキソソーム治療の免疫学的に不活性なプロファイルが確認された。エキソソームがsiRNAの20%のみを封入することを所与とすれば、対応するレベルの免疫刺激なしに5分の1のsiRNAで同等のmRNAノックダウン及びより大きいタンパク質ノックダウンが達成されたため、RVG-エキソソームによる送達RVG-9R送達よりも効率的であるように見える。この実験は、RVG-エキソソーム技術の治療可能性を実証したものであり、これは潜在的に神経変性疾患に関連する遺伝子の長期サイレンシングに適している。Alvarez-Erviti et al. のエキソソーム送達系は、治療標的、特に神経変性疾患への本発明の核酸ターゲティング系の送達に適用し得る。約100~1000mgのRVGエキソソームに封入された約100~1000mgの核酸ターゲティング系の投薬量が本発明に企図され得る。

【0466】

El-Andalousi et al. (Nature Protocols 7, 2112-2126 (2012)) は、インビトロ及びインビボでのRNAの送達に利用される、培養細胞に由来するエキソソームを提供している。このプロトコルは、初めに、ペプチドリガンドと融合したエキソソームタンパク質を含む、発現ベクターのトランスフェクションによる標的エキソソームの作成を記載している。次に、El-Andalousi et al. は、トランスフェクト細胞上清からエキソソームをどのように精製し及び特徴付けるかを説明する。次に、El-Andalousi et al. は、RNAをエキソソームに負荷するために重要なステップを詳説する。最後に、El-Andalousi et al. は、どのようにエキソソームを使用してインビトロ及びマウス脳においてインビボでRNAを効率的に送達するかを概説する。エキソソーム媒介性RNA送達の見込まれた結果の例が機能アッセイによって評価され、イメージングも提供される。プロトコル全体は約3週間かかる。本発明に係る送達又は投与は、自己由来樹状細胞から産生されたエキソソームを使用して実施され得る。本明細書における教示から、これを本発明の実施において用いることができる。

【0467】

別の実施形態において、Wahlgren et al. (Nucleic Acid Research, 2012, Vol. 40, No. 17 e130) の血漿エキソソームが企図される。エキソソームは、樹状細胞（DC）、B細胞、T細胞、肥満細胞、上皮細胞及び腫瘍細胞を含めた多くの細胞型によって産生されるナノサイズの小胞（30~90nmサイズ）である。これらの小胞は後期エンドソームの内向きの出芽によって形成され、次に細胞膜との融合時に細胞外環境へと放出される。エキソソームは天然で細胞間にRNAを有するため、この特性は遺伝子療法に有用であり得ると共に、本開示から、本発明の実施に用いることができる。血漿からのエキソソームは、バフィーコートを経由して20分間遠心して血漿を単離し、続いて細胞上清を回収し、300gで10分間遠心して細胞を除去し、16500gで30分間遠心し、続いて0.22mmフィルタで

ろ過することにより調製することができる。120 000 gで70分間の超遠心によってエキソソームをベレット化する。エキソソームへのsiRNAの化学的トランスフェクションをRNAiヒト/マウススターターキット (Qiagen, Hilden, Germany) で製造者の指示に従い実施する。siRNAを100 ml PBSに2 mmol/mlの最終濃度で加える。HiPerFectトランスフェクション試薬を加えた後、混合物を室温で10分間インキュベートする。過剰なミセルを除去するため、アルデヒド/硫酸塩ラテックスビーズを使用してエキソソームを再単離する。エキソソームへの核酸ターゲティング系の化学的トランスフェクションをsiRNAと同様に行い得る。エキソソームを健常ドナーの末梢血から単離した単球及びリンパ球と共培養し得る。従って、核酸ターゲティング系を含有するエキソソームをヒトの単球及びリンパ球に導入し、且つヒトに自己再導入し得ることが企図され得る。従って、本発明に係る送達又は投与を、血漿エキソソームを用いて実施し得る。

【0468】

リボソーム

本発明に係る送達又は投与は、リボソームで実施することができる。リボソームは、内部の水性区画を取り囲む単層又は多重膜脂質二重層及び比較的不透過性の外側の親油性リン脂質二重層からなる球形の小胞構造である。リボソームは、生体適合性であり、非毒性であり、親水性及び親油性の両方の薬物分子を送達することができ、そのカーゴを血漿酵素による分解から保護し、且つ生体膜及び血液脳関門 (BBB) を越えてそのロードを輸送するため、薬物送達担体として大いに注目を集めてきた (例えば、レビューについては、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)。リボソームは、幾つかの異なるタイプの脂質から作製することができる。しかしながら、薬物担体としてのリボソームの作成には、リン脂質が最も一般的に用いられている。脂質薄膜が水溶液と混合されたときにリボソーム形成は自然に起こるが、また、ホモジナイザー、ソニケーター又は押出し装置を使用して振盪の形態の力を加えることによって促進し得る (例えば、レビューについては、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)。

【0469】

その構造及び特性を改変するため、リボソームに幾つかの他の添加剤を加え得る。例えば、リボソーム構造の安定化を促進するため及びリボソームの内部カーゴの漏出を防ぐため、リボソーム混合物にコレステロール又はスフィンゴミエリンのいずれかを加え得る。更に、リボソームは、水素化卵ホスファチジルコリン又は卵ホスファチジルコリン、コレステロール及びジセチルリン酸から調製され、その平均小胞サイズは約50及び100 nmに調整された (例えば、レビューについては、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)。リボソーム製剤は、主に、1, 2-ジステアロイル (distearoyl) -sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン (DSPC)、スフィンゴミエリン、卵ホスファチジルコリン及びモノシアログングリオシドなどの天然リン脂質及び脂質で構成され得る。この製剤はリン脂質のみでできているため、リボソーム製剤は多くの難題に直面しており、その1つが血漿中での不安定性である。これらの難題を解消しようとする幾つかの試みが、特に脂質膜の操作においてなされている。これらの試みの1つは、コレステロールの操作に着目するものであった。従来の製剤にコレステロールを加えると、封入された生物学的活性化合物が血漿又は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) 中に急速に放出されることが抑えられ、安定性が増す (例えば、レビューについては、Spuch and Nav

arro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Article ID 469679, 12 pages, 2011. doi:10.1155/2011/469679を参照されたい)。特に有利な実施形態において、トロイの木馬リボソーム（分子トロイの木馬としても知られる）が望ましく、<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2010/4/pdb.prot5407.long>においてプロトコルを参照し得る。これらの粒子は、トランス遺伝子を血管内注射後に脳全体に送達することが可能である。制約により拘束されるものではないが、特異抗体が表面にコンジュゲートした中性脂質粒子はエンドサイトーシスによって血液脳関門を通過することが可能であると考えられる。本出願人は、トロイの木馬リボソームを利用してCRISPR-Cas13b複合体を血管内注射によって脳に送達することを仮定し、これにより、胚を操作する必要なしに全脳トランスジェニック動物が実現し得る。リボソームでの生体内投与には、約1～5 gのDNA又はRNAが企図され得る。

【0470】

別の実施形態において、核酸ターゲティング系又はその構成成分は安定核酸脂質粒子（SNALP）などのリボソームで投与され得る（例えば、Morrissey et al., Nature Biotechnology, Vol. 23, No. 8, August 2005を参照されたい）。SNALPで標的化される特定の核酸ターゲティング系の毎日の約1、3又は5 mg/kgの静脈内注射が企図される。毎日の治療は約3日間にわたり、次に毎週、約5週間にわたり得る。別の実施形態において、特定の核酸ターゲティング系が封入されたSNALPの約1又は2.5 mg/kgの用量の静脈内注射による投与も企図される（例えば、Zimmerman et al., Nature Letters, Vol. 441, 4 May 2006を参照されたい）。SNALP製剤は、脂質3-N-[(wメトキシポリ(エチレングリコール)2000)カルバモイル]-1,2-ジミリスチルオキシプロピルアミン(PEG-C-DMA)、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン(DLiNDMA)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン(DSPC)及びコレステロールを2:40:10:48モルパーセント比で含有し得る（例えば、Zimmerman et al., Nature Letters, Vol. 441, 4 May 2006を参照されたい）。別の実施形態において、安定核酸脂質粒子(SNALP)は、高度に血管新生したHepG2由来肝腫瘍への分子の送達に有効であるが、血管新生が不十分なHCT-116由来肝腫瘍では有効でないことが分かっている（例えば、Li, Gene Therapy (2012) 19, 775-780を参照されたい）。SNALPリボソームは、DLiNDMA及びPEG-C-DMAをジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、コレステロール及びsiRNAと共に25:1脂質/siRNA比及び48/40/10/2モル比のコレステロール/DLiNDMA/DSPC/PEG-C-DMAを用いて製剤化することにより調製し得る。得られたSNALPリボソームは約80～100 nmサイズである。更に別の実施形態において、SNALPは、合成コレステロール(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)、ジバルミトイルホスファチジルコリン(Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA)、3-N-[(wメトキシポリ(エチレングリコール)2000)カルバモイル]-1,2-ジミリスチルオキシプロピルアミン(dimyrestyloxypropylamine)及びカチオン性1,2-ジリノレイルオキシ-3-N,N-ジメチルアミノアミノプロパンを含み得る（例えば、Geisbert et al., Lancet 2010; 375:1896-905を参照されたい）。例えば、ボーラス静脈内注入として投与される1用量当たり合計約2 mg/kgの核酸ターゲティング系の投薬量が企図され得る。更に別の実施形態において、SNALPは、合成コレステロール(Sigma-Aldrich)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン(DSPC; Avanti Polar Lipids Inc.)、PEG-cDMA及び1,2-ジリノレイルオキシ-3-(N; N-ジメチル)

10

20

30

40

50

アミノプロパン (DLinDMA) を含み得る (例えば、Judge, J. Clin. Invest. 119:661-673 (2009) を参照されたい)。インビボ研究に用いられる製剤は、約 9:1 の最終脂質/RNA 質量比を含み得る。

【0471】

RNA i ナノメディシンの安全性プロファイルが、Alnylam Pharmaceuticals の Barros and Gollub によってレビューされている (例えば、Advanced Drug Delivery Reviews 64 (2012) 1730-1737 を参照されたい)。安定核酸脂質粒子 (SNALP) は、4 つの異なる脂質 - 低 pH でカチオン性のイオン化可能な脂質 (DLinDMA)、中性ヘルパー脂質、コレステロール及び拡散性ポリエチレングリコール (PEG) - 脂質で構成される。この粒子は直径約 80 nm であり、生理的 pH で電荷的に中性である。製剤化時、イオン化可能な脂質が粒子形成の間に脂質をアニオン性 RNA と凝縮させる役割を果たす。漸進的に酸性になるエンドソーム条件下で正電荷のとき、イオン化可能な脂質は、SNALP とエンドソーム膜との融合も媒介し、細胞質中への RNA の放出を可能にする。PEG-脂質は粒子を安定化させ、製剤化時の凝集を低減し、続いて薬物動態特性を改善する中性の親水性外部を提供する。現在までに、RNA を有する SNALP 製剤を使用して 2 つの臨床プログラムが開始されている。Tekmira Pharmaceuticals は、最近、高 LDL コレステロールの成人ボランティアにおける SNALP-ApoB の第 I 相単回投与試験を完了した。ApoB は、主に肝臓及び空腸に発現し、VLDL 及び LDL のアセンブリ及び分泌に必須である。17 人の対象に単一用量の SNALP-ApoB が投与された (7 用量レベルにわたる用量漸増)。肝毒性 (前臨床試験に基づいて潜在的用量制限毒性として予想された) のエビデンスはなかった。(2 人中) 1 人の対象が最も高い用量で免疫系刺激と一致してインフルエンザ様症状を起こし、試験終了が決定された。Alnylam Pharmaceuticals も同様に ALN-TTR01 を進めており、これは上記に記載される SNALP 技術を用い、TTR アミロイドーシス (ATTR) の治療のため突然変異体及び野生型の両方の TTR の肝細胞産生を標的化する。3 つの ATTR 症候群が記載されている: 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 及び家族性アミロイド心筋症 (FAC) - 両方とも TTR の常染色体優性突然変異によって引き起こされ、及び野生型 TTR によって引き起こされる老人性全身性アミロイドーシス (SSA)。ALN-TTR01 のプラセボ対照単回用量漸増第 I 相試験が最近、ATTR 患者で完了した。ALN-TTR01 が 15 分間の静脈内注入として 31 人の患者に (23 人は試験薬物及び 8 人はプラセボ) 0.01~1.0 mg/kg の用量範囲内で (siRNA に基づく) 投与された。治療は良好に忍容され、肝機能検査値の重大な増加はなかった。 ≥ 0.4 mg/kg で 23 人中 3 人の患者に注入関連反応が認められた。全員が注入速度の減速に応答し、全員が試験を続行した。2 人の患者に 1 mg/kg の最も高い用量で血清サイトカイン IL-6、IP-10 及び IL-1ra の最小限且つ一過性の上昇が認められた (前臨床及び NHP 試験から予想されたとおり)。ALN-TTR01 の期待された薬力学的効果である血清 TTR の低下が 1 mg/kg で観察された。

【0472】

更に別の実施形態において、SNALP は、例えば、カチオン性脂質、DSPC、コレステロール及び PEG-脂質をエタノール中に例えばそれぞれ 40:10:40:10 のモル比で可溶化させることにより作製し得る (Semple et al., Nature Nanotechnology, Volume 28 Number 2 February 2010, pp. 172-177 を参照されたい)。水性緩衝液 (50 mM クエン酸塩、pH 4) にそれぞれ 30% (vol/vol) 及び 6.1 mg/ml の最終エタノール及び脂質濃度となるように混合しながら脂質混合物を加え、22℃で 2 分間平衡化させた後、押し出した。水和した脂質を、2 つの積み重ねた 80 nm 細孔径フィルタ (Nuclepore) で 22℃において Lipex Extruder (Northern Lipids) を使用して、動的光散乱分析によって決定したとき、70~90 nm の

小胞直径が観察されるまで押し出した。これには、概して1～3回のパスが必要であった。s i R N A (3 0 % エタノールを含有する 5 0 m M クエン酸塩、p H 4 水溶液中に可溶化した) を、予め平衡化した (3 5 ° C) 小胞に約 5 m l / 分の速度で混合しながら加えた。0. 0 6 (w t / w t) の最終目標 s i R N A / 脂質比に達した後、混合物を 3 5 ° C で更に 3 0 分間インキュベートして小胞再構築及び s i R N A の封入を可能にした。次に、エタノールを除去し、外部緩衝液を透析又はタンジェンシャルフローダイアフィльтраシヨンのいずれかによって P B S (1 5 5 m M N a C l 、 3 m M N a ₂ H P O ₄ 、 1 m M K H ₂ P O ₄ 、 p H 7. 5) と交換した。制御された段階的希釈方法プロセスを用いて s i R N A を S N A L P に封入した。K C 2 - S N A L P の脂質構成要素は、5 7. 1 : 7. 1 : 3 4. 3 : 1. 4 のモル比で用いられた D L i n - K C 2 - D M A (カチオン性脂質)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (D P P C ; A v a n t i P o l a r L i p i d s) 、合成コレステロール (S i g m a) 及び P E G - C - D M A であった。負荷粒子が形成されたところで、S N A L P を P B S で透析し、使用前に 0. 2 μ m フィルタで滅菌ろ過した。平均粒径は 7 5 ~ 8 5 n m であり、s i R N A の 9 0 ~ 9 5 % が脂質粒子内に封入された。インビボ試験に使用した製剤中の最終的な s i R N A / 脂質比は約 0. 1 5 (w t / w t) であった。使用直前に、第 V I I 因子 s i R N A を含有する L N P - s i R N A 系を滅菌 P B S 中に適切な濃度に希釈し、製剤を 1 0 m l / k g の合計容積で外側尾静脈から静脈内投与した。この方法及びこれらの送達系は、本発明の核酸ターゲティング系に当てはめることができる。

【0473】

他の脂質

アミノ脂質 2, 2 - ジリノレイル - 4 - ジメチルアミノエチル - [1, 3] - ジオキソラン (D L i n - K C 2 - D M A) などの他のカチオン性脂質を利用して、例えば S i R N A と同様に、核酸ターゲティング系又はその構成成分又はそれをコードする核酸分子を封入し得 (例えば、J a y a r a m a n , A n g e w . C h e m . I n t . E d . 2 0 1 2 , 5 1 , 8 5 2 9 - 8 5 3 3 を参照されたい)、従って本発明の実施に用い得る。以下の脂質組成を有する予め形成された小胞が企図され得る：アミノ脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C) 、コレステロール及び (R) - 2, 3 - ビス (オクタデシルオキシ) プロピル - 1 - (メトキシポリ (エチレングリコール) 2 0 0 0) プロピルカルバメート (P E G - 脂質) 、それぞれモル比 4 0 / 1 0 / 4 0 / 1 0 及び約 0. 0 5 (w / w) の F V I I s i R N A / 総脂質比。7 0 ~ 9 0 n m の範囲の狭い粒径分布及び 0. 1 1 ± 0. 0 4 の低い多分散性指数 (n = 5 6) が確実となるように、粒子を最大 3 回まで 8 0 n m 膜で押し出し、その後ガイド R N A に加えた。極めて強力なアミノ脂質 1 6 を含有する粒子を使用し得、ここで、4 つの脂質構成成分 1 6、D S P C、コレステロール及び P E G - 脂質のモル比 (5 0 / 1 0 / 3 8. 5 / 1. 5) は、インビボ活性を増強させるため更に最適化され得る。

【0474】

M i c h a e l S D K o r m a n n e t a l . (「マウスにおける化学的に改変された m R N A の送達後の治療用タンパク質の発現 (E x p r e s s i o n o f t h e r a p e u t i c p r o t e i n s a f t e r d e l i v e r y o f c h e m i c a l l y m o d i f i e d m R N A i n m i c e) : N a t u r e B i o t e c h n o l o g y , V o l u m e : 2 9 , P a g e s : 1 5 4 - 1 5 7 (2 0 1 1)) は、脂質エンベロープを用いた R N A の送達について記載している。脂質エンベロープの使用は本発明においても好ましい。

【0475】

別の実施形態では、脂質を本発明の R N A ターゲティング系 (C R I S P R - C a s 1 3 b 複合体、即ち c r R N A と複合体化された C a s 1 3 b) 又はその構成成分又はそれをコードする核酸分子と共に製剤化して、脂質ナノ粒子 (L N P) を形成し得る。脂質としては、限定はされないが、D L i n - K C 2 - D M A 4、C 1 2 - 2 0 0 及びコリピド (c o l i p i d) ジステロイルホスファチジルコリン (d i s t e r o y l p h o s p

h a t i d y l c h o l i n e)、コレステロールが挙げられ、且つPEG-DMGを、小胞自然形成手順を用いてsiRNAの代わりにRNAターゲティング系と共に製剤化し得る(例えば、Novobrantseva, Molecular Therapy-Nucleic Acids (2012) 1, e4; doi:10.1038/mtna.2011.3を参照されたい)。構成成分のモル比は約50/10/38.5/1.5 (DLin-KC2-DMA又はC12-200/ジステロイルホスファチジルコリン(disteroylphosphatidyl choline)/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及びC12-200脂質粒子(LNP)の場合、それぞれ約12:1及び9:1であり得る。製剤は、>90%の捕捉効率で約80nmの平均粒子直径を有し得る。3mg/kg用量が企図され得る。Tekmiraは、米国及び米国外に、LNP及びLNP製剤の様々な態様に関する約95のпатентファミリーのポートフォリオを有し(例えば、米国特許第7,982,027号明細書;同第7,799,565号明細書;同第8,058,069号明細書;同第8,283,333号明細書;同第7,901,708号明細書;同第7,745,651号明細書;同第7,803,397号明細書;同第8,101,741号明細書;同第8,188,263号明細書;同第7,915,399号明細書;同第8,236,943号明細書及び同第7,838,658号明細書及び欧州特許第1766035号明細書;同第1519714号明細書;同第1781593号明細書及び同第1664316号明細書を参照されたい)、これらは、全て本発明に使用及び/又は応用することができる。

10

20

【0476】

RNAターゲティング系又はその構成成分又はそれをコードする核酸分子は、タンパク質、タンパク質前駆体又は部分的又は完全にプロセシングされた形態のタンパク質又はタンパク質前駆体をコードし得る改変核酸分子を含む組成物の製剤の態様に関する米国特許出願公開第20130252281号明細書及び同第20130245107号明細書及び同第20130244279号明細書(Moderna Therapeuticsに譲渡された)に更に記載されるものなど、PLGAミクロスフェアに封入して送達し得る。製剤は、モル比50:10:38.5:1.5~3.0(カチオン性脂質:膜融合性脂質:コレステロール:PEG脂質)を有し得る。PEG脂質は、限定はされないが、PEG-c-DOMG、PEG-DMGから選択され得る。膜融合性脂質はDSPCであり得る。また、Schrum et al., Delivery and Formulation of Engineered Nucleic Acids、米国特許出願公開第20120251618号明細書も参照されたい。

30

【0477】

Nanomericsの技術は、低分子量疎水性薬物、ペプチド及び核酸ベースの治療薬(プラスミド、siRNA、miRNA)を含めた広範囲の治療薬に関するバイオアベイラビリティの難題に対処している。この技術が明らかな利点を実証している特定の投与経路には、経口経路、血液脳関門を越える輸送、固形腫瘍への送達並びに眼への送達が含まれる。例えば、Mazza et al., 2013, ACS Nano. 2013 Feb 26;7(2):1016-26;Uchegbu and Siew, 2013, J Pharm Sci. 102(2):305-10及びLalatsa et al., 2012, J Control Release. 2012 Jul 20;161(2):523-36を参照されたい。

40

【0478】

米国特許出願公開第20050019923号明細書は、ポリヌクレオチド分子、ペプチド及びポリペプチド及び/又は医薬品などの生理活性分子を哺乳類の体に送達するためのカチオン性デンドリマーについて記載している。デンドリマーは、生理活性分子の送達を例えば肝臓、脾臓、肺、腎臓又は心臓に(又は更に脳までも)標的化するのに好適である。デンドリマーは、単純な分岐単量体単位から段階的に調製される合成三次元巨大分子であり、その性質及び機能は容易に制御し、変化させることができる。デンドリマーは、

50

構成要素を多機能コアに（ダイバージェント合成手法）又は多機能コアに向かって（コンバージェント合成手法）反復的に加えることによって合成され、構成要素の三次元シェルを加える毎に、より高世代のデンドリマーの形成につながる。ポリプロピレンイミンデンドリマーはジアミノブタンコアから開始され、それに第一級アミンへのアクリロニトリルの二重マイケル付加によって2倍の数のアミノ基が加えられ、続いてニトリルが水素化される。この結果、アミノ基の倍増がもたらされる。ポリプロピレンイミンデンドリマーは100%プロトン化可能な窒素及び最大64個の末端アミノ基（第5世代、DAB 64）を含有する。プロトン化可能な基は、通常、中性pHでプロトンを受け取ることが可能なアミン基である。デンドリマーの遺伝子デリバリー剤としての使用は、大部分が、コンジュゲート単位としてそれぞれアミン／アミド又はN－P（O₂）Sの混合物を有するポリアミドアミン及び垂リン酸含有化合物の使用に着目したものであり、それより低い世代のポリプロピレンイミンデンドリマーの遺伝子送達への使用に関して報告がない。ポリプロピレンイミンデンドリマーも、周囲アミノ酸性基によって化学的に改変されたとき、薬物送達及びゲスト分子のそれらの封入のためのpH感受性制御放出系として研究されている。DNAを有するポリプロピレンイミンデンドリマーの細胞傷害性及び相互作用並びにDAB 64のトランスフェクション有効性も研究されている。米国特許出願公開第20050019923号明細書は、先行の報告に反して、ポリプロピレンイミンデンドリマーなどのカチオン性デンドリマーが、特異的標的化及び低毒性など、遺伝物質など、生理活性分子の標的化した送達において用いるのに好適な特性を示すという観察に基づく。加えて、カチオン性デンドリマーの誘導体も、生理活性分子の標的化された送達に好適な特性を示す。また、「カチオン性ポリアミンポリマー及びデンドリマーポリマーを含めた様々なポリマーは抗増殖活性を有することが示され、従って、新生物及び腫瘍、炎症性障害（自己免疫障害を含む）、乾癬及びアテローム性動脈硬化症など、望ましくない細胞増殖によって特徴付けられる障害の治療に有用であり得る。ポリマーは単独で活性薬剤として用いられ得るか、又は遺伝子療法用の薬物分子又は核酸など、他の治療剤の送達ビヒクルとして用いられ得る。そのような場合、ポリマー自体の固有の抗腫瘍活性が、送達される薬剤の活性を補完し得る」ことを開示するBioactive Polymers, 米国特許出願公開第20080267903号明細書も参照されたい。これらの特許公報の開示は、核酸ターゲティング系又はその構成成分又はそれをコードする核酸分子の送達に関する本明細書における教示と併せて用いられ得る。

【0479】

超荷電タンパク質

超荷電タンパク質は、異常に高い理論上の正味正電荷又は負電荷を有するエンジニアリングされた又は天然に存在するタンパク質のークラスであり、核酸ターゲティング系又はその構成成分又はそれをコードする核酸分子の送達に用いられ得る。超負電荷及び超正電荷の両方のタンパク質とも、熱的又は化学的に誘導される凝集に耐える著しい能力を呈する。超正電荷タンパク質は、哺乳類細胞に侵入することも可能である。プラスミドDNA、RNA又は他のタンパク質など、これらのタンパク質と関連付けるカーゴが、インビトロ及びインビボの両方でこれらの巨大分子を哺乳類細胞に機能的に送達することを可能にし得る。David Liuの研究室は、2007年に超荷電タンパク質の作成及び特徴付けを報告した（Lawrence et al., 2007, Journal of the American Chemical Society 129, 10110-10112）。

【0480】

哺乳類細胞へのRNA及びプラスミドDNAの非ウイルス性送達は、研究及び治療適用の両方に価値がある（Akin et al., 2010, Nat. Biotech. 26, 561-569）。精製+36 GFPタンパク質（又は他の超正電荷タンパク質）を適切な無血清培地中でRNAと混合して複合体化させた後、細胞に加える。この段階で血清を含めると、超荷電タンパク質－RNA複合体の形成が阻害され、治療の有効性が低下する。以下のプロトコルが種々の細胞株に有効であることが分かっている（McNa

ughton et al., 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 6111-6116。しかしながら、具体的な細胞株に対して手順を最適化するには、タンパク質及びRNAの用量を変化させるパイロット実験を行わなければならない)。

(1) 処理前日、48ウェルプレートに1ウェル当たり 1×10^5 細胞をプレーティングする。

(2) 処理当日、最終濃度200nMとなるように精製+36 GFPタンパク質を無血清培地中に希釈する。50nMの最終濃度となるようにRNAを加える。ボルテックスして混合し、室温で10分間インキュベートする。

(3) インキュベーション中、細胞から培地を吸引し、PBSで1回洗浄する。

(4) +36 GFP及びRNAのインキュベーション後、細胞にタンパク質-RNA複合体を加える。

(5) 細胞を複合体と共に37℃で4時間インキュベートする。

(6) インキュベーション後、培地を吸引し、20U/mLヘパリンPBSで3回洗浄する。細胞を血清含有培地と共に、活性に関するアッセイに応じて更に48時間又はそれを超えてインキュベートする。

(7) 免疫ブロット、qPCR、表現型アッセイ又は他の適切な方法によって細胞を分析する。

【0481】

+36 GFPは、様々な細胞において有効なプラスミド送達試薬であることが分かった。また、例えば、McNaughton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 6111-6116 (2009); Cronican et al., ACS Chemical Biology 5, 747-752 (2010); Cronican et al., Chemistry & Biology 18, 833-838 (2011); Thompson et al., Methods in Enzymology 503, 293-319 (2012); Thompson, D. B., et al., Chemistry & Biology 19 (7), 831-843 (2012)も参照されたい。超荷電タンパク質の方法は、本発明のRNAターゲティング系又はその構成成分又はそれをコードする核酸分子の送達に使用及び／又は応用することができる。

【0482】

細胞透過性ペプチド (CPP)

更に別の実施形態において、CRISPR Cas系の送達に細胞透過性ペプチド (CPP) が企図される。CPPは、(ナノサイズ粒子から化学的小分子及び大型DNA断片に至るまでの) 様々な分子カーゴの細胞取込みを促進する短鎖ペプチドである。用語「カーゴ」は、本明細書で使用されるとき、限定はされないが、治療剤、診断プローブ、ペプチド、核酸、アンチセンスオリゴヌクレオチド、プラスミド、タンパク質、ナノ粒子を含めた粒子、リボソーム、発色団、小分子及び放射性物質からなる群を含む。本発明の態様では、カーゴには、CRISPR Cas系の任意の構成成分又は機能性CRISPR Cas系全体も含まれ得る。本発明の態様は、所望のカーゴを対象に送達する方法を更に提供し、この方法は、(a) 本発明の細胞透過性ペプチドと所望のカーゴとを含む複合体を調製するステップ、及び(b) 複合体を対象に経口的に、関節内に、腹腔内に、くも膜下腔内に、動脈内に (intrarterially)、鼻腔内に、実質内に、皮下に、筋肉内に、静脈内に、経皮的に、直腸内に又は局所的に投与するステップを含む。カーゴは、共有結合を介した化学的連結によるか又は非共有結合性の相互作用によるかのいずれかでペプチドと会合している。CPPの機能は、カーゴを細胞内に送達することであり、これは、一般的にはエンドサイトーシスを通じて起こるプロセスであって、カーゴは哺乳類生細胞のエンドソームに送達される。細胞透過性ペプチドのサイズ、アミノ酸配列及び電荷は様々であるが、全てのCPPが、細胞膜を移行し且つ細胞質又は細胞小器官への様々な分子カーゴの送達を促進する能力である1つの個別的な特徴を有する。CPPの移行

は3つの主な侵入機構に分類し得る：膜における直接の透過、エンドサイトーシスを介する侵入及び一過性構造の形成を通じた移行。CPPは、癌及びウイルス阻害薬並びに細胞標識用の造影剤を含め、種々の疾患の治療におけるドラッグデリバリー剤として医薬において多くの適用が見出されている。後者の例としては、GFP、MRI造影剤又は量子ドットの担体としての機能が挙げられる。CPPには、研究及び医薬に用いられるインビトロ及びインビボ送達ベクターとして大きい可能性がある。CPPのアミノ酸組成は、典型的には、リジン又はアルギニンなど正電荷アミノ酸の高い相対存在量を含むか、又は極性／荷電アミノ酸と非極性疎水性アミノ酸との交互のパターンを含む配列を有するかのいずれかである。これらの2つの構造タイプは、それぞれポリカチオン性又は両親媒性と称される。第3のCPPクラスは、非極性残基のみを含む疎水性ペプチドであり、これは正味電荷が低い又は細胞取込みに重要な疎水性アミノ酸基を有する。発見当初のCPPの1つはヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)由来のトランス活性化転写アクチベーター(Tat)であり、これは多数の培養下細胞型によって周囲の培地から効率的に取り込まれることが見出された。それ以降、既知のCPPの数は大幅に増え続け、より有効なタンパク質形質導入特性を有する小分子合成類似体が作成されている。CPPとしては、限定はされないが、ペネトラチン、Tat(48-60)、トランスポータン及び(R-Ahx-R4)(Ahx=アミノヘキサノイル)が挙げられる。

10

【0483】

米国特許第8,372,951号明細書は、高い細胞透過性効率及び低毒性を呈する好酸球カチオン性タンパク質(ECP)から送達されるCPPを提供する。CPPをそのカーゴで脊椎動物対象に送達する態様も提供されている。CPP及びそれらの送達の更なる態様は、米国特許第8,575,305号明細書；8；同第614,194号明細書及び同第8,044,019号明細書に記載されている。CPPはCRISPR-Cas系又はその構成成分の送達に使用することができる。CPPを用いてCRISPR-Cas系又はその構成成分を送達できることは、論稿“Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA”, Suresh Ramakrishna, Abu-Bonsrah Kwaku Dad, Jagadish Beloor, et al. Genome Res. 2014 Apr 2. [Epub ahead of print] (全体として参照により援用される)にも提供されており、ここで、CPPコンジュゲート組換えCas9タンパク質及びCPP複合体化ガイドRNAによる処理がヒト細胞株における内因性遺伝子破壊につながる実証されている。この論文では、Cas9タンパク質はチオエーテル結合によってCPPにコンジュゲートされた一方、ガイドRNAはCPPと複合体化され、縮合した正電荷粒子を形成した。胚性幹細胞、皮膚線維芽細胞、HEK293T細胞、HeLa細胞及び胚性癌腫細胞を含めたヒト細胞を改変Cas9及びガイドRNAで同時に及び逐次的に処理すると、プラスミドトランスフェクションと比べてオフターゲット突然変異が低下した効率的な遺伝子破壊につながったことが示された。本発明の実施では、CPP送達を用いることができる。

20

30

【0484】

植込み型デバイス

別の実施形態において、植込み型デバイスも、核酸ターゲティング系又はその構成成分又はそれをコードする核酸分子の送達に企図される。例えば、米国特許出願公開第20110195123号明細書は、薬物を局所的に長時間溶出する植込み型医療器具を、幾つかのタイプのかかるデバイス、治療の実装形態及び植え込み方法を含めて開示しており、それが提供される。デバイスは、例えば、デバイス本体として用いられるマトリックスなどのポリマー基質及び薬物並びに場合により金属又は更なるポリマーなどの追加的な足場材料及び可視性及びイメージングを増強する材料を含む。植込み型送達デバイスは局所的な長期間にわたる放出を提供するのに有利であり得、ここで、薬物は、腫瘍、炎症、変性などの罹患範囲の細胞外マトリックス(ECM)に直接又は症候性の対象のため、又は損

40

50

傷した平滑筋細胞に、又は予防のため放出される。薬物の一種は上記に開示されるとおりRNAであり、このシステムは本発明の核酸ターゲティング系に使用及び／又は応用することができる。一部の実施形態において植え込み方法は、小線源照射療法及び針生検を含め、現在他の治療向けに開発及び使用されている既存の植え込み手技である。そのような場合、本発明に記載される新規インプラントの寸法は、元のインプラントと同様である。典型的には、同じ治療手技中に数個のデバイスが植え込まれる。

【0485】

米国特許出願公開第20110195123号明細書は、例えば、任意選択でマトリックスであり得る生体安定性及び／又は分解性及び／又は生体吸収性ポリマー基質を含む、腹腔などの体腔及び／又は薬物送達システムが繫留されたり又は付着したりしない任意の他のタイプの投与に適用可能なシステムを含め、薬物送達植え込み型又は挿入型システムを提供する。用語「挿入」には植え込みも含まれることに留意しなければならない。薬物送達システムは、好ましくは米国特許出願公開第20110195123号明細書に記載されるとおりの「Loder」として植え込まれる。

10

【0486】

ポリマー又は複数のポリマーが生体適合性であり、薬剤及び／又は複数の薬剤を取り入れ、且つ制御された速度での薬剤の放出を可能にし、ここで、マトリックスなどのポリマー基質の総容積は、例えば、一部の実施形態では、任意選択で及び好ましくは、治療レベルの薬剤の放出を可能にする最大容積以下である。非限定的な例として、かかる容積は、薬剤負荷容積による必要に応じて好ましくは $0.1 \text{ m}^3 \sim 1000 \text{ mm}^3$ の範囲内である。Loderは、任意選択で、例えば及び限定なしに膝関節、子宮内又は子宮頸部リングなど、そのサイズが機能によって決まるデバイスで例えば取り込まれるとき、より大きいことができる。

20

【0487】

薬物送達システム（組成物を送達するための）は、一部の実施形態において、好ましくは分解性ポリマーを用いるように設計され、ここで、主な放出機構は、バルク侵食であるか、又は一部の実施形態において、非分解性の又は徐々に分解されるポリマーが使用され、ここで、主な放出機構は、バルク侵食よりむしろ拡散であり、従って外側部分が膜として機能し、及びその内側部分が、実質的に長期間にわたって（例えば、約1週間～約数ヵ月）周囲からの影響を受けない薬物リザーバとして機能する。異なる放出機構を有する異なるポリマーの組み合わせも任意選択で用いられ得る。表面の濃度勾配は、好ましくは相当な期間の全薬物放出期間にわたって事実上一定に維持され、従って拡散速度は事実上一定である（「ゼロモード」拡散と呼ばれる）。用語「一定」とは、好ましくは治療有効性の下限閾値より高く維持されるが、しかし、なおも任意選択で初期バーストを特徴とし得るか、及び／又は変動し得る、例えば一定限度増加及び減少し得る拡散速度が意味される。拡散速度は、好ましくは長期間そのように維持され、及び治療上有効な期間、例えば有効なサイレンシング期間を最適化するのに特定のレベルで一定であると見なすことができる。

30

【0488】

薬物送達システムは、本質的に化学的であるか、それとも酵素及び対象の体内にある他の因子からの攻撃に起因するかに関わらず、任意選択で及び好ましくは分解からヌクレオチドベースの治療剤を遮蔽するように設計される。

40

【0489】

米国特許出願公開第20110195123号明細書の薬物送達システムは、例えば、任意選択で、限定はされないが、熱的加熱及び冷却、レーザービーム及び集束超音波を含めた超音波及び／又はRF（高周波）による方法又はデバイスを含め、非侵襲性及び／又は最小侵襲性の起動及び／又は加速／速度方法によって任意選択でデバイスの植え込み時及び／又は植え込み後に動作させる検知及び／又は起動器具と関連付けられる。

【0490】

米国特許出願公開第20110195123号明細書の一部の実施形態によれば、局所

50

送達部位には、任意選択で、腫瘍、自己免疫疾患状態を含めた活性化及び／又は慢性的炎症及び感染、筋肉及び神経組織を含めた変性組織、慢性痛、変性部位及び骨折箇所及び組織の再生強化のための他の創傷箇所及び傷害された心筋、平滑筋及び横紋筋を含め、細胞の高度な異常増殖及び抑制されたアポトーシスによって特徴付けられる標的部位が含まれる。

【0491】

組成物の植込み部位又は標的部位は、好ましくは標的局所送達に十分に小さい半径、面積及び／又は容積を特徴とする。例えば、標的部位は、任意選択で、約0.1mm～約5cmの範囲の直径を有する。

【0492】

標的部位の位置は、好ましくは治療有効性を最大化するように選択される。例えば、薬物送達システム（任意選択で上記に記載したとおりの植込み用デバイスを伴う）の組成物は、任意選択で及び好ましくは、腫瘍環境又はそれに関連する血液供給の範囲内又はその近くに植え込まれる。

【0493】

例えば、組成物（任意選択でデバイスを伴う）は、任意選択で、脈管系の範囲内などでニップルを用いて膵臓、前立腺、乳房、肝臓の範囲内又はその近くに植え込まれる。

【0494】

標的の位置は、任意選択で、（任意選択で体内の任意の部位がLoderの植込みに好適であり得るように、あくまでも非限定的な例として）：1. 基底核、白質及び灰白質におけるパーキンソン病又はアルツハイマー病のような変性部位の脳；2. 筋萎縮性側索硬化症（ALS）の場合のような脊椎；3. HPV感染症予防のための子宮頸部；4. 活性化及び慢性的炎症関節；5. 乾癬の場合のような真皮；6. 鎮痛効果のための交感神経及び感覚神経部位；7. 骨内植え込み；8. 急性及び慢性感染部位；9. 腔内；10. 内耳－聴覚系、内耳の迷路、前庭系；11. 気管内；12. 心内；冠動脈、心外膜；13. 膀胱；14. 胆管系；15. 限定されないが、腎臓、肝臓、脾臓を含む実質組織；16. リンパ節；17. 唾液腺；18. 歯肉；19. 関節内（関節の中）；20. 眼内；21. 脳組織；22. 脳室；23. 腹腔を含む腔（例えば、限定されないが、卵巣癌について）；24. 食道内及び25. 直腸内を含むか、それらから本質的になるか、又はそれらからなる群から選択される。

【0495】

任意選択で、システム（例えば、組成物を含有するデバイス）の挿入は、標的部位及びその部位の近傍におけるECMへの材料の注射により、標的部位及びかかる部位の近傍の局所pH及び／又は温度及び／又はECMにおける薬物の拡散及び／又は薬物動態に影響を及ぼす他の生物学的因子に影響を及ぼすことを伴う。

【0496】

任意選択で、一部の実施形態によれば、前記薬剤の放出は、挿入前及び／又は挿入時及び／又は挿入後に、非侵襲性及び／又は最小侵襲性及び／又は他の起動及び／又は加速／減速方法、例えばレーザービーム、放射線照射、熱的加熱及び冷却及び集束超音波を含めた超音波及び／又はRF（高周波）方法又はデバイス及び化学的アクチベーターによって動作させるアプライアンスを検知及び／又は起動することを伴い得る。

【0497】

米国特許出願公開第20110195123号明細書の他の実施形態によれば、薬物は、好ましくは、例えば以下に記載するとおり乳房、膵臓、脳、腎臓、膀胱、肺及び前立腺における限局性の癌の場合、RNAを含む。RNAiで例示されるが、多くの薬物がLoderへの封入に適用可能であり、かかる薬物を、例えばマトリックスなど、Loder基質で封入することができる限り、本発明に関連して使用することができ、このシステムは本発明の核酸ターゲティング系の送達に使用及び／又は応用することができる。

【0498】

特定の適用の別の例として、異常な遺伝子発現に起因して神経及び筋肉変性疾患が発生

10

20

30

40

50

する。RNAの局所送達は、かかる異常な遺伝子発現に干渉する治療特性を有し得る。小薬物及び巨大分子を含めた抗アポトーシス、抗炎症性及び抗変性薬物の局所送達も場合により治療効果があり得る。そのような場合、L o d e r は、一定の速度での及び／又は別途植え込まれる専用のデバイスを介した長期放出に適用される。これは、全て本発明の核酸ターゲティング系に使用及び／又は応用することができる。

【0499】

特定の適用の更に別の例として、精神障害及び認知障害が遺伝子修飾薬で治療される。遺伝子ノックダウンは治療の選択肢である。薬剤を中枢神経系部位に局所的に送達するL o d e r は、限定はされないが、精神病、双極性疾患、神経症性障害及び行動疾患を含めた精神障害及び認知障害に対する治療選択肢である。L o d e r は、特定の脳部位における植込み時に小薬物及び巨大分子を含めた薬物を局所的に送達することもできる。これは、全て本発明の核酸ターゲティング系に使用及び／又は応用することができる。

10

【0500】

特定の適用の別の例として、局所部位における自然及び／又は適応免疫メディエーターのサイレンシングにより、移植臓器拒絶反応の予防が可能となる。移植臓器及び／又は移植部位に植え込まれたL o d e r によるRNA及び免疫調節試薬の局所送達が、移植臓器に対して活性化したCD8などの免疫細胞を撃退することにより局所免疫抑制を与える。これは、全て本発明の核酸ターゲティング系に使用及び／又は応用することができる。

【0501】

特定の適用の別の例として、VEGF及びアングリオゲニンなどを含む血管成長因子は、血管新生に不可欠である。因子、ペプチド、ペプチド模倣体の局所送達又はそれらのリプレッサーの抑制は、重要な治療モダリティである。L o d e r によるリプレッサーのサイレンシング並びに血管新生を刺激する因子、ペプチド、巨大分子及び小薬物の局所送達は、末梢、全身及び心血管疾患に治療効果がある。

20

【0502】

植込みなどの挿入方法は、任意選択で、かかる方法において任意選択で改変なしに又は代わりに任意選択で重要でない改変のみを伴い、他のタイプの組織移植及び／又は挿入及び／又は組織試料採取に既に用いられているものであり得る。かかる方法としては、任意選択で、限定はされないが、小線源照射療法、生検、ERCPなど、超音波を伴う及び／又は伴わない内視鏡検査、脳組織への定位的方法、関節、腹部器官、膀胱壁及び体腔への腹腔鏡の植え込みを含む腹腔鏡検査が挙げられる。

30

【0503】

本明細書において考察される植込み型デバイス技術は、本明細書における教示と共に用いることができ、従って本開示及び当該技術分野における知識により、CRISPR-Cas系又はその構成成分又は構成成分をコードするか又はそれを提供するその核酸分子を植込み型デバイスによって送達し得る。

【0504】

患者特異的スクリーニング方法

RNA、例えばトリヌクレオチドリピートを標的とする核酸ターゲティング系を使用して、かかるリピートの存在に関して患者又は患者の試料をスクリーニングすることができる。このリピートは核酸ターゲティング系のRNAの標的であることができ、その核酸ターゲティング系によるこのリピートへの結合がある場合、その結合を検出して、それによりかかるリピートの存在を示すことができる。従って、核酸ターゲティング系を使用して、リピートの存在に関して患者又は患者試料をスクリーニングすることができる。次に、患者に好適な化合物を投与して状態に対応し得るか、又は核酸ターゲティング系を投与して結合させ、挿入、欠失又は突然変異を生じさせて、状態を緩和し得る。

40

【0505】

本発明は、核酸を使用して標的RNA配列を結合する。

【0506】

CRISPRエフェクタータンパク質mRNA及びガイドRNA

50

C R I S P Rエフェクター (C a s 1 3 b) タンパク質又はそのm R N A (又はより一般的にはその核酸分子) 及びガイドR N A又はc r R N Aはまた、別々に、例えば前者がガイドR N A又はc r R N Aの投与の1～12時間前に(好ましくは約2～6時間前に)送達されるか又は一緒に送達され得る。ガイドR N A又はc r R N Aの第2のブースター用量を初回投与の1～12時間後に(好ましくは約2～6時間後に)投与することができる。

【0507】

C a s 1 3 bエフェクタータンパク質は、時に本明細書においてC R I S P Rエフェクタータンパク質と称される。エフェクタータンパク質は酵素をベースとし又はそれに由来し、従って一部の実施形態において用語「エフェクタータンパク質」は必ず「酵素」を含むことが理解されるであろう。しかしながら、また、エフェクタータンパク質は、一部の実施形態において必要に応じてD N A又はR N A結合を有し得るが、デッドC a sエフェクタータンパク質機能を含め、必ずしも切断又はニッキング活性を有するとは限らないことも理解されるであろう。

【0508】

細胞標的としては、造血幹／前駆細胞(C D 3 4+)、ヒトT細胞及び眼(網膜細胞) — 例えば、光受容前駆細胞が挙げられる。

【0509】

本発明の方法は、鋳型の送達を更に含むことができる。鋳型の送達は、C R I S P Rエフェクタータンパク質(C a s 1 3 b)、又はガイド、又はc r R N Aの一部又は全部の送達と同時又は別個によるものであり得、且つ同じ又は異なる送達機構によるものであり得る。

【0510】

誘導性系

一部の実施形態では、C R I S P Rエフェクター(C a s 1 3 b)タンパク質は、誘導性系の一成分を形成し得る。この系の誘導可能な性質により、エネルギーの形態を用いた遺伝子編集又は遺伝子発現の時空間的制御が可能となり得る。エネルギーの形態としては、限定はされないが、電磁放射線、音響エネルギー、化学エネルギー及び熱エネルギーを挙げることができる。誘導性系の例には、テトラサイクリン誘導性プロモーター(T e t - O n又はT e t - O f f)、小分子2ハイブリッド転写活性化システム(F K B P、A B A等)又は光誘導性系(フィトクロム、L O Vドメイン又はクリプトクロム)が含まれる。一実施形態において、C R I S P Rエフェクタータンパク質は、配列特異的に転写活性の変化を導く光誘導性転写エフェクター(L I T E)の一部であり得る。光の構成成分には、C R I S P Rエフェクタータンパク質、光応答性シトクロムヘテロ二量体(例えば、シロイヌナズナ(A r a b i d o p s i s t h a l i a n a)由来)及び転写活性化／抑制ドメインが含まれ得る。誘導性D N A結合タンパク質及びその使用方法の更なる例は、米国仮特許出願第61／736465号明細書及び米国仮特許出願第61／721, 283号明細書及び国際公開第2014018423 A2号パンフレット(本明細書によって全体として参照により援用される)に提供される。

【0511】

自己不活性化系

細胞内のR N Aの全てのコピーが編集された後、もはやその細胞においてC a s 1 3 bエフェクタータンパク質発現又は活性が続行する必要はない。ガイド標的配列としてC a s 1 3 bに関するR N A又はc r R N Aの使用に依存する自己不活性化系は、C a s 1 3 bの発現又は複合体形成を妨げることにより、その系を停止させることができる。

【0512】

キット

ある態様において、本発明は、上記の方法及び組成物に開示される要素の任意の1つ以上を含むキットを提供する。一部の実施形態において、本キットは、本明細書に教示されるとおりのベクター系又は本明細書に教示されるとおりのC R I S P R／C a s 1 3 b系

10

20

30

40

50

若しくは複合体の構成成分の1つ以上、例えばc r R N A及び／若しくはC a s 1 3 b エフェクタータンパク質又はC a s 1 3 b エフェクタータンパク質をコードするm R N A など、及びキットの使用説明書を含む。要素は、個々に又は組み合わせで提供され得、且つ任意の好適な容器、例えばバイアル、ボトル又はチューブに提供され得る。一部の実施形態において、本キットは、1つ以上の言語、例えば2つ以上の言語による説明書を含む。説明書は、本明細書に記載される適用及び方法に特異的であり得る。一部の実施形態において、キットは、本明細書に記載される要素の1つ以上を利用するプロセスで使用するための1つ以上の試薬を含む。試薬は、任意の好適な容器中に提供され得る。例えば、キットは、1つ以上の反応又は保存緩衝液を提供し得る。試薬は、特定のアッセイで使用可能な形態で提供され得るか、又は使用前に1つ以上の他の構成成分の添加が必要な形態（例えば、濃縮形態又は凍結乾燥形態）で提供され得る。緩衝液は、限定はされないが、炭酸ナトリウム緩衝液、重炭酸ナトリウム緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、トリス緩衝液、M O P S 緩衝液、H E P E S 緩衝液及びこれらの組み合わせを含めた任意の緩衝液であり得る。一部の実施形態において、緩衝液は、アルカリ性である。一部の実施形態において、緩衝液は、p H が約7～約10である。一部の実施形態において、本キットは、ガイド又はc r R N A 配列と調節エレメントとを作動可能に連結するためベクターに挿入されるガイド配列に対応する1つ以上のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、本キットは、相同組換え鋳型ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、本キットは、本明細書に記載されるベクターの1つ以上及び／又はポリヌクレオチドの1つ以上を含む。本キットは、有利には、本発明の系の全てのエレメントを提供することが可能であり得る。

10

20

【0513】

本発明は、例えば、遺伝子療法、薬物スクリーニング、疾患診断及び予後判定において、広範な適用性を有する。

【0514】

用語「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」及び「オリゴヌクレオチド」は同義的に使用される。これらの用語は、デオキシリボヌクレオチドであれ又はリボヌクレオチドであれ、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチド又はその類似体を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有することができ、既知又は未知の任意の機能を果たし得る。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子又は遺伝子断片のコード領域又は非コード領域、連鎖解析によって定義される複数の遺伝子座（1つの遺伝子座）、エクソン、イントロン、メッセンジャーR N A（m R N A）、トランスファーR N A、リボソームR N A、低分子干渉R N A（s i R N A）、低分子ヘアピンR N A（s h R N A）、マイクロR N A（m i R N A）、リボザイム、c D N A、組換えポリヌクレオチド、分枝状ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離D N A、任意の配列の単離R N A、核酸プローブ及びプライマー。この用語は、合成骨格を有する核酸様構造も包含し、例えばE c k s t e i n, 1991; B a s e r g a e t a l., 1992; M i l l i g a n, 1993; 国際公開第97/03211号パンフレット; 国際公開第96/39154号パンフレット; M a t a, 1997; S t r a u s s - S o u k u p, 1997; 及びS a m s t a g, 1996を参照されたい。ポリヌクレオチドは、1つ以上の改変ヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体を含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造の改変はポリマーをアセンブルする前又はその後に付与することができる。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド構成成分で中断され得る。ポリヌクレオチドは、重合後に、標識構成成分とのコンジュゲーションによるなどして更に改変され得る。本明細書で使用されるとき、用語「野生型」は、当業者によって理解される当該技術分野の用語であり、突然変異体又は変異体形態とは区別されるものとして天然に存在するものとしての、典型的な形態の生物、菌株、遺伝子又は特徴を意味する。「野生型」はベースラインであり得る。本明細書で使用されるとき、用語「変異体」は、天然に存在するものから逸脱したパターンを有する質の呈示を意味するものと解釈されなければならない。用語「天然に存在しない」又は「エンジニ

30

40

50

アリングされた」は同義的に使用され、人間の手が加えられていることを示す。この用語は、核酸分子又はポリペプチドに言及するとき、核酸分子又はポリペプチドが、自然中ではそれと天然に結び付いている、且つ自然中に見られるとおりの少なくとも1つの他の構成成分を少なくとも実質的に含まないことを意味する「相補性」は、従来のワトソン・クリック塩基対合又は他の非従来型の対合のいずれかによって核酸が別の核酸配列と水素結合を形成する能力を指す。「相補性」は、従来のワトソン・クリック塩基対合又は他の非従来型のいずれかによって核酸が別の核酸配列と水素結合を形成する能力を指す。パーセント相補性は、核酸分子中で第2の核酸配列と水素結合を形成（例えば、ワトソン・クリック塩基対合）することのできる残基のパーセンテージを示す（例えば、10個のうちの5、6、7、8、9、10個は、それぞれ50%、60%、70%、80%、90%、100%の相補性である）。「完全に相補的」とは、核酸配列の全ての連続する残基が第2の核酸配列中の同じ数の連続する残基と水素結合することを意味する。「実質的に相補的」は、本明細書で使用されるとき、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド又はそれを超える領域にわたって少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%又は100%である相補性の程度を指すか、又はストリンジェントな条件下でハイブリダイズする2つの核酸を指す。本明細書で使用されるとき、ハイブリダイゼーションの「ストリンジェントな条件」とは、標的配列と相補性を有する核酸が標的配列に優先的にハイブリダイズし、且つ非標的配列とは実質的にハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、概して配列依存性であり、幾つもの要因に応じて異なる。一般に、配列が長いほど、配列がその標的配列に特異的にハイブリダイズする温度が高くなる。ストリンジェントな条件の非限定的な例が、Tijssen (1993), Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Part I, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay", Elsevier, N. Y. に詳述されている。ポリヌクレオチド配列に言及する場合、相補配列又は部分的相補配列も想定される。これらは、好ましくは、高度にストリンジェントな条件下で参照配列とハイブリダイズ可能なものである。概して、ハイブリダイゼーション速度を最大にするには、比較的低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件（熱融点（ T_m ）より約20～25℃低い）が選択される。 T_m は、特定の標的配列の50%が規定のイオン強度及びpHの溶液中で完全に相補的なプローブにハイブリダイズする温度である。概して、ハイブリダイズした配列の少なくとも約85%のヌクレオチド相補性を要求する場合、 T_m より約5～15℃低くなるよう高度にストリンジェントな洗浄条件が選択される。ハイブリダイズした配列の少なくとも約70%のヌクレオチド相補性を要求する場合、 T_m より約15～30℃低くなるよう中程度にストリンジェントな洗浄条件が選択される。高度に許容的な（極めて低いストリンジェンシーの）洗浄条件は T_m より50℃も低いものであり得、ハイブリダイズした配列間に高レベルのミスマッチが許容される。当業者は、ハイブリダイゼーション段階及び洗浄段階における他の物理的及び化学的パラメータも、標的配列とプローブ配列との間の特定の相同性レベルからの検出可能なハイブリダイゼーションシグナルの結果に影響を与えるよう変更し得ることを認識するであろう。好ましい高度にストリンジェントな条件は、50%ホルムアミド、5×SSC及び1% SDS中42℃でのインキュベーション又は5×SSC及び1% SDS中65℃でのインキュベーションと、0.2×SSC及び0.1% SDS中65℃での洗浄を含む。「ハイブリダイゼーション」とは、1つ以上のポリヌクレオチドが反応することによりヌクレオチド残基の塩基間の水素結合によって安定した複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対合、フーグステイン（Hoogsteen）結合によるか、又は任意の他の配列特異的様式で起こり得る。複合体には、二重鎖構造を形成する2本

の鎖、多重鎖複合体を形成する3本以上の鎖、単一の自己ハイブリダイズ鎖又はこれらの任意の組み合わせが含まれ得る。ハイブリダイゼーション反応は、PCRの開始又は酵素によるポリヌクレオチドの切断など、より大規模なプロセスで一ステップを構成し得る。所与の配列とハイブリダイズ可能な配列は、その所与の配列の「相補体」と称される。本明細書で使用されるとき、用語「ゲノム遺伝子座」又は「遺伝子座 (locus)」(複数形 loci) は、染色体上の遺伝子又はDNA配列の特定の位置である。「遺伝子」は、ポリペプチドをコードする一続きのDNA若しくはRNA又は生物において機能的役割を果たし、従って生体における分子的遺伝単位であるRNA鎖を指す。本発明の目的上、遺伝子は、遺伝子産物の産生を調節する領域を含むと(かかる調節配列がコード配列及び/又は転写配列に隣接しているか否かに関わらず) 見なし得る。従って、遺伝子には、必ずしも限定されないが、プロモーター配列、ターミネーター、リボソーム結合部位及び配列内リボソーム進入部位などの翻訳調節配列、エンハンサー、サイレンサー、インスレーター、境界エレメント、複製起点、マトリックス付着部位及び遺伝子座制御領域が含まれる。本明細書で使用されるとき、「ゲノム遺伝子座の発現」又は「遺伝子発現」は、機能的遺伝子産物の合成に遺伝子からの情報が用いられる過程である。遺伝子発現の産物は、多くの場合にタンパク質であるが、rRNA遺伝子又はtRNA遺伝子などの非タンパク質コード遺伝子では、産物は機能性RNAである。遺伝子発現の過程は、あらゆる既知の生命 - 真核生物(多細胞生物を含む)、原核生物(細菌及び古細菌)及びウイルスによって生存のための機能性産物の産生に用いられている。本明細書で使用されるとき、遺伝子又は核酸の「発現」には、細胞遺伝子発現のみならず、クローニング系及び任意の他のコンテキストにおける核酸の転写及び翻訳も包含される。本明細書で使用されるとき、「発現」は、ポリヌクレオチドがDNA鋳型から(mRNA又は他のRNA転写物などに) 転写される過程及び/又は転写されたmRNAが続いてペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に翻訳される過程も指す。転写物及びコードされたポリペプチドは、まとめて「遺伝子産物」と称される。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現には真核細胞におけるmRNAのスプライシングが含まれ得る。用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書では、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指して同義的に使用される。ポリマーは線状又は分枝状であり得、それは修飾アミノ酸を含み得、及びそれは非アミノ酸が割り込み得る。これらの用語は、改変されているアミノ酸ポリマー(例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化又は他に任意の、標識成分とのコンジュゲーションなどの操作) も包含する。本明細書で使用されるとき、用語「アミノ酸」には、グリシン及びD又はLの両方の光学異性体及びアミノ酸類似体及びペプチド模倣体を含め、天然及び/又は非天然又は合成のアミノ酸が含まれる。本明細書で使用されるとき、用語「ドメイン」又は「タンパク質ドメイン」は、タンパク質配列のうち、残りのタンパク質鎖と独立に存在し及び機能し得る一部分を指す。本発明の態様に記載されるとおり、配列同一性は配列相同性と関係する。相同性比較は目測で行われ得るか、又はより通例では、容易に利用可能な配列比較プログラムを用いて行われ得る。これらの市販のコンピュータプログラムは、2つ以上の配列間のパーセント(%) 相同性を計算することができ、また2つ以上のアミノ酸配列又は核酸配列が共有する配列同一性も計算することができる。

【0515】

本明細書で使用されるとき、用語「野生型」は、当業者によって理解される当該技術分野の用語であり、突然変異体又は変異体の形態とは区別されるものとして天然に存在するとおりの、典型的な形態の生物、菌株、遺伝子又は特徴を意味する。「野生型」はベースラインであり得る。

【0516】

本明細書で使用されるとき、用語「変異体」は、天然に存在するものから逸脱したパターンを有する質の呈示を意味するものと解釈されなければならない。用語「天然に存在しない」又は「エンジニアリングされた」は同義的に使用され、人間の手が加えられていることを示す。この用語は、核酸分子又はポリペプチドに言及しているとき、核酸分子又は

10

20

30

40

50

ポリペプチドが、自然中ではそれと天然に結び付いている、且つ自然中に見られるとおりの少なくとも1つの他の構成成分を少なくとも実質的に含まないことを意味する。これらの用語を含むか否かに関わらず、あらゆる態様及び実施形態において、好ましくは、それは、任意選択であり得、従って好ましくは含まれるか、又は含まれないことは、好ましくないことが理解されるであろう。更に、用語「天然に存在しない」及び「エンジニアリングされた」は同義的に用いられ得、そのため、従って単独で又は組み合わせで用いることができ、いずれか一方を両方とも併せた記述に置き換え得る。詳細には、「天然に存在しない」又は「天然に存在しない及び／又はエンジニアリングされた」の代わりに「エンジニアリングされた」が好ましい。

【0517】

配列相同性は、当該技術分野において公知の幾つものコンピュータプログラムのいずれか、例えばBLAST又はFASTAなどによって求めることができる。かかるアラインメントの実施に好適なコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Best fit パッケージ (University of Wisconsin, U. S. A; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387) である。配列の比較を行うことができる他のソフトウェアの例としては、限定はされないが、BLAST パッケージ (Ausubel et al., 1999 前掲 - Chapter 18を参照されたい)、FASTA (Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410) 及び比較ツールのGENEWORKSスイートが挙げられる。BLAST及びFASTAは、いずれもオフライン及びオンライン検索が利用可能である (Ausubel et al., 1999 前掲, 7-58~7-60頁を参照されたい)。しかしながら、GCG Best fit プログラムを使用することが好ましい。パーセンテージ (%) 配列相同性は連続配列に関して計算され得、即ち一方の配列を他方の配列とアラインメントして、一方の配列の各アミノ酸又はヌクレオチドが他方の配列の対応するアミノ酸又はヌクレオチドと1残基ずつ直接比較される。これは「ギャップなし」アラインメントと呼ばれる。かかるギャップなしアラインメントは比較的少数の残基にのみ行われる。これは極めて単純で一貫した方法であるが、例えば本来は同一の配列ペアにおいて、1つの挿入又は欠失があるために以降のアミノ酸残基がアラインメントから外れる点を考慮に入れることができず、従って大域的アラインメントを行うと潜在的に%相同性が大きく低下し得る。結果的に、ほとんどの配列比較法は、全体的な相同性又は同一性スコアに過度のペナルティーを与えることなく、可能性のある挿入又は欠失を考慮に入れる最適アラインメントを生成するように設計される。これは、局所的な相同性又は同一性を最大化しようと配列アラインメントに「ギャップ」を挿入することによって達成される。しかしながら、これらの複雑性の高い方法は、アラインメント内に出現する各ギャップに「ギャップペナルティー」を割り当てるため、同数の同一アミノ酸について、ギャップが可能な限り少ない配列アラインメント (2つの比較される配列間の高い関連性を反映する) の方が、ギャップの多い配列よりも高いスコアを達成し得る。典型的には、あるギャップの存在に比較的高いコストを課し、且つそのギャップにおけるそれぞれの後続残基のペナルティーを小さくする「アフィニティギャップコスト」が用いられる。これが、最も一般的に用いられているギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティーは、当然ながらギャップがより少ない最適化されたアラインメントを生成し得る。多くのアラインメントプログラムで、ギャップペナルティーを変更することが可能である。しかしながら、配列比較にかかるソフトウェアを使用する場合、デフォルト値を使用することが好ましい。例えば、GCG Wisconsin Best fit パッケージを使用する場合、アミノ酸配列のデフォルトのギャップペナルティーは、ギャップが-12で各伸長が-4である。従って、最大%相同性の計算には、初めにギャップペナルティーを考慮して最適アラインメントを生成する必要がある。かかるアラインメントの実行に好適なコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Best fit パッケージ (Devereux et al., 1984 Nuc. Acids Research 12 p387) である。配列の比較を

10

20

30

40

50

行うことができる他のソフトウェアの例としては、限定はされないが、BLASTパッケージ (Ausubel et al., 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. - Chapter 18を参照されたい)、FASTA (Altschul et al., 1990 J. Mol. Biol. 403-410) 及び比較ツールのGENEWORKSスイートが挙げられる。BLAST及びFASTAは、いずれもオフライン及びオンライン検索が利用可能である (Ausubel et al., 1999, Short Protocols in Molecular Biology, 7-58~7-60頁を参照されたい)。しかしながら、一部の適用には、GCG Bestfitプログラムを使用することが好ましい。BLAST 2 Sequencesと呼ばれる新規ツールもタンパク質及びヌクレオチド配列の比較に利用可能である (FEMS Microbiol Lett. 1999 174 (2): 247-50; FEMS Microbiol Lett. 1999 177 (1): 187-8 及び米国国立衛生研究所 (National Institutes for Health) のウェブサイトにある国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology information) のウェブサイトを参照されたい)。最終的な%相同性は同一性の点で計測され得るが、アラインメント過程自体は、典型的にはオール・オア・ナッシングのペア比較に基づくわけではない。代わりに、化学的類似性又は進化距離に基づき、各ペアワイズ比較にスコアを割り当てるスケーリング型類似性スコア行列が概して用いられる。一般的に用いられるかかる行列の例は、BLOSUM62行列 - BLASTプログラムスイートのデフォルト行列 - である。GCG Wisconsinプログラムは、概して公式のデフォルト値又は供給がある場合にはカスタムの記号比較テーブルのいずれかを使用する (更なる詳細については、ユーザマニュアルを参照されたい)。適用によっては、GCGパッケージについて公式のデフォルト値を使用するか、又は他のソフトウェアの場合、BLOSUM62などのデフォルト行列を使用することが好ましい。代わりに、パーセンテージ相同性は、CLUSTAL (Higgins DG&Sharp PM (1988), Gene 73 (1), 237-244) と同様のアルゴリズムに基づくDNASIS (商標) (Hitachi Software) の多重アラインメント機能を用いて計算し得る。ソフトウェアが最適アラインメントを生成すると、%相同性、好ましくは%配列同一性を計算することが可能になる。ソフトウェアは、典型的には配列比較の一部としてこれを行い、数値的な結果を出す。配列は、サイレントな変化を生じて機能的に均等な物質をもたらすようなアミノ酸残基の欠失、挿入又は置換も有し得る。アミノ酸特性 (残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性及び/又は両親媒性の性質など) の類似性に基づいて計画的なアミノ酸置換が作製され得、従ってアミノ酸を機能的なグループにまとめることが有用である。アミノ酸は、その側鎖の特性のみに基づいてまとめられ得る。しかしながら、突然変異データも同様に含めることが更に有用である。このように得られたアミノ酸の組は、構造上の理由から保存されているものと思われる。これらの組はベン図の形式で記述することができる (Livingstone C. D. and Barton G. J. (1993) "Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation" Comput. Appl. Biosci. 9: 745-756) (Taylor W. R. (1986) "The classification of amino acid conservation" J. Theor. Biol. 119: 205-218)。保存的置換は、例えば、一般に認められているベン図によるアミノ酸分類を記載する下記の表に従い作製し得る。

10

20

30

40

【表 2】

セット		サブセット	
疎水性	FWYHKMILVAGC	芳香族	FWYH
		脂肪族	ILV
極性	WYHKREDCSTNQ	荷電	HKRED
		正電荷	HKR
		負電荷	ED
小型	VCAGSPTND	極小	AGS

10

20

【0518】

用語「対象」、「個体」及び「患者」は、本明細書では、脊椎動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトを指して同義的に使用される。哺乳類としては、限定はされないが、ネズミ科動物、サル類、ヒト、農業動物、競技動物及びペットが挙げられる。インビボで得られたか又はインビトロで培養された生物学的実体の組織、細胞及びそれらの子孫も包含される。

【0519】

用語「療法薬剤」、「療法的能力のある薬剤」又は「治療薬剤」は同義的に使用され、対象への投与時に何らかの有益な効果を付与する分子又は化合物を指す。有益な効果には、診断上の判断の実施可能性；疾患、症状、障害又は病的状態の改善；疾患、症状、障害又は病態の発症の低減又は予防；及び疾患、症状、障害又は病的状態への一般的な対抗が含まれる。本明細書で使用されるとき、「治療」又は「治療する」又は「緩和する」又は「改善する」は同義的に使用される。これらの用語は、限定はされないが治療利益及び／又は予防利益を含めた有益な又は所望の結果を達成するための手法を指す。治療利益とは、治療下の1つ以上の疾患、病態又は症状における任意の治療的に関連性のある向上又はそれに対する効果を意味する。予防的利益について、組成物は、特定の疾患、病態又は症状を発症するリスクのある対象、又は疾患、病態又は症状が依然として現れていないことがあり得るにしろ、疾患の生理学的症状の1つ以上を訴えている対象に投与され得る。用語「有効量」又は「治療有効量」は、有益な又は所望の結果を生じさせるのに十分な薬剤の量を指す。治療有効量は、治療下の対象及び疾患状態、対象の体重及び年齢、疾患状態の重症度、投与方法などの1つ以上に応じて異なり得るが、当業者はこれを容易に判断することができる。この用語は、本明細書に記載されるイメージング方法のいずれか1つによる検出用の画像を提供し得る用量にも適用される。具体的な用量は、詳細な選択の薬剤、従うべき投与レジメン、他の化合物と併用して投与されるかどうか、投与タイミング、イメージングする組織及びそれが担持される物理的送達系の1つ以上に応じて異なり得る。

30

40

【0520】

50

本発明の実施では、特に指示されない限り、当該技術分野の技術の範囲内にある免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクス及び組換えDNAの従来技術を利用する。Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (1987)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987))を参照されたい。本発明の幾つかの態様は、1つ以上のベクターを含むベクター系又はベクター自体に関する。ベクターは、原核細胞又は真核細胞でのCRISPR転写物(例えば、核酸転写物、タンパク質又は酵素)の発現用に設計することができる。例えば、CRISPR転写物は、細菌細胞、例えば大腸菌(*Escherichia coli*)、昆虫細胞(バキュロウイルス発現ベクターを使用)、酵母細胞又は哺乳類細胞で発現させることができる。好適な宿主細胞については、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に詳述されている。代わりに、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列及びT7ポリメラーゼを用いてインビトロで転写及び翻訳され得る。本発明の実施形態は、起こり得る相同置換(置換(substitution)及び置換(replacement)の両方は、本明細書では既存のアミノ酸残基又はヌクレオチドと代替の残基又はヌクレオチドとの相互交換を意味して用いられる)、即ちアミノ酸の場合に塩基性同士、酸性同士、極性同士等、同種のもの同士の置換を含み得る配列(ポリヌクレオチド又はポリペプチドの両方)を含む。非相同置換、即ちあるクラスから別のクラスの残基への置換又は代わりにオルニチン(以下、Zと称する)、ジアミノ酪酸オルニチン(以下、Bと称する)、ノルロイシンオルニチン(以下、Oと称する)、ピリイルアラニン、チエニルアラニン、ナフチルアラニン及びフェニルグリシンなどの非天然アミノ酸の取り込みが関わる置換も起こり得る。変異体アミノ酸配列は、グリシン又はβ-アラニン残基などのアミノ酸スペーサーに加え、メチル基、エチル基又はプロピル基などのアルキル基を含む配列の任意の2つのアミノ酸残基の間に挿入され得る好適なスペーサー基を含み得る。更に別の形態(これにはペプトイド形態の1つ以上のアミノ酸残基の存在が関わる)について、当業者は十分に理解し得る。誤解を避けるため、「ペプトイド形態」は、α-炭素置換基がα-炭素上ではなく、むしろ残基の窒素原子上にある変異体アミノ酸残基を指して使用される。ペプトイド形態のペプチドの調製方法は、当該技術分野において公知である(例えば、Simon RJ et al., PNAS (1992) 89 (20), 9367-9371及びHorwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13 (4), 132-134)。相同性モデリング: 他のCas13bオルソログにおける対応する残基は、Zhang et al., 2012 (Nature; 490 (7421): 556-60)及びChen et al., 2015 (PLoS Comput Biol; 11 (5): e1004248)の方法ードメインモチーフ界面によって媒介される相互作用を予測する計算的タンパク質間相互作用(PPI)方法によって同定することができる。構造に基づくPPI予測方法であるPrePPI(予測PPI)は、ベイズ統計学の枠組みを用いて構造的エビデンスを非構造的エビデンスと組み合わせる。この方法は、クエリタンパク質のペアをとり、構造アラインメントを用いることにより、それらの実験的に決定された構造又は相同性モデルのいずれかに対応する構造表現を同定することを含む。構造アラインメントは、更に、大域的及び局所的幾何学関係を考慮することによって近く及び遠くの両方の隣接構造を同定するのに用いられる。構造表

現の2つの隣接構造がタンパク質データバンクに報告されている複合体を形成する場合には常に、これが、これらの2つのクエリタンパク質間の相互作用をモデル化するための鋳型を定義付ける。複合体のモデルは、鋳型内の対応する隣接構造上の代表的な構造を重ね合わせるにより作成される。この手法は、Dey et al., 2013 (Prot Sci; 22:359-66) に更に記載される。

【0521】

本発明の目的上、増幅は、妥当なフィデリティで標的配列を複製する能力を有するプライマー及びポリメラーゼを用いる任意の方法を意味する。増幅は、天然又は組換えDNAポリメラーゼ、例えばTaqGold（商標）、T7 DNAポリメラーゼ、大腸菌（E. coli）DNAポリメラーゼのクレノウ断片及び逆転写酵素によって行われ得る。好ましい増幅方法はPCRである。特定の態様において、本発明はベクターに関する。本明細書で使用されるとき、「ベクター」は、ある実体を1つの環境から別の環境に移すことを可能にする又は促進するツールである。これは、別のDNAセグメントが挿入されて挿入セグメントの複製をもたらし得るレプリコン、例えばプラスミド、ファージ又はコスミドである。概して、ベクターは適切な制御エレメントと会合しているとき、複製能を有する。一般に、用語「ベクター」は、それに連結されている別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を指す。ベクターとしては、限定はされないが、一本鎖、二本鎖又は部分的二本鎖の核酸分子；1つ以上の遊離末端を含む、遊離末端のない（例えば、環状の）核酸分子；DNA、RNA又は両方を含む核酸分子；及び当該技術分野において公知の他の種類のポリヌクレオチドが挙げられる。ある種のベクターは「プラスミド」であり、これは、標準的な分子クローニング技術によるなどして追加のDNAセグメントを挿入することのできる環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターはウイルスベクターであり、ここで、ベクターには、ウイルス（例えば、レトロウイルス、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス（AAV））へのパッケージングのためのウイルス由来DNA又はRNA配列が存在する。ウイルスベクターは、宿主細胞へのトランスフェクションのためのウイルスによって担持されるポリヌクレオチドも含む。特定のベクターは、それが導入される宿主細胞での自己複製能を有する（例えば、細菌性複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳類ベクター）は宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより宿主ゲノムと共に複製される。更に、特定のベクターは、それが作動可能に連結された遺伝子の発現を導くことが可能である。かかるベクターは、本明細書では「発現ベクター」と称される。組換えDNA技法において有用な一般的な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多い。組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に好適な形態の本発明の核酸を含むことができ、これは、即ち、組換え発現ベクターが、発現させる核酸配列に作動可能に連結された1つ以上の調節エレメント（これは、発現に用いられる宿主細胞に基づいて選択され得る）を含むことを意味する。組換え発現ベクターの範囲内において、「作動可能に連結された」は、ヌクレオチド配列の（例えば、インビトロ転写／翻訳系における又はベクターが宿主細胞に導入される場合に宿主細胞における）発現が可能となる形で目的のヌクレオチド配列が調節エレメントに連結されていることを意味するように意図される。組換え及びクローニング方法に関しては、2004年9月2日に米国特許出願公開第2004-0171156 A1号明細書として公開された米国特許出願第10/815,730号明細書（この内容は、本明細書において全体として参照により援用される）が挙げられる。本発明の態様は、ガイドRNA及び野生型、改変若しくは突然変異CRISPRエフェクタータンパク質／酵素（例えば、Cas13bエフェクタータンパク質）用のバイシストロニックベクターに関する。ガイドRNA及び野生型、改変若しくは突然変異CRISPRエフェクタータンパク質／酵素（例えば、Cas13bエフェクタータンパク質）用のバイシストロニック発現ベクターが好ましい。概して且つ特に、この実施形態において野生型、改変又は突然変異CRISPRエフェクタータンパク質／酵素（例えば、Cas13bエフェクタータンパク質）は、好ましくは、CBhプロモーターによってドライブされる。RNAは、好ましくはU6

10

20

30

40

50

プロモーターなどの P o l I I I プロモーターによってドライブされ得る。理想的にはこの 2 つが組み合わされる。

【0522】

一部の実施形態において、ガイド RNA 又は c r RNA 中のループが提供される。これは、ステムループ又はテトラループであり得る。ループは、好ましくは、G A A A であるが、この配列に限定されるものではなく、又は実際には、4 b p 長であることに限定されるものではない。実際には、ヘアピン構造における使用に好ましいループ形成配列は 4 ヌクレオチド長であり、最も好ましくは配列 G A A A を有する。しかしながら、代替的な配列であり得るとおり、より長い又は短いループ配列が使用され得る。配列は、好ましくは、ヌクレオチドトリプレット（例えば、A A A）及び更なるヌクレオチド（例えば、C 又は G）を含む。ループ形成配列の例には C A A A 及び A A A G が含まれる。

10

【0523】

本明細書に開示される任意の方法の実施では、限定なしに、マイクロインジェクション、電気穿孔、ソノポレーション、微粒子銃、リン酸カルシウム媒介性トランスフェクション、カチオン性トランスフェクション、リボソームトランスフェクション、デンドリマートランスフェクション、熱ショックトランスフェクション、ヌクレオフエクシントランスフェクション、マグネトフェクション、リポフェクション、インペイルフェクション（impalefection）、光学的トランスフェクション、専売薬剤により増強される核酸取り込み及びリボソーム、免疫リボソーム、ピロソーム又は人工ビリオンを介した送達を含めた当該技術分野で公知の 1 つ以上の方法によって細胞又は胚に好適なベクターを導入することができる。一部の方法において、ベクターはマイクロインジェクションによって胚に導入される。ベクターが胚の核又は細胞質に微量注入され得る。一部の方法において、ベクターは、ヌクレオフエクシオンによって細胞に導入され得る。

20

【0524】

ベクターは、原核細胞又は真核細胞での C R I S P R 転写物（例えば、核酸転写物、タンパク質又は酵素）の発現用に設計することができる。例えば、C R I S P R 転写物は、細菌細胞、例えば大腸菌（E s c h e r i c h i a c o l i）、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用）、酵母細胞又は哺乳類細胞で発現させることができる。好適な宿主細胞については、G o e d d e l, G E N E E X P R E S S I O N T E C H N O L O G Y : M E T H O D S I N E N Z Y M O L O G Y 185, A c a d e m i c P r e s s, S a n D i e g o, C a l i f. (1990) に詳しく考察されている。代わりに、組換え発現ベクターは、例えば、T7 プロモーター調節配列及び T7 ポリメラーゼを用いてインビトロで転写及び翻訳され得る。

30

【0525】

ベクターは、原核生物又は原核細胞に導入して増殖させ得る。一部の実施形態において、真核細胞に導入するベクターのコピーを増幅させるため又は真核細胞に導入するベクターの産生における中間ベクターとして（例えば、ウイルスベクターパッケージング系の一部としてプラスミドを増幅する）、原核生物が使用される。一部の実施形態において、原核生物を用いてベクターのコピーを増幅し、1 つ以上の核酸を発現させて、それにより例えば宿主細胞又は宿主生物に送達するための 1 つ以上のタンパク質の供給源を提供する。原核生物でのタンパク質の発現は、多くの場合、融合タンパク質又は非融合タンパク質のいずれかの発現を導く構成的プロモーター又は誘導プロモーターを含むベクターを用いて大腸菌（E s c h e r i c h i a c o l i）で行われる。融合ベクターが、そこでコードされるタンパク質、例えば組換えタンパク質のアミノ末端に幾つものアミノ酸を付加する。かかる融合ベクターは、（i）組換えタンパク質の発現の増加；（i i）組換えタンパク質の溶解度の増加；及び（i i i）アフィニティー精製でリガンドとして作用することによる組換えタンパク質の精製の促進など、1 つ以上の目的を果たし得る。多くの場合、融合発現ベクターでは、融合タンパク質の精製後に組換えタンパク質を融合部分と分離することができるように、融合部分と組換えタンパク質との接合部にタンパク質分解切断部位が導入される。かかる酵素及びそのコグネイト認識配列には、第 X a 因子、トロンビ

40

50

ン及びエンテロキナーゼが含まれる。融合発現ベクターの例としては、pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988. Gene 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) 及び pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N. J.) が挙げられ、これらは、それぞれグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、マルトースE結合タンパク質又はプロテインAを標的組換えタンパク質に融合させる。好適な誘導性非融合大腸菌 (E. coli) 発現ベクターの例としては、pTrc (Amrann et al., (1988) Gene 69:301-315) 及び pET 11d (Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89) が挙げられる。一部の実施形態において、ベクターは酵母発現ベクターである。酵母サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) における発現用のベクターの例としては、pYepSec1 (Baldari, et al., 1987. EMBO J. 6:229-234)、pMFa (Kuijan and Herskowitz, 1982. Cell 30:933-943)、pJRY88 (Schultz et al., 1987. Gene 54:113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) 及び picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.) が挙げられる。一部の実施形態において、ベクターは、バキュロウイルス発現ベクターを用いて昆虫細胞でのタンパク質発現をドライブする。培養昆虫細胞 (例えば、SF9細胞) でのタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターとしては、pAcシリーズ (Smith, et al., 1983. Mol. Cell. Biol. 3:2156-2165) 及び pVLシリーズ (Lucklow and Summers, 1989. Virology 170:31-39) が挙げられる。一部の実施形態において、ベクターは、哺乳類発現ベクターを用いて哺乳類細胞での1つ以上の配列の発現をドライブする能力を有する。哺乳類発現ベクターの例としては、pCDM8 (Seed, 1987. Nature 329:840) 及び pMT2PC (Kaufman, et al., 1987. EMBO J. 6:187-195) が挙げられる。哺乳類細胞で 사용되는場合、発現ベクターの制御機能は、典型的には1つ以上の調節エレメントによって提供される。例えば、一般的に用いられるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、シミアンウイルス40及び本明細書に開示される及び当該技術分野において公知の他のウイルスに由来する。原核細胞及び真核細胞の両方に好適な他の発現系については、例えば、Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989の Chapters 16及び17を参照されたい。一部の実施形態において、組換え哺乳類発現ベクターは、特定の細胞型で優先的に核酸の発現を導くことが可能である (例えば、組織特異的調節エレメントが核酸の発現に使用される)。組織特異的調節エレメントは、当該技術分野において公知である。好適な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター (肝臓特異的; Pinkert, et al., 1987. Genes Dev. 1:268-277)、リンパ系特異的プロモーター (Calame and Eaton, 1988. Adv. Immunol. 43:235-275)、詳細にはT細胞受容体 (Winoto and Baltimore, 1989. EMBO J. 8:729-733) 及び免疫グロブリン (Banerji, et al., 1983. Cell 33:729-740; Queen and Baltimore, 1983. Cell 33:741-748) のプロモーター、ニューロン特異的プロモーター (例えば、ニューロフィラメントプロモーター; Byrne and Ruddie, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U

10

20

30

40

50

SA 86:5473-5477)、腓腸特異的プロモーター (Edlund, et al., 1985. Science 230:912-916) 及び乳腺特異的プロモーター (例えば、乳清プロモーター; 米国特許第4, 873, 316号明細書及び欧州特許出願公開第264, 166号明細書) が挙げられる。発生的に調節されるプロモーター、例えばマウス *hox* プロモーター (Kessel and Gruss, 1990. Science 249:374-379) 及び α フェトプロテインプロモーター (Campes and Tilghman, 1989. Genes Dev. 3:537-546) も包含される。これらの原核生物及び真核生物ベクターに関しては、米国特許第6, 750, 059号明細書 (その内容は全体として参照により本明細書に援用される) が挙げられる。本発明の他の実施形態はウイルスベクターの使用に関し得、それについては、米国特許出願第13/092, 085号明細書 (その内容は全体として参照により本明細書に援用される) が挙げられる。組織特異的調節エレメントは、当該技術分野において公知であり、この点で、米国特許第7, 776, 321号明細書 (その内容は全体として参照により本明細書に援用される) が挙げられる。

【0526】

一部の実施形態において、CRISPR Cas13b系又は複合体の又はそれをコードする1つ以上のエレメントの発現をドライブするため、CRISPR系の1つ以上のエレメントに調節エレメントが作動可能に連結される。一般に、SPIDER (Spacer Interspersed Direct Repeat、スパーサー散在型ダイレクトリピート) としても知られるCRISPR (クラスター化した規則的な間隔の短いパンドローム反復) は、通常特定の細菌種に特異的なDNA遺伝子座のファミリーを構成する。CRISPR遺伝子座は、大腸菌 (*E. coli*) (Ishino et al., J. Bacteriol., 169:5429-5433 [1987]; 及び Nakata et al., J. Bacteriol., 171:3553-3556 [1989]) に認められた特徴的なクラスターの散在型短鎖配列リピート (SSR) 及び関連遺伝子を含む。同様の散在型SSRが、ハロフェラックス・メディテラネイ (*Haloferrax mediterranei*)、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、アナバナ属 (*Anabaena*) 及び結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) において同定されている (Groenen et al., Mol. Microbiol., 10:1057-1065 [1993]; Hoe et al., Emerg. Infect. Dis., 5:254-263 [1999]; Masepohl et al., Biochim. Biophys. Acta 1307:26-30 [1996]; 及び Mojica et al., Mol. Microbiol., 17:85-93 [1995] を参照されたい)。CRISPR遺伝子座は、典型的にはリピートの構造が他のSSRと異なり、短い規則的な間隔のリピート (SRSR) と呼ばれている (Janssen et al., OMICS J. Integ. Biol., 6:23-33 [2002]; 及び Mojica et al., Mol. Microbiol., 36:244-246 [2000])。一般に、このリピートは、実質的に一定長さのユニークな介在配列によって規則的な間隔が置かれたクラスター内に存在する短いエレメントである (Mojica et al., [2000]、前掲)。リピート配列は株間で高度に保存されているが、散在するリピートの数及びスパーサー領域の配列は、典型的には株毎に異なる (van Embden et al., J. Bacteriol., 182:2393-2401 [2000])。CRISPR遺伝子座は、限定はされないが、アエロピルム属 (*Aeropyrum*)、ピロバキュラム属 (*Pyrobaculum*)、スルホロブス属 (*Sulfolobus*)、アーケオグロブス属 (*Archaeoglobus*)、ハロアーキュラ属 (*Halocarculla*)、メタノバクテリウム属 (*Methanobacterium*)、メタノコッカス属 (*Methanococcus*)、メタノサルシナ属 (*Methanosarcina*)、メタノピュルス属 (*Methanotrichia*)、パイロコッカス属 (*Pyrococcus*)、ピクロフィルス属 (*Picrophilus*)、サーモプラズマ属 (*Thermoplasma*)、

10

20

30

40

50

rmoplasma)、コリネバクテリウム属 (Corynebacterium)、マイコバクテリウム属 (Mycobacterium)、ストレプトミセス属 (Streptomyces)、アクウィフェクス属 (Aquifex)、ポルフィロモナス属 (Porphyromonas)、クロロビウム属 (Chlorobium)、サーマス属 (Thermus)、バチルス属 (Bacillus)、リステリア属 (Listeria)、スタフィロコッカス属 (Staphylococcus)、クロストリジウム属 (Clostridium)、サーモアナエロバクター属 (Thermoanaerobacter)、マイコプラズマ属 (Mycoplasma)、フゾバクテリウム属 (Fusobacterium)、アゾアルカス属 (Azarcus)、クロモバクテリウム属 (Chromobacterium)、ナイセリア属 (Neisseria)、ニトロソモナス属 (Nitrosomonas)、デスルホビブリオ属 (Desulfovibrio)、ジオバクター属 (Geobacter)、ミキソコッカス属 (Mycococcus)、カンピロバクター属 (Campylobacter)、ウォリネラ属 (Wolinella)、アシネトバクター (Acinetobacter)、エルウィニア属 (Erwinia)、大腸菌属 (Escherichia)、レジオネラ属 (Legionella)、メチロコッカス属 (Methylococcus)、パスツレラ属 (Pasteurella)、フォトバクテリウム属 (Photobacterium)、サルモネラ属 (Salmonella)、ザントモナス属 (Xanthomonas)、エルシニア属 (Yersinia)、トレポネマ属 (Treponema) 及びサーモトガ属 (Thermotoga) を含め、40を超える原核生物において同定されている (例えば、Jansen et al., Mol. Microbiol., 43:1565-1575 [2002]; 及び Mojica et al., [2005] を参照されたい)。

【0527】

一般に、「RNA ターゲティング系」は、本願で使用されるとき、まとめて、本明細書で考察するおりの図1に関連した、RNA ターゲティング Cas (エフェクター) タンパク質及びガイド RNA (又は crRNA 配列) をコードする配列を含めた、RNA ターゲティング CRISPR 関連 13b (「Cas 13b」) 遺伝子 (本明細書ではエフェクタータンパク質とも称される) の発現又はその活性の誘導に関わる転写物及び他のエレメントを指す。一般に、RNA ターゲティング系は、標的配列の部位で RNA ターゲティング複合体の形成を促進するエレメントによって特徴付けられる。RNA ターゲティング複合体の形成の文脈では、「標的配列」は、ガイド配列 (又はガイド又は crRNA の) がそれと相補性を有するように設計される RNA 配列を指し、ここで、標的配列とガイド RNA との間のハイブリダイゼーションが RNA ターゲティング複合体の形成を促進する。ハイブリダイゼーションを生じさせ且つ RNA ターゲティング複合体の形成を促進するのに十分な相補性がある場合、完全な相補性は、必ずしも必要でない。一部の実施形態において、標的配列は、細胞の核又は細胞質に位置する。一部の実施形態において、標的配列は、真核細胞の細胞小器官内にあり得る。標的配列を含む標的遺伝子座への組換えに用いられ得る配列又は鋳型は、「編集用鋳型」、又は「編集用 RNA」、又は「編集用配列」と称される。本発明の態様では、外因性鋳型 RNA が編集用鋳型と称され得る。本発明のある態様では、組換えは、相同組換えである。一般に、ガイド配列は、標的配列とハイブリダイズして標的配列への核酸ターゲティング複合体の配列特異的結合を導くのに十分な標的ポリヌクレオチド配列との相補性を有する任意のポリヌクレオチド配列である。一部の実施形態において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、好適なアラインメントアルゴリズムを用いて最適にアラインメントしたとき、約 50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99% 以上であるか又はそれより高い。最適アラインメントは、配列のアラインメントに好適な任意のアルゴリズムを用いて決定することができ、その非限定的な例としては、スミス・ウォーターマンアルゴリズム、ニードルマン・ブンシュアルゴリズム、バローズ・ホイラー変換に基づくアルゴリズム (例えば、バローズ・ホイラーアライナー)、Clustal W、Clustal X、BLAT、Novoalign (Novocraft Technology

ies、ELAND (Illumina, San Diego, CA)、SOAP (soap.genomics.org.cnにおいて利用可能)及びMaq (maq.sourceforge.netにおいて利用可能)が挙げられる。一部の実施形態において、ガイド配列は、約5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75ヌクレオチド長以上であるか又はそれより長い。一部の実施形態において、ガイド配列は、約75、50、45、40、35、30、25、20、15、12ヌクレオチド長未満であるか又はそれより短い。ガイド配列が標的配列へのRNAターゲティング複合体の配列特異的結合を導く能力は、任意の好適なアッセイによって評価し得る。10
鋳型ポリヌクレオチドは、約10、15、20、25、50、75、100、150、200、500、1000ヌクレオチド長以上又はそれより長いなど、任意の好適な長さであり得る。一部の実施形態において、鋳型ポリヌクレオチドは、標的配列を含むポリヌクレオチドの一部分に相補的である。最適にアラインメントされたとき、鋳型ポリヌクレオチドは、標的配列の1つ以上のヌクレオチド (例えば、約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド以上又はそれより長い)と重複し得る。一部の実施形態において、鋳型配列と、標的配列を含むポリヌクレオチドとが最適にアラインメントされたとき、鋳型ポリヌクレオチドのうち、最も近いヌクレオチドは、標的配列から約1、5、10、15、20、25、50、75、100、200、300、400、500、1000、5000、10000ヌクレオチド以内又はそれを超える範囲内にある。一部の実施形態において、RNAターゲ20
ティングエフェクタータンパク質は、1つ以上の異種タンパク質ドメイン (例えば、核酸ターゲティングエフェクタータンパク質に加えて約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上又はそれより多いドメイン)を含む融合タンパク質の一部である。一部の実施形態において、CRISPR Cas13bエフェクタータンパク質/酵素は、1つ以上の異種タンパク質ドメイン (例えば、CRISPR Cas13b酵素に加えて約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上又はそれより多いドメイン)を含む融合タンパク質の一部である。エフェクタータンパク質に融合させ得るタンパク質ドメインの例としては、限定なしに、エピトープタグ、レポーター遺伝子配列及び以下の活性:メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写終結因子活性、ヒストン修飾活性、RNA切断活性及び核酸結合活性の1つ以上を有するタンパク質ドメインが挙げ30
られる。エピトープタグの非限定的な例としては、ヒスチジン (His) タグ、V5タグ、FLAGタグ、インフルエンザヘマグルチニン (HA) タグ、Mycタグ、VSV-Gタグ及びチオレドキシシン (Trx) タグが挙げられる。レポーター遺伝子の例としては、限定はされないが、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、HcRed、DsRed、シアン蛍光タンパク質 (CFP)、黄色蛍光タンパク質 (YFP) 及び自己蛍光タンパク質、例えば青色蛍光タンパク質 (BFP) が挙げられる。核酸ターゲティングエフェクタータンパク質は、DNA分子に結合するか、又は限定はされないが、マルトース結合タンパク質 (MBP)、Sタグ、Lex A DNA40
結合ドメイン (DBD) 融合物、GAL4 DNA結合ドメイン融合物及び単純ヘルペスウイルス (HSV) BP16タンパク質融合物を含めた他の細胞分子に結合するタンパク質又はタンパク質の断片をコードする遺伝子配列と融合し得る。核酸ターゲティングエフェクタータンパク質を含む融合タンパク質の一部を形成し得る追加的なドメインは、米国特許出願公開第20110059502号明細書 (参照により本明細書に援用される)に記載されている。一部の実施形態では、タグ付加核酸ターゲティングエフェクタータンパク質を使用して標的配列の位置が同定される。一部の実施形態では、CRISPR Cas13b酵素は、誘導性系の一成分を形成し得る。この系の誘導可能な性質により、エネルギーの形態を用いた遺伝子編集又は遺伝子発現の時空間的制御が可能となり得る。50
エネルギーの形態としては、限定はされないが、電磁放射線、音響エネルギー、化学エネ

ルギー及び熱エネルギーを挙げることができる。誘導性系の例には、テトラサイクリン誘導性プロモーター（Tet-On又はTet-Off）、小分子2ハイブリッド転写活性化システム（FKBP、ABA等）又は光誘導性系（フィトクロム、LOVドメイン又はクリプトクロム）が含まれる。一実施形態において、CRISPR Cas13b酵素は、配列特異的に転写活性の変化を導く光誘導性転写エフェクター（LITE）の一部であり得る。光の構成成分には、CRISPR酵素、光応答性シトクロムヘテロ二量体（例えば、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）由来）及び転写活性化／抑制ドメインが含まれ得る。誘導性DNA結合タンパク質及びその使用方法の更なる例は、米国仮特許出願第61／736465号明細書及び米国仮特許出願第61／721, 283号明細書及び国際公開第2014／018423号パンフレット及び米国特許第8889418号明細書、米国特許第8895308号明細書、米国特許出願公開第20140186919号明細書、米国特許出願公開第20140242700号明細書、米国特許出願公開第20140273234号明細書、米国特許出願公開第20140335620号明細書、国際公開第2014093635号パンフレット（本明細書によって全体として参照により援用される）に提供される。一部の態様において、本発明は、1つ以上のポリヌクレオチド、又は例えば本明細書に記載されるとおりの1つ以上のベクター、その1つ以上の転写物及び／又はそれから転写されるもの又はタンパク質を、宿主細胞に送達するステップを含む方法を提供する。一部の態様において、本発明は、かかる方法によって作製される細胞及びかかる細胞を含むか、又はそれから作製される生物（動物、植物又は真菌類など）を更に提供する。一部の実施形態では、ガイドRNA又はcrRNAと組み合わせた（及び任意選択でそれと複合体を形成した）RNAターゲティングエフェクタータンパク質が細胞に送達される。哺乳類細胞又は標的組織における核酸の導入には、従来のウイルスベース及び非ウイルスベースの遺伝子導入方法を用いることができる。かかる方法を用いて、RNAターゲティング系の構成成分をコードする核酸を培養下の細胞又は宿主生物中の細胞に投与することができる。非ウイルスベクター送達系には、DNAプラスミド、RNA（例えば、本明細書に記載されるベクターの転写物）、ネイキッド核酸及び送達ビヒクルと複合体を形成した核酸、例えばリボソームが含まれる。ウイルスベクター送達系にはDNA及びRNAウイルスが含まれ、これは細胞への送達後にエピソードゲノム又は組込みゲノムのいずれかを有する。遺伝子療法手順のレビューに関しては、Anderson, Science 256:808-813 (1992); Nabel & Felgner, TIBTECH 11:211-217 (1993); Mitani & Caskey, TIBTECH 11:162-166 (1993); Dillon, TIBTECH 11:167-175 (1993); Miller, Nature 357:455-460 (1992); Van Brunt, Biotechnology 6(10):1149-1154 (1988); Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, British Medical Bulletin 51(1):31-44 (1995); Haddada et al., in Current Topics in Microbiology and Immunology, Doerfler and Boehm (eds) (1995); 及びYu et al., Gene Therapy 1:13-26 (1994)を参照されたい。核酸の非ウイルス送達方法には、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、微粒子銃、ビロソーム、リボソーム、免疫リボソーム、ポリカチオン又は脂質：核酸コンジュゲート、ネイキッドDNA、人工ビリオン及び薬剤で促進するDNA取込みが含まれる。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号明細書、同第4,946,787号明細書；及び同第4,897,355号明細書に記載され）及びリポフェクション試薬は市販されている（例えば、Transfectam（商標）及びLipofectin（商標））。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションに好適なカチオン性及び中性脂質には、Felgner、国際公開第91／17424号パンフレット；国際公開第91／16024号パンフレットの

ものが含まれる。送達は、細胞に対してであり得る（例えば、インビトロ又はエキソビボ投与）か、又は標的組織に対してであり得る（例えば、生体内投与）。

【0528】

状態のモデル

本発明の方法を用いることにより、目的の突然変異のモデル又は疾患モデルによるなど、目的の遺伝的又は後成的条件のモデル化及び／又は研究に使用し得る植物、動物又は細胞を作り出すことができる。本明細書で使用されるとき、「疾患」は、対象における疾患、障害又は徴候を指す。例えば、本発明の方法を用いて、疾患に関連する1つ以上の核酸配列に改変を含む動物若しくは細胞又は疾患に関連する1つ以上の核酸配列の発現が変化している植物、動物若しくは細胞を作り出すことができる。かかる核酸配列は疾患関連タンパク質配列をコードし得るか若しくは翻訳され得るか、又は疾患関連制御配列であり得る。従って、本発明の実施形態において植物、対象、患者、生物又は細胞は、非ヒトの対象、患者、生物又は細胞であり得ることが理解される。従って、本発明は、本方法により作製された植物、動物若しくは細胞又はその子孫を提供する。子孫は、作製された植物又は動物のクローンであり得るか、又は更に望ましい形質をその子孫に遺伝子移入させるため同じ種の他の個体と交配させることによる有性生殖から生じ得る。細胞は、多細胞生物、特に動物又は植物の場合にインビボ又はエキソビボであり得る。細胞が培養下にある例では、適切な培養条件が満たされる場合、且つ好ましくは細胞がこの目的に好適に適合する場合（例えば、幹細胞）、細胞系が樹立され得る。本発明によって作製される細菌細胞系も想定される。従って、細胞系も想定される。一部の方法において、疾患モデルを使用することにより、疾患の研究で一般的に用いられる尺度を用いて突然変異又はより一般的に遺伝子又は遺伝子産物の発現の変化、例えば低下が動物又は細胞及び疾患の発症及び／又は進行に及ぼす効果を研究することができる。代わりに、かかる疾患モデルは、薬学的に活性な化合物が疾患に及ぼす効果の研究に有用である。一部の方法において、疾患モデルを使用して、見込みのある遺伝子療法戦略の有効性を評価することができる。即ち、疾患の発症及び／又は進行が呈示、又は阻害、又は低減されるように疾患関連RNAを改変することができ、次に化合物が進行又は阻害又低減に及ぼす効果が試験される。

【0529】

Cas13bエフェクタータンパク質及びその複合体及びそれをコードする核酸分子並びにそれを使用した方法を利用する本発明の実施に有用である、以下が参照される：“Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells”. Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D.A., Mikkelsen, T., Heckl, D., Ebert, B.L., Root, D.E., Doench, J.G., Zhang, F. Science Dec 12. (2013). [Epub ahead of print]; 最終的な改訂版が以下として発表された：Science. 2014 Jan 3; 343(6166): 84-87. Shalem et al. は、ゲノムワイド規模で遺伝子機能を探索する新規方法に関する。その研究は、64,751個のユニークなガイド配列で18,080個の遺伝子を標的化するゲノム規模のCRISPR-Cas9ノックアウト(GeCKO)ライブラリを送達することにより、ヒト細胞におけるネガティブ選択及びポジティブ選択の両方のスクリーニングが可能になったことを示した。第一に、この著者らは、GeCKOライブラリを用いて癌及び多能性幹細胞における細胞生存能力に必須の遺伝子を同定することを示した。次に、この著者らは、メラノーマモデルにおいて、その欠損がベムラフェニブ（突然変異プロテインキナーゼBRAFを阻害する治療薬）に対する耐性に関わる遺伝子をスクリーニングした。その研究は、最も上位に位置付けられる候補に、既に検証されている遺伝子NF1及びMED12並びに新規ヒットNF2、CUL3、TADA2B及びTADA1が含まれたことを明らかにした。この著者らは、同じ遺伝子を標的化する独立したガイドRNA間における高度な一貫性及び高いヒット確認率を観察し、従ってCas9によるゲノム規模のスクリーニングの有望さを実証した。米国特許出願公開第20140357530号明細書及び

国際公開第2014093701号パンフレット（本明細書によって参照により本明細書に援用される）も参照される。

【0530】

用語「会合している」は、ここで、機能ドメインとCas13bエフェクタータンパク質又はアダプタータンパク質との会合に関して用いられる。これは、例えば、アダプタータンパク質と機能ドメインとの間又はCas13bエフェクタータンパク質と機能ドメインとの間で1つの分子がどのように別の分子と「会合」するかに関して用いられる。かかるタンパク質間相互作用の場合、この会合は、抗体がエピトープを認識する方法における認識の観点で考えられ得る。代わりに、1つのタンパク質が別のタンパク質とそれらの2つの融合物によって会合し得、例えば1つのサブユニットが別のサブユニットに融合し得る。融合は、典型的には、例えば各タンパク質又はサブユニットをコードするヌクレオチド配列の併せたスプライシングにより、一方のアミノ酸配列が他方のアミノ酸配列に付加されることによって起こる。代わりに、これは、本質的に、融合タンパク質など、2つの分子間の結合又は直接的な連結と考えられ得る。いずれにしろ、融合タンパク質は、2つの目的のサブユニット間（即ち酵素と機能ドメインとの間又はアダプタータンパク質と機能ドメインとの間）にリンカーを含み得る。従って、一部の実施形態において、Cas13bエフェクタータンパク質又はアダプタータンパク質は、機能ドメインへの結合によってそれと会合する。他の実施形態において、Cas13bエフェクタータンパク質又はアダプタータンパク質は、機能ドメインと、それらの2つが任意選択で中間リンカーを介して一体に融合されるため、会合する。

【0531】

Cas13bエフェクタータンパク質複合体は、植物において使用することができる

一部の実施形態における本発明は、細胞又は生物を改変する方法を包含する。細胞は、原核細胞又は真核細胞であり得る。細胞は、哺乳類細胞であり得る。哺乳類細胞は、ヒト霊長類、ウシ、ブタ、げっ歯類又はマウス細胞であり得る。細胞は、家禽、魚類又はエビなどの非哺乳類真核細胞であり得る。細胞は、植物細胞でもあり得る。植物細胞は、キャッサバ、トウモロコシ、モロコシ、コムギ又はコメなどの作物植物であり得る。植物細胞は、藻類、樹木又は野菜でもあり得る。本発明によって細胞に導入される改変は、抗体、デンプン、アルコール又は他の所望の細胞産物など、生物学的産物の産生向上のため細胞及び細胞の子孫を変化させるようなものであり得る。本発明によって細胞に導入される改変は、産生される生物学的産物を変える変化が細胞及び細胞の子孫に含まれるようなものであり得る。本系は、1つ以上の異なるベクターを含み得る。本発明のある態様において、エフェクタータンパク質は、所望の細胞型、優先的に真核細胞、好ましくは哺乳類細胞又はヒト細胞での発現にコドンが最適化されている。Cas13b系（例えば、単一の又は多重化した）は、作物ゲノミクスにおける近年の進歩と併せて用いることができる。かかるCRISPR系を使用して、効率的で且つ対費用効果の高い植物遺伝子又はゲノム又はトランスクリプトームの探索又は編集又は操作を — 例えば、植物遺伝子又はゲノムの迅速な調査、及び／又は選択、及び／又は探索、及び／又は比較、及び／又は操作、及び／又は形質転換のために実施することができ、例えば形質又は特徴を作出するか、同定するか、開発するか、最適化するか、又は植物に付与するか、又は植物ゲノムを形質転換することができる。従って、植物の生産の向上、新規組み合わせの形質又は特徴を有する新規植物又は形質が増強された新規植物があり得る。かかるCRISPR系は、植物に関して、部位特異的組込み（SDI）、又は遺伝子編集（GE）、又は任意の準逆育種（NRB）、又は逆育種（RB）技術において使用することができる。従って、本明細書における動物細胞への言及は、特に明らかでない限り、適宜修正して植物細胞にも適用され得、且つオフターゲット効果が低下した本明細書における酵素及びかかる酵素を利用する系は、本明細書に記載するものを含め、植物適用に用いることができる。提供されたとおりの、エフェクタータンパク質（Cas13b）及び好適なガイド（crRNA）によって改変されたエンジニアリング植物及びその子孫である。これには、コムギ、オオムギ、コメ、ダイズ又はトウモロコシなど、病害又は干ばつ耐性作物、自家授粉能力が取り除

かれ又は低下するように改変された（しかし、代わりに、任意選択で代わりに雑種形成することができる）植物及びエフェクタータンパク質及び好適なガイドによるターゲティングによって免疫原性タンパク質が無効になった、破壊された又は断たれたピーナッツ及び堅果などのアレルギー誘発性食品が含まれ得る。古典的C R I P S R-C a s系を使用する任意の態様をC a sタンパク質非依存的なC R I S P R系、例えばC a s 1 3 bエフェクタータンパク質系における使用に適合させることができる。

【0532】

治療処置

本発明の系は、本願がこの系を情報に基づいてエンジニアリングするための基礎を提供するため、本開示から、過度の実験を行うことなく、治療、アッセイ及び他の適用を含めた旧R N A切断技術の領域において適用することができる。本発明は、R N Aの過剰発現、毒性R N A及び／又は突然変異したR N A（例えば、スプライシング欠損又はトランケーションなど）によって引き起こされる疾患の治療処置を提供する。毒性R N Aの発現は、核封入体の形成及び脳、心臓又は骨格筋における遅発性変性変化に関連し得る。最もよく研究された例、筋強直性ジストロフィーでは、毒性R N Aの主要な病原性効果は、結合タンパク質を隔離し、且つ選択的スプライシングの調節を損なうことと見られる（H u m . M o l . G e n e t . （2006）15（suppl 2）：R162-R169）。筋強直性ジストロフィー〔筋緊張性異栄養症（DM）〕は、極めて幅広い臨床的特徴を生じるため、遺伝学者にとって特に興味深い。一部を挙げるとすれば、筋肉の消耗、白内障、インスリン抵抗性、精巣萎縮、心伝導の減速、皮膚腫瘍及び認知への効果であり得る。現在DM1型（DM1）と呼ばれている古典的形態のDMは、細胞質タンパク質キナーゼをコードする遺伝子D M P Kの3'非翻訳領域（U T R）におけるC T Gリピートの伸長によって引き起こされる。

【0533】

自然免疫系は、主に感染細胞内部のウイルス核酸を認識することによりウイルス感染を検出し、これは、D N A又はR N Aセンシングと称される。インビトロR N Aセンシングアッセイを用いると、特異的R N A基質を検出することができる。例えば、生細胞におけるR N AベースのセンシングにR N Aターゲティングエフェクタータンパク質を使用することができる。適用の例は、例えば、疾患特異的R N Aのセンシングによる診断法である。本発明のR N Aターゲティングエフェクタータンパク質（C a s 1 3 b）は、抗ウイルス活性、詳細にはR N Aウイルスに対する抗ウイルス活性に更に使用することができる。選択のウイルスR N A配列に選択的な好適なガイドR N Aを使用してエフェクタータンパク質（C a s 1 3 b）をウイルスR N Aに標的化することができる。詳細には、エフェクタータンパク質は、一本鎖R N AなどのR N Aを切断する活性ヌクレアーゼであり得る。R N A、上記で言及したR N Aを標的化するための本発明の酵素系の治療投薬量は、約0.1～約2 m g / k gであることが企図され、これらの投薬量は、応答をモニタしながら、必要に応じて繰り返しの投薬量で患者1人当たり約7～10用量まで逐次的に投与され得る。有利には、治療レジメン中に各患者から試料が採取され、治療の有効性が確認される。例えば、R N A試料が分離及び定量化され、発現が低下しているか又は改善しているかどうか判断され得る。かかる診断法は、当業者の範囲内にある。

【0534】

トランスクリプトームワイドノックダウンスクリーニング

本明細書に記載されるC R I S P Rエフェクタータンパク質複合体は、効率的で対費用効果の高い機能性トランスクリプトニックスクリーニングの実施に用いることができる。かかるスクリーニングは、トランスクリプトームワイドライブラリベースのC R I S P Rエフェクタータンパク質を用いることができる。かかるスクリーニング及びライブラリにより、遺伝子の機能、遺伝子が関与する細胞経路及び遺伝子発現の任意の変化が如何に特定の生物学的過程をもたらし得るかを決定することが可能となり得る。本発明の利点は、C R I S P R系がオフターゲット結合及びその結果として生じる副作用を回避することである。これは、標的R N Aに対して高度な配列特異性を有するように構成された系を用い

て達成される。本発明の好ましい実施形態において、CRISPRエフェクタータンパク質複合体はCas13bエフェクタータンパク質複合体である。

【0535】

本発明の実施形態において、トランスクリプトームワイドライブラリは、本明細書に記載されるとおりの、真核細胞集団内の複数の遺伝子座における複数の標的配列を標的化可能なガイド配列を含む複数のCas13b系ガイドRNAを含み得る。細胞集団は胚性幹（ES）細胞集団であり得る。遺伝子座にある標的配列は非コード配列であり得る。非コード配列は、イントロン、調節配列、スプライス部位、3'UTR、5'UTR又はポリアデニル化シグナルであり得る。前記標的化により、1つ以上の遺伝子産物の遺伝子機能に変化し得る。標的化は遺伝子機能のノックアウトをもたらし得る。遺伝子産物の標的化は2つ以上のガイドRNAを含み得る。遺伝子産物は、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のガイドRNA、好ましくは1遺伝子当たり3〜4個によって標的化され得る。オフターゲット改変は、Cas13bエフェクタータンパク質複合体によって作成される付着末端型の二本鎖切断を利用することによるか、又はCRISPR-Cas9系で用いられるものと類似の方法を利用することにより、最小限に抑えることができる（例えば、参照により本明細書に援用される“Off-target modifications may be minimized (See, e.g., DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases”. Hsu, P., Scott, D., Weinstein, J., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G., & Zhang, F. Nat Biotechnol doi:10.1038/nbt.2647 (2013)を参照されたい）。約100個以上の配列の標的化であり得る。約1000個以上の配列の標的化であり得る。約20,000個以上の配列の標的化であり得る。ゲノム全体の標的化であり得る。関連性のある又は望ましい経路に焦点を置いた標的配列のパネルの標的化であり得る。経路は免疫経路であり得る。経路は細胞分裂経路であり得る。

【0536】

本発明の一態様は、複数の遺伝子座の複数の標的配列を標的化可能なガイド配列を含み得る複数のCas13bガイドRNAを含み得るトランスクリプトームワイドライブラリを包含し、ここで、前記標的化により遺伝子機能のノックダウンが生じる。このライブラリは、生物のゲノム内の1つ1つの遺伝子を標的化するガイドRNAを潜在的に含み得る。

【0537】

本発明の一部の実施形態において、生物又は対象は真核生物（ヒトを含めた哺乳動物を含む）又は非ヒト真核生物又は非ヒト動物又は非ヒト哺乳動物である。一部の実施形態において、生物又は対象は非ヒト動物であり、節足動物、例えば昆虫であり得るか、又は線虫であり得る。本発明の一部の方法において、生物又は対象は植物である。本発明の一部の方法において、生物又は対象は哺乳動物又は非ヒト哺乳動物である。非ヒト哺乳動物は、例えば、げっ歯類（好ましくはマウス又はラット）、有蹄類又は霊長類であり得る。本発明の一部の方法において、生物又は対象は微細藻類を含む藻類であるか又は真菌類である。

【0538】

遺伝子機能のノックダウンには、I. Cas13bエフェクタータンパク質及びII. 1つ以上のガイドRNAを含むエンジニアリングされた天然に存在しないCas13bエフェクタータンパク質系を含む1つ以上のベクターのベクター系を細胞集団における各細胞に導入するステップ〔構成成分I及びIIは系の同じ又は異なるベクター上にあり得る〕、構成成分I及びIIを各細胞に組み込むステップ〔ガイド配列は各細胞内のユニークな遺伝子を標的化し、Cas13bエフェクタータンパク質は調節エレメントに作動可能に連結されており、ガイド配列を含むガイドRNAは、転写されると、ユニークな遺伝子

のゲノム遺伝子座における標的配列へのC a s 1 3 bエフェクタータンパク質系の配列特異的結合を導く」、C a s 1 3 bエフェクタータンパク質によるゲノム遺伝子座の切断を誘導するステップ及び細胞集団の各細胞内の複数のユニークな遺伝子における異なるノックダウンイベントを確認するステップが含まれ得、それにより遺伝子ノックダウン細胞ライブラリが生成される。本発明は、細胞集団が真核細胞集団であり、及び好ましい実施形態において、細胞集団が胚性幹（E S）細胞の集団であることを包含する。

【0539】

1つ以上のベクターは、プラスミドベクターであり得る。ベクターは、C a s 1 3 bエフェクタータンパク質、g R N A及び任意選択で選択マーカを含む標的細胞への単一のベクターであり得る。理論によって拘束されないが、単一のベクターでC a s 1 3 bエフェクタータンパク質及びg R N Aを同時に送達可能であることにより、C a s 1 3 bエフェクタータンパク質を発現する細胞株を初めに作成する必要なしに、いかなる目的の細胞型にも適用することができる。調節エレメントは誘導性プロモーターであり得る。誘導性プロモーターはドキシサイクリン誘導性プロモーターであり得る。本発明の一部の方法において、ガイド配列の発現はT 7プロモーターの制御下にあり、T 7ポリメラーゼの発現によってドライブされる。種々のノックダウンイベントの確認は全トランスクリプトームシーケンシングによることができる。ノックダウンイベントは100個以上のユニークな遺伝子において実現し得る。ノックダウンイベントは1000個以上のユニークな遺伝子において実現し得る。ノックダウンイベントは20,000個以上のユニークな遺伝子において実現し得る。ノックダウンイベントはトランスクリプトーム全体で実現し得る。遺伝子機能のノックダウンは、特定の生理学的経路又は条件において機能する複数のユニークな遺伝子に実現し得る。経路又は条件は免疫経路又は条件であり得る。経路又は条件は細胞分裂経路又は条件であり得る。

【0540】

本発明は、本明細書に記載するトランスクリプトームワイドライブラリを含むキットも提供する。本キットは、本発明のライブラリを含むベクター又はプラスミドを含む単一の容器を含み得る。本キットは、本発明のライブラリからのガイド配列を含むユニークなC a s 1 3 bエフェクタータンパク質系ガイドR N Aの選択された一部を含むパネルも含むことができ、ここで、選択された一部は、特定の生理的条件を示すものである。本発明は、標的化が約100配列以上、約1000配列以上又は約20,000配列以上又はトランスクリプトーム全体であることを包含する。更に、標的配列のパネルは、免疫経路又は細胞分裂など、関連性のある又は望ましい経路に焦点が置かれ得る。

【0541】

本発明の更なる態様において、C a s 1 3 bエフェクタータンパク質酵素は1つ以上の突然変異を含み得、機能ドメインへの融合を伴う又は伴わない一般的なR N A結合タンパク質として用いられ得る。突然変異は人工的に導入された突然変異か又は機能獲得型若しくは機能喪失型突然変異であり得る。本明細書に記載のとおり突然変異が特徴付けられている。本発明の一態様において、機能ドメインは転写活性化ドメインであり得、これはV P 6 4であり得る。本発明の他の態様において、機能ドメインは転写リプレッサードメインであり得、これはK R A B又はS I D 4 Xであり得る。本発明の他の態様は、限定はされないが、転写アクチベーター、リプレッサー、リコンビナーゼ、トランスボザーゼ、ヒストンリモデラー、デメチラーゼ、D N Aメチルトランスフェラーゼ、クリプトクロム、光誘導性／制御性ドメイン又は化学物質誘導性／制御性ドメインを含むドメインに融合した変異C a s 1 3 bエフェクタータンパク質酵素に関する。本発明の一部の方法は、標的遺伝子の発現を誘導するステップを含み得る。一実施形態において、真核細胞集団内の複数のゲノム遺伝子座における複数の標的配列を標的化することによる発現の誘導は、機能ドメインの使用による。

【0542】

C a s 1 3 bエフェクタータンパク質複合体を利用する本発明の実施では、C R I S P R－C a s 9系で用いられる方法が有用であり、以下が参照される。

【0543】

Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. Shalem, O., Sanjana, NE., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D.A., Mikkelson, T., Heckl, D., Ebert, B.L., Root, D.E., Doench, J.G., Zhang, F. Science Dec 12. (2013). [Epub ahead of print]; 最終的な改訂版が以下として発表された: Science. 2014 Jan 3; 343 (6166): 84-87.

【0544】

Shalem et al. は、ゲノムワイド規模で遺伝子機能を探索する新規方法に関する。その研究は、64,751個のユニークなガイド配列で18,080個の遺伝子を標的化するゲノム規模のCRISPR-Cas9ノックアウト (GeCKO) ライブラリを送達することにより、ヒト細胞におけるネガティブ選択及びポジティブ選択の両方のスクリーニングが可能になったことを示した。第一に、この著者らは、GeCKOライブラリを用いて癌及び多能性幹細胞における細胞生存能力に必須の遺伝子を同定することを示した。次に、この著者らはメラノーマモデルにおいて、その欠損がベムラフェニブ (突然変異プロテインキナーゼBRAFを阻害する治療薬) に対する耐性に関わる遺伝子をスクリーニングした。その研究は、最も上位に位置付けられる候補には、既に検証されている遺伝子NF1及びMED12並びに新規ヒットNF2、CUL3、TADA2B及びTADA1が含まれたことを明らかにした。この著者らは、同じ遺伝子を標的化する独立したガイドRNA間における高度な一貫性及び高いヒット確認率を観察し、従ってCas9によるゲノム規模のスクリーニングの有望さを実証した。

【0545】

また、米国特許出願公開第20140357530号明細書; 及び国際公開第2014093701号パンフレット (本明細書によって参照により本明細書に援用される) も参照される。

【0546】

機能的変化及びスクリーニング

別の態様において、本発明は、遺伝子の機能的評価及びスクリーニング方法を提供する。機能ドメインを正確に送達するため、遺伝子を活性化若しくは抑制するため又は目的の特定の遺伝子座上のメチル化部位を正確に変化させることによりエピジェネティック状態を変化させるための本発明のCRISPR系の使用は、単細胞又は細胞集団に適用される1つ以上のガイドRNAを伴うか、又は複数のガイドRNA (sgRNA) を含むライブラリの投与又は発現を含む、エキソビボ又はインビボで細胞のプール内のゲノムに適用されるライブラリを伴うことができ、ここで、スクリーニングは、Cas13bエフェクタータンパク質の使用を更に含み、ここで、Cas13bエフェクタータンパク質を含むCRISPR複合体は、異種機能ドメインを含むように改変される。ある態様において、本発明は、ライブラリの宿主への投与又は宿主におけるインビボ発現を含む、ゲノム/トランスクリプトームのスクリーニング方法を提供する。ある態様において、本発明は、宿主に投与される又は宿主で発現するアクチベーターを更に含み、本明細書に考察されたとおりの方法を提供する。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されたとおりの方法を提供し、ここで、アクチベーターは、Cas13bエフェクタータンパク質に付加される。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されたとおりの方法を提供し、ここで、アクチベーターは、Cas13bエフェクタータンパク質のN末端又はC末端に付加される。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されたとおりの方法を提供し、ここで、アクチベーターは、sgRNAループに付加される。ある態様において、本発明は、宿主に投与される又は宿主で発現するリプレッサーを更に含み、本明細書に考察されたとおりの方法を提供する。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されたとおりの方法を提供し、ここで、スクリーニングは、遺伝子活性化、遺伝子阻害又は遺伝子座における切断に影響を及ぼし、且つそれを検出することを含む。

【0547】

ある態様において、本発明は、効率的なオンターゲット活性を提供し、且つオフターゲット活性を最小限に抑える。ある態様において、本発明は、Cas13bエフェクタータンパク質による効率的なオンターゲット切断を提供し、且つCas13bエフェクタータンパク質によるオフターゲット切断を最小限に抑える。ある態様において、本発明は、DNA切断のない、遺伝子座におけるCas13bエフェクタータンパク質のガイド特異的結合を提供する。従って、ある態様において、本発明は、標的特異的遺伝子調節を提供する。ある態様において、本発明は、DNA切断のない、遺伝子座におけるCas13bエフェクタータンパク質のガイド特異的結合を提供する。従って、ある態様において、本発明は、単一のCas13bエフェクタータンパク質を使用したある遺伝子座における切断及び別の遺伝子座における遺伝子調節を提供する。ある態様において、本発明は、1つ以上のCas13bエフェクタータンパク質及び／又は酵素を使用した複数の標的の直交性の活性化及び／又は阻害及び／又は切断を提供する。

10

【0548】

ある態様において、本発明は、本明細書に考察されたとおりの方法を提供し、ここで、宿主は、真核細胞である。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されたとおりの方法を提供し、ここで、宿主は、哺乳類細胞である。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されたとおりの方法を提供し、ここで、宿主は、非ヒト真核生物である。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されたとおりの方法を提供し、ここで、非ヒト真核生物は、非ヒト哺乳類である。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されたとおりの方法を提供し、ここで、非ヒト哺乳類は、マウスである。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されたとおりの方法を提供し、この方法は、Cas13bエフェクタータンパク質複合体又はその構成成分又はそれをコードする核酸分子の送達を含み、ここで、前記核酸分子は、調節配列に作動可能に連結され、且つインビボで発現する。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されたとおりの方法を提供し、ここで、インビボ発現は、レンチウイルス、アデノウイルス又はAAVを介する。ある態様において、本発明は、本明細書に考察されたとおりの方法を提供し、ここで、送達は、粒子、ナノ粒子、脂質又は細胞透過性ペプチド(CPP)を介する。

20

【0549】

ある態様において、本発明は、細胞の目的のゲノム遺伝子座にある標的配列にハイブリダイズ可能なガイド配列を含むガイドRNA(sgRNA)を各々が含む、Cas13bエフェクタータンパク質を含むCRISPR複合体の対を提供し、ここで、各sgRNAの少なくとも1つのループは、1つ以上のアダプタータンパク質に結合する個別のRNA配列の挿入によって改変され、ここで、アダプタータンパク質は、1つ以上の機能ドメインと会合し、ここで、各Cas13bエフェクタータンパク質複合体の各sgRNAは、DNA切断活性を有する機能ドメインを含む。

30

【0550】

ある態様において、本発明は、目的のゲノム遺伝子座にある標的配列の切断方法を提供し、この方法は、Cas13bエフェクタータンパク質複合体又はその構成成分又はそれをコードする核酸分子を細胞に送達することを含み、ここで、前記核酸分子は、調節配列に作動可能に連結され、且つインビボで発現する。ある態様において、本発明は、本明細書において考察されたとおりの方法を提供し、ここで、送達は、レンチウイルス、アデノウイルス又はAAVを介する。

40

【0551】

ある態様において、本発明は、本明細書において考察されたとおりのライブラリ、方法又は複合体を提供し、ここで、sgRNAは、少なくとも1つの非コード機能性ループを有するように改変され、例えば少なくとも1つの非コード機能性ループが抑制性であり、例えば少なくとも1つの非コード機能性ループがAluを含む。

【0552】

一態様において、本発明は、遺伝子産物の発現を変化させ又は改変する方法を提供する

50

。前記方法は、遺伝子産物をコードするDNA分子を含有し及び発現する細胞に、Cas13bエフェクタータンパク質とRNA分子を標的化するガイドRNAとを含むエンジニアリングされた天然に存在しないCRISPR系を導入するステップを含むことができ、それによってガイドRNAが、遺伝子産物をコードするRNA標的分子を標的化し、及びCas13bエフェクタータンパク質が、遺伝子産物をコードするRNA分子を切断し、それによって遺伝子産物の発現が変化し、ここで、Cas13bエフェクタータンパク質とガイドRNAとは、天然では一緒に存在しない。本発明は、ダイレトリビート配列に連結されたガイド配列を含むガイドRNAを包含する。本発明は、真核細胞での発現にコード最適化されたCas13bエフェクタータンパク質を更に包含する。好ましい実施形態において、真核細胞は、哺乳類細胞であり、より好ましい実施形態において、哺乳類細胞は、ヒト細胞である。本発明の更なる実施形態において、遺伝子産物の発現は減少する。

10

【0553】

一部の実施形態において、1つ以上の機能ドメインがCas13bエフェクタータンパク質に会合する。一部の実施形態において、1つ以上の機能ドメインは、例えば、Konerman et al. (Nature 517, 583–588, 29 January 2015) の改変ガイドと共に使用されるとおり、アダプタータンパク質に会合する。一部の実施形態において、1つ以上の機能ドメインがデッドgRNA (dRNA) に会合する。一部の実施形態において、例えばDahlman et al., “Orthogonal gene control with a catalytically active Cas9 nuclease” (Nature Biotechnology 33, p. 1159–61 (2015年11月)) によるCRISPR-Cas9系に類似的に記載のとおり、活性Cas13bエフェクタータンパク質を含むdRNA複合体が、ある遺伝子座上で機能ドメインによる遺伝子調節を導く一方、sgRNAが別の遺伝子座で活性Cas13bエフェクタータンパク質によるDNA切断を導く。一部の実施形態において、dRNAは、オフターゲット調節と比較して目的の遺伝子座に関する調節の選択性が最大となるように選択される。一部の実施形態において、dRNAは、標的遺伝子調節が最大となり、且つ標的切断が最小限に抑えられるように選択される。

20

【0554】

以下の考察の目的上、機能ドメインへの言及は、Cas13bエフェクタータンパク質と会合した機能ドメイン又はアダプタータンパク質と会合した機能ドメインのことであり得る。

30

【0555】

一部の実施形態において、1つ以上の機能ドメインはNLS (核局在化配列) 又はNES (核外移行シグナル) である。一部の実施形態において、1つ以上の機能ドメインは転写活性化ドメインであり、VP64、p65、MyoD1、HSF1、RTA、SET7/9及びヒストンアセチルトランスフェラーゼを含む。CRISPR酵素と会合したものに關する活性化 (又はアクチベーター) ドメインへの本明細書中の他の言及には、任意の公知の転写活性化ドメイン及び具体的には、VP64、p65、MyoD1、HSF1、RTA、SET7/9又はヒストンアセチルトランスフェラーゼが含まれる。

40

【0556】

一部の実施形態において、1つ以上の機能ドメインは転写リプレッサードメインである。一部の実施形態において、転写リプレッサードメインはKRABドメインである。一部の実施形態において、転写リプレッサードメインは、NuEドメイン、NcoRドメイン、SIDドメイン又はSID4Xドメインである。

【0557】

一部の実施形態において、1つ以上の機能ドメインは、翻訳活性化活性、翻訳抑制活性、メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写解除因子活性、ヒストン修飾活性、RNA切断活性、DNA切断活性、DNA組込み活性又は核酸結合活性を含む1つ以上の活性を有する。

50

【0558】

一部の実施形態において、DNA切断活性はヌクレアーゼに起因する。一部の実施形態において、ヌクレアーゼはFokIヌクレアーゼを含む。“Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing”, Shengdar Q. Tsai, Nicolas Wyvekens, Cyd Khayter, Jennifer A. Foden, Vishal Thapar, Deepak Reyon, Mathew J. Goodwin, Martin J. Aryee, J. Keith Joung Nature Biotechnology 32(6):569-77(2014)を参照されたく、これは、伸長配列を認識し、且つヒト細胞において内因性遺伝子を高効率で編集することのできる二量体RNAガイド下FokIヌクレアーゼに関する。

10

【0559】

一部の実施形態において、1つ以上の機能ドメインは、sgRNA及び標的への結合時に機能ドメインがその帰属機能で機能することが可能な空間的配置に機能ドメインが置かれるようにCas13bエフェクタータンパク質に付加される。

【0560】

一部の実施形態において、1つ以上の機能ドメインは、Cas13bエフェクタータンパク質がsgRNA及び標的に結合すると、機能ドメインがその帰属機能で機能することが可能な空間的配置に機能ドメインが置かれるようにアダプタータンパク質に付加される。

20

【0561】

ある態様において、本発明は、本明細書に考察されたとおりの組成物を提供し、ここで、1つ以上の機能ドメインは、本明細書で考察されたとおりのリンカー、任意選択でGlySerリンカーを介してCas13bエフェクタータンパク質又はアダプタータンパク質に付加される。

【0562】

また、翻訳、安定性等に関わるものなど、内因性（調節性）制御エレメントを標的化することも好ましい。公知の制御エレメントのターゲティングを用いて目的の遺伝子を活性化又は抑制し得る。他方で推定制御エレメントのターゲティングは、かかるエレメントの確認手段（目的の遺伝子の翻訳を計測することによる）又は新規制御エレメントの検出手段として用いることができる。（加えて、推定制御エレメントのターゲティングは、疾患の遺伝的原因を解明することに関連して有用であり得る。疾患表現型に関連する多くの突然変異及び共通SNP変異体が、コード領域外に位置する。他方で推定制御エレメントの標的化は、かかるエレメントの確認手段（目的の遺伝子の翻訳を計測することによる）又は新規制御エレメントの検出手段として用いることができる。加えて、推定制御エレメントの標的化は、疾患の遺伝的原因を解明することに関連して有用であり得る。疾患表現型に関連する多くの突然変異及び共通SNP変異体が、コード領域外に位置する。本明細書に記載される活性化系又は抑制系のいずれかによるかかる領域の標的化は、その後、a）推定標的（例えば、制御エレメントにごく近接して位置する遺伝子）の組、又はb）例えばRNAseq又はマイクロアレイによる全トランスクリプトーム読取りのいずれかの転写の読取りが続き得る。これにより、疾患表現型に関わると見込まれる候補遺伝子の同定が可能となり得る。かかる候補遺伝子は、新規薬物標的として有用であり得る。

30

40

【0563】

ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）阻害因子が本明細書において言及される。しかしながら、一部の実施形態における代替形態は、1つ以上の機能ドメインがアセチルトランスフェラーゼ、好ましくはヒストンアセチルトランスフェラーゼを含むものである。これらはエピゲノミクスの分野において、例えばエピゲノムの探索方法で有用である。エピゲノムの探索方法には、例えば、エピゲノム配列の標的化が含まれ得る。エピゲノム配列の標的化には、ガイドがエピゲノム標的配列に向けられることが含まれ得る。エピゲノム標的配列には、一部の実施形態において、プロモーター、サイレンサー又はエン

50

ハンサー配列が含まれ得る。

【0564】

本明細書に記載されるとおりのCas13bエフェクタータンパク質、好ましくはデッドCas13bエフェクタータンパク質、より好ましくはデッドFnCas13bエフェクタータンパク質に連結した機能ドメインを用いることによるエピゲノム配列の標的化は、プロモーター、サイレンサー又はエンハンサーを活性化し又は抑制するために用いることができる。

【0565】

アセチルトランスフェラーゼの例は公知であり、しかし、一部の実施形態ではヒストンアセチルトランスフェラーゼを含み得る。一部の実施形態において、ヒストンアセチルトランスフェラーゼはヒトアセチルトランスフェラーゼp300の触媒コアを含み得る（Gerbasch & Reddy, Nature Biotech 6th April 2015）。

【0566】

一部の好ましい実施形態では、機能ドメインがデッドCas13bエフェクタータンパク質に連結され、プロモーター又はエンハンサーなどのエピゲノム配列を標的化及び活性化する。かかるプロモーター又はエンハンサーに向けられる1つ以上のガイドも提供されて、かかるプロモーター又はエンハンサーへのCRISPR酵素の結合を導き得る。

【0567】

特定の実施形態において、本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用して、DNA／クロマチン構造の同時転写改変、RNA依存性DNAメチル化又はDNA／クロマチンのRNA依存性サイレンシング／活性化に干渉することができる。RNA依存性DNAメチル化（RdDM）は、当初植物で発見されたエピジェネティック過程である。RdDMの間、二本鎖RNA（dsRNA）が21～24ヌクレオチドの低分子干渉RNA（siRNA）にプロセッシングされ、相同DNA遺伝子座のメチル化を誘導する。RNA分子に加えて、アルゴノート、DNAメチルトランスフェラーゼ、クロマチンリモデリング複合体及び植物特異的Pol IV及びPol Vなど、多量のタンパク質がRdDMの確立に関わる。これら全てが協調して機能し、シトシンの5'位にメチル基を付加する。低分子RNAはアルゴノート含有複合体を相補的な新生（非コード）RNA転写物（transcript）にガイドすることによりクロマチン構造を改変し、転写をサイレンシングし得る。続いてヒストン及びDNAメチルトランスフェラーゼを含むクロマチン修飾複合体の動員が媒介される。本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用してかかる低分子RNAを標的化し、それらの低分子RNAと新生非コード転写物との間の相互作用に干渉し得る。

【0568】

用語「会合している」は、ここで、機能ドメインとCas13bエフェクタータンパク質又はアダプタータンパク質との会合に関して用いられる。これは、例えば、アダプタータンパク質と機能ドメインとの間又はCas13bエフェクタータンパク質と機能ドメインとの間で、1つの分子がどのように別の分子と「会合」しているかに関して用いられる。かかるタンパク質間相互作用の場合、この会合は、抗体がエピトープを認識する方法における認識の観点で考えられ得る。代わりに、1つのタンパク質が別のタンパク質と、それら2つの融合物を介して会合し得、例えば1つのサブユニットが別のサブユニットに融合し得る。融合は、典型的には、例えば、各タンパク質又はサブユニットをコードするヌクレオチド配列を併せてスプライシングすることにより、一方のアミノ酸配列を他方のアミノ酸配列に加えることによって起こる。代わりに、これは、本質的に、融合タンパク質など、2つの分子間の結合又は直接的な連結と考えられ得る。いずれにしろ、融合タンパク質は2つの目的のサブユニット間（即ち酵素と機能ドメインとの間又はアダプタータンパク質と機能ドメインとの間）にリンカーを含み得る。従って、一部の実施形態において、Cas13bエフェクタータンパク質又はアダプタータンパク質は機能ドメインへの結合によってそれと会合している。他の実施形態において、Cas13bエフェクタータン

10

20

30

40

50

パク質又はアダプタータンパク質は機能ドメインと、それらの2つが任意選択で中間リンカーを介して一体に融合されているため、会合している。リンカーの例としては、本明細書で考察されるG l y S e rリンカーが挙げられる。

【0569】

飽和突然変異誘発

本明細書に記載されるC a s 1 3 bエフェクタータンパク質系は、例えば、遺伝子発現、薬剤耐性及び疾患の好転に必要な機能性エレメントの重要な最小限の特徴及び個別的な脆弱性を決定するための、細胞表現型と併せたゲノム遺伝子座における飽和又はディープスキニング突然変異誘発の実施に用いることができる。飽和又はディープスキニング突然変異誘発とは、ゲノム遺伝子座内であらゆる又は本質的にあらゆるRNA塩基が切断されることを意味する。C a s 1 3 bエフェクタータンパク質ガイドRNAのライブラリが細胞集団に導入される。このライブラリは、各細胞がシングルガイドRNA (s g RNA)を受け取るように導入され得る。本明細書に記載されるとおり、ライブラリがウイルスベクターの形質導入によって導入される場合、低い感染多重度(MOI)が用いられる。ライブラリは、ゲノム遺伝子座において(プロトスペーサー隣接モチーフ)(PAM)配列の上流にある全ての配列を標的化するs g RNAを含み得る。ライブラリは、ゲノム遺伝子座内の1000塩基対毎にPAM配列の上流に少なくとも100個の非重複ゲノム配列を含み得る。ライブラリは、少なくとも1つの異なるPAM配列の上流の配列を標的化するs g RNAを含み得る。C a s 1 3 bエフェクタータンパク質系は2つ以上のC a s 1 3 bタンパク質を含み得る。異なるPAM配列を認識するオルソログ又はエンジニアリングされたC a s 1 3 bエフェクタータンパク質を含め、本明細書に記載されるとおりの任意のC a s 1 3 bエフェクタータンパク質を用いることができる。s g RNAに関するオフターゲット部位の頻度は500未満であり得る。オフターゲットスコアを作成して、最も低いオフターゲット部位のs g RNAを選択し得る。単一の実験で同じ部位を標的化するs g RNAを用いることにより、s g RNA標的部位における切断に関連すると決定された任意の表現型を確認し得る。標的部位の検証は、本明細書に記載されるとおりの改変C a s 1 3 bエフェクタータンパク質及び目的のゲノム部位を標的化する2つのs g RNAを用いることにより行い得る。理論によって拘束されないが、標的部位は、検証実験で表現型の変化が観察された場合に真のヒットである。

【0570】

飽和又はディープスキニング突然変異誘発のためにC a s 1 3 bエフェクタータンパク質系を細胞集団で使用することができる。C a s 1 3 bエフェクタータンパク質系は、限定はされないが哺乳類細胞及び植物細胞を含め、真核細胞で使用することができる。細胞集団は原核細胞であり得る。真核細胞集団は胚性幹(E S)細胞、神経細胞、上皮細胞、免疫細胞、内分泌細胞、筋細胞、赤血球、リンパ球、植物細胞又は酵母細胞の集団であり得る。

【0571】

一態様において、本発明は、表現型の変化に関連する機能性エレメントのスクリーニング方法を提供する。C a s 1 3 bエフェクタータンパク質を含むように適合された細胞集団にライブラリを導入し得る。細胞を表現型に基づいて少なくとも2つの群に分類し得る。表現型は、遺伝子の発現、細胞成長又は細胞生存度であり得る。各群に存在するガイドRNAの相対的表現を決定し、それによって表現型の変化に関連するゲノム部位を、各群に存在するガイドRNAの表現によって決定する。表現型の変化は、目的の遺伝子の発現の変化であり得る。目的の遺伝子は上方制御されるか、下方制御されるか、又はノックアウトされ得る。細胞は高発現群と低発現群とに分類され得る。細胞集団は、表現型の決定に用いられるレポーター構築物を含み得る。レポーター構築物は検出可能なマーカーを含み得る。細胞は、検出可能なマーカーを用いることによって分類し得る。

【0572】

別の態様において、本発明は、化学的化合物耐性に関連するゲノム部位のスクリーニング方法を提供する。化学的化合物は薬物又は農薬であり得る。C a s 1 3 bエフェクター

タンパク質を含むように適合された細胞集団にライブラリを導入することができ、ここで、集団の各細胞は、1つ以下のガイドRNAを含有し、細胞集団を化学的化合物で処理し、及び化学的化合物による処理後、早い時点と比較した遅い時点におけるガイドRNAの表現を決定し、それによって化学的化合物耐性に関連するゲノム部位をガイドRNAのエンリッチメントによって決定する。sgRNAの表現はディープシーケンシング方法によって決定し得る。

【0573】

Cas13bエフェクタータンパク質複合体を利用する本発明の実施では、CRISPR-Cas9系で用いられる方法が有用であり、“BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis”という名称の論文が参照される。Canver, M. C., Smith, E. C., Sher, F., Pinello, L., Sanjana, N. E., Shalem, O., Chen, D. D., Schupp, P. G., Vinjamur, D. S., Garcia, S. P., Luc, S., Kurita, R., Nakamura, Y., Fujiwara, Y., Maeda, T., Yuan, G., Zhang, F., Orkin, S. H., & Bauer, D. E. DOI: 10.1038/nature15521, オンライン発行 September 16, 2015が参照され、この論文は本明細書において参照により援用され、且つ以下に簡単に考察する。

【0574】

Canver et al. は、胎児ヘモグロビン (HbF) レベルに関連する且つそのマウスオルソログが赤血球BCL11A発現に必要であるエンハンサーとして既に同定されたヒト及びマウスBCL11A赤血球エンハンサーのインサイチュ飽和突然変異誘発を実施するための新規プールCRISPR-Cas9ガイドRNAライブラリについて包含している。この手法から、これらのエンハンサーの重要な最小限の特徴及び個別的な脆弱性が明らかになった。この著者らは、初代ヒト前駆細胞の編集及びマウストランスジェネシスを用いて、HbF再誘導の標的としてのBCL11A赤血球エンハンサーを実証した。この著者らは、治療的ゲノム編集についての情報を与える詳細なエンハンサーマップを作成した。

【0575】

Cas13b系を用いて細胞又は生物を改変する方法

一部の実施形態における本発明は、細胞又は生物を改変する方法を包含する。細胞は、原核細胞又は真核細胞であり得る。細胞は、哺乳類細胞であり得る。哺乳類細胞は、非ヒト霊長類、ウシ、ブタ、げっ歯類又はマウス細胞であり得る。細胞は、家禽、魚類又はエビなどの非哺乳類真核細胞であり得る。細胞は、植物細胞でもあり得る。植物細胞は、キャッサバ、トウモロコシ、モロコシ、コムギ又はコメなどの作物植物であり得る。植物細胞は、藻類、樹木又は野菜でもあり得る。本発明によって細胞に導入される改変は、抗体、デンプン、アルコール又は他の所望の細胞産出物などの生物学的産物の産生向上のため細胞及び細胞の子孫を変化させるようなものであり得る。本発明によって細胞に導入される改変は、産生される生物学的産物を変える変化が細胞及び細胞の子孫に含まれるようなものであり得る。

【0576】

本系は、1つ以上の異なるベクターを含み得る。本発明のある態様において、エフェクタータンパク質は、所望の細胞型、優先的に真核細胞、好ましくは哺乳類細胞又はヒト細胞での発現にコドンが最適化されている。

【0577】

パッケージング細胞は、典型的には、宿主細胞への感染能を有するウイルス粒子の形成に使用される。かかる細胞としては、アデノウイルスをパッケージングする293細胞及びレトロウイルスをパッケージングするψ2細胞又はPA317細胞が挙げられる。遺伝子療法に使用されるウイルスベクターは、通常、核酸ベクターをウイルス粒子中にパッケ

ージングする細胞株を作製することにより作成される。ベクターは、典型的には、パッケージング及び続く宿主中への組込みに必要な最小限のウイルス配列を含有し、他のウイルス配列は、発現させるポリヌクレオチド用の発現カセットに置き換えられる。欠損ウイルス機能は、典型的には、パッケージング細胞株によってトランスで供給される。例えば、遺伝子療法に使用されるAAVベクターは、典型的には、パッケージング及び宿主ゲノム中への組込みに必要なAAVゲノム由来のITR配列のみを有する。ウイルスDNAは、他のAAV遺伝子、即ちrep及びcapをコードするもののITR配列を欠くヘルパープラスミドを含有する細胞株中にパッケージングされる。この細胞株もヘルパーとしてアデノウイルスに感染させ得る。ヘルパーウイルスはAAVベクターの複製及びヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドはITR配列がないため、大きい量でパッケージングされることはない。アデノウイルスによる汚染は、例えば、アデノウイルスがAAVよりも高い感受性を有する熱処理によって低減することができる。核酸を細胞に送達する更なる方法は、当業者に公知である。例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第20030087817号明細書を参照されたい。

10

【0578】

一部の実施形態において、宿主細胞が本明細書に記載の1つ以上のベクターによって一過性に又は非一過性にトランスフェクトされる。一部の実施形態では、細胞は、それが対象において天然に存在するとおりにトランスフェクトされる。一部の実施形態において、トランスフェクトされる細胞は対象から採取される。一部の実施形態において、細胞は、細胞株など、対象から採取された細胞に由来する。組織培養向けの広範な細胞株が、当技術分野において公知である。細胞株の例としては、限定はされないが、C8161、CCR F-CEM、MOLT、mIMCD-3、NHDF、HeLa-S3、Huh1、Huh4、Huh7、HUV EC、HASMC、HEKn、HEKa、MiaPaCell、Panc1、PC-3、TF1、CTLL-2、C1R、Rat6、CV1、RPTE、A10、T24、J82、A375、ARH-77、Calu1、SW480、SW620、SKOV3、SK-UT、CaCo2、P388D1、SEM-K2、WEHI-231、HB56、TIB55、ジャーカット、J45.01、LRMB、Bcl-1、BC-3、IC21、DLD2、Raw264.7、NRK、NRK-52E、MRC5、MEF、Hep G2、HeLa B、HeLa T4、COS、COS-1、COS-6、COS-M6A、BS-C-1サル腎臓上皮、BALB/3T3マウス胚線維芽細胞、3T3スイス、3T3-L1、132-d5ヒト胎児線維芽細胞；10.1マウス線維芽細胞、293-T、3T3、721、9L、A2780、A2780ADR、A2780cis、A172、A20、A253、A431、A-549、ALC、B16、B35、BCP-1細胞、BEAS-2B、bEnd.3、BHK-21、BR293、BxPC3、C3H-10T1/2、C6/36、Cal-27、CHO、CHO-7、CHO-IR、CHO-K1、CHO-K2、CHO-T、CHO Dhfr-/-、COR-L23、COR-L23/CPR、COR-L23/5010、COR-L23/R23、COS-7、COV-434、CML T1、CMT、CT26、D17、DH82、DU145、DuCaP、EL4、EM2、EM3、EMT6/AR1、EMT6/AR10.0、FM3、H1299、H69、HB54、HB55、HCA2、HEK-293、HeLa、Hepa1c1c7、HL-60、HMEC、HT-29、ジャーカット、JY細胞、K562細胞、Ku812、KCL22、KG1、KYO1、LNCap、Ma-Me11-48、MC-38、MCF-7、MCF-10A、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-435、MDCK II、MDCK II、MOR/0.2R、MONO-MAC6、MTD-1A、MyEnd、NCI-H69/CPR、NCI-H69/LX10、NCI-H69/LX20、NCI-H69/LX4、NIH-3T3、NALM-1、NW-145、OPCN/OPCT細胞株、Peer、PNT-1A/PNT2、RenCa、RIN-5F、RMA/RMAS、Saos-2細胞、Sf-9、SkBr3、T2、T-47D、T84、THP1細胞株、U3

20

30

40

50

73、U87、U937、VCaP、ベロ細胞、WM39、WT-49、X63、YAC-1、YAR及びそれらのトランスジェニック変種が挙げられる。細胞株は、当業者に公知の種々の供給元から入手可能である（例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（American Type Culture Collection: ATCC）（Manassus, Va.）を参照されたい）。一部の実施形態において、本明細書に記載される1つ以上のベクターによってトランスフェクトされた細胞を使用して、1つ以上のベクター由来配列を含む新規の細胞株が樹立される。一部の実施形態において、本明細書に記載される核酸ターゲティング系の構成成分によって一過性にトランスフェクトされ（例えば、1つ以上のベクターの一過性のトランスフェクション又はRNAによるトランスフェクションによる）、且つ核酸ターゲティング複合体の活性を通して改変された細胞を使用して、改変は含むものの他のあらゆる外因性配列を欠く細胞を含む新規の細胞株が樹立される。一部の実施形態において、本明細書に記載される1つ以上のベクターによって一過性に又は非一過性にトランスフェクトされた細胞又はかかる細胞から誘導される細胞株が、1つ以上の試験化合物の評価において使用される。

10

【0579】

一部の実施形態では、本明細書に記載される1つ以上のベクターを用いて非ヒトトランスジェニック動物又はトランスジェニック植物が作製される。一部の実施形態において、トランスジェニック動物は、マウス、ラット又はウサギなどの哺乳動物である。特定の実施形態において、生物又は対象は植物である。特定の実施形態において、生物又は対象又は植物は藻類である。トランスジェニック植物及び動物の作製方法は、当該技術分野において公知であり、一般には、本明細書に記載されるものなど、細胞トランスフェクション方法から始まる。

20

【0580】

一態様において、本発明は、真核細胞内の標的ポリヌクレオチドの改変方法を提供する。一部の実施形態において、本方法は、核酸ターゲティング複合体を標的ポリヌクレオチドに結合させて前記標的ポリヌクレオチドの切断を生じさせ、それにより標的ポリヌクレオチドを改変することを含み、ここで、核酸ターゲティング複合体は、前記標的ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズするガイドRNAと複合体を形成した核酸ターゲティングエフェクタータンパク質を含む。

【0581】

一態様において、本発明は、真核細胞内のポリヌクレオチドの発現を改変する方法を提供する。一部の実施形態において、本方法は、核酸ターゲティング複合体をポリヌクレオチドに結合させて、前記結合により前記ポリヌクレオチドの発現の増加又は減少を生じさせることを含み、ここで、核酸ターゲティング複合体は、前記ポリヌクレオチド内の標的配列にハイブリダイズするガイドRNAと複合体を形成した核酸ターゲティングエフェクタータンパク質を含む。

30

【0582】

Cas13bエフェクタータンパク質複合体は、植物で使用する事ができる

Cas13bエフェクタータンパク質系（例えば、単一の又は多重化した）は、作物ゲノミクスにおける近年の進歩と併せて用いることができる。本明細書に記載される系を使用して、効率的で且つ対費用効果の高い植物遺伝子又はゲノムの探索又は編集又は操作を—例えば、植物遺伝子又はゲノムの迅速な調査及び／又は選択及び／又は探索及び／又は比較及び／又は操作及び／又は形質転換のため、実施することができ、例えば、形質又は特徴を作出するか、同定するか、開発するか、最適化するか、又は植物に付与するか、又は植物ゲノムを形質転換することができる。従って、植物の生産の向上、新規組み合わせの形質又は特徴を有する新規植物又は形質が増強された新規植物があり得る。Cas13bエフェクタータンパク質系は、植物に関して、部位特異的組込み（SDI）又は遺伝子編集（GE）又は任意の準逆育種（NRB）又は逆育種（RB）技術において使用することができる。本明細書に記載されるCas13bエフェクタータンパク質系を利用する態様は、植物におけるCRISPR-Cas（例えば、CRISPR-Cas9）系の

40

50

使用と同様であり得、アリゾナ大学 (University of Arizona) ウェブサイト「CRISPR-PLANT」(<http://www.genome.arizona.edu/crispr/>) (後援Penn State及びAGI) が挙げられる。本発明の実施形態 (emodiments) は、植物におけるゲノム編集で、又はRNAi若しくは同様のゲノム編集技法が既に用いられているところで用いることができる。例えば、Nekrasov, “Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system”, Plant Methods 2013, 9:39 (doi:10.1186/1746-4811-9-39); Brooks, “Efficient gene editing in tomato in the first generation using the CRISPR/Cas9 system”, Plant Physiology September 2014 pp 114. 247577; Shan, “Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system”, Nature Biotechnology 31, 686-688 (2013); Feng, “Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system”, Cell Research (2013) 23:1229-1232. doi:10.1038/cr.2013.114; オンライン発行 20 August 2013; Xie, “RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system”, Mol Plant. 2013 Nov; 6 (6):1975-83. doi:10.1093/mp/ss119. Epub 2013 Aug 17; Xu, “Gene targeting using the Agrobacterium tumefaciens-mediated CRISPR-Cas system in rice”, Rice 2014, 7:5 (2014); Zhou et al., “Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial Populus reveals 4-coumarate:CoA ligase specificity and Redundancy”, New Phytologist (2015) (Forum) 1-4 (www.newphytologist.comにおいてオンラインでのみ入手可能); Caliendo et al, “Targeted DNA degradation using a CRISPR device stably carried in the host genome”, NATURE COMMUNICATIONS 6:6989, DOI:10.1038/ncomms7989, www.nature.com/naturecommunications DOI:10.1038/ncomms7989; 米国特許第6,603,061号明細書 - Agrobacterium-Mediated Plant Transformation Method; 米国特許第7,868,149号明細書 - Plant Genome Sequences and Uses thereof及び米国特許出願公開第2009/0100536号明細書 - Transgenic Plants with Enhanced Agronomic Traits (これらの各々の内容及び開示は、全て本明細書において全体として参照により援用される)を参照されたい。本発明の実施では、Morrell et al “Crop genomics: advances and applications”, Nat Rev Genet. 2011 Dec 29; 13 (2):85-96の内容及び開示; その各々が、本明細書における実施形態が植物に関してどのように用いられ得るかに関してを含め、参照により本明細書に援用される。従って、本明細書において動物細胞への言及は、特に明らかでない限り、適宜修正して植物細胞にも適用し得、及びオフターゲット効果が低下した本明細書における酵素及びかかる酵素を利用する系は、本明細書に記載す

るものを含め、植物適用 (a p p l c i a t i o n s) に用いることができる。

【0583】

Sugano et al. (Plant Cell Physiol. 2014 Mar; 55 (3) : 475-81. doi: 10.1093/pcp/pcu014. Epub 2014 Jan 18) は、陸上植物進化の研究向けのモデル種として浮上しているゼニゴケのマルカンティア・ポリモルファ・L. (Marchantia polymorpha L.) における標的突然変異誘発へのCRISPR-Cas9の適用を報告している。M. ポリモルファ (M. polymorpha) のU6プロモーターが同定及びクローニングされ、gRNAが発現された。gRNAの標的配列は、M. ポリモルファ (M. polymorpha) のオーキシン応答因子1 (ARF1) をコードする遺伝子を破壊するように設計された。Sugano et al. は、アグロバクテリウム属 (Agrobacterium) 媒介性形質転換を用いてM. ポリモルファ (M. polymorpha) の配偶体世代における安定突然変異体を単離した。CRISPR-Cas9ベースのインビボ部位特異的突然変異誘発が、カリフラワーモザイクウイルス35S又はM. ポリモルファ (M. polymorpha) EF1αのいずれかのプロモーターを用いてCas9を発現させることにより達成された。オーキシン耐性表現型を示す単離された突然変異個体はキメラではなかった。更に、T1植物の無性生殖によって安定突然変異体が産生された。CRISPR-Cas9ベースの標的突然変異誘発を用いて複数のarf1対立遺伝子が容易に構築された。本発明のCas13b系を使用して同じ並びに他の遺伝子を調節することができ、RNAi及びsiRNAなどの発現制御系 (system) と同様に、本発明の方法は誘導可能且つ可逆である。

10

20

【0584】

Kabadi et al. (Nucleic Acids Res. 2014 Oct 29; 42 (19) : e147. doi: 10.1093/nar/gku749. Epub 2014 Aug 13) は、好都合なゴールデンゲートクローニング方法によってベクターに取り込まれた独立したRNAポリメラーゼIIIプロモーターからCas9変異体、レポーター遺伝子及び最大4つのsgRNAを発現する単一レンチウイルス系を開発した。各sgRNAが効率的に発現しており、不死化及び初代ヒト細胞において多重遺伝子編集及び持続的な転写活性化を媒介することができる。本発明を使用してKabadiの植物遺伝子を調節することができる。

30

【0585】

Xing et al. (BMC Plant Biology 2014, 14: 327) は、pGreen又はpCAMBIA骨格並びにgRNAをベースとしてCRISPR-Cas9バイナリーベクターセットを開発した。このツールキットは、BsaIの他には制限酵素を必要とすることなしに、トウモロコシコドン最適化Cas9及び1つ以上のgRNAを有する最終構築物を僅か1回のクローニングステップで効率良く生成する。このツールキットはトウモロコシプロトプラスト、トランスジェニックトウモロコシ株及びトランスジェニックアラビドプシス属 (Arabidopsis) 株を用いて実証され、高い効率及び特異性を呈することが示された。更に重要なことには、このツールキットを使用して、T1世代のトランスジェニック実生で3つのアラビドプシス属 (Arabidopsis) 遺伝子の標的突然変異が検出された。更に、複数の遺伝子突然変異を次世代に受け継ぐことができた。植物における多重ゲノム編集用のツールキットとして、(ガイドRNA) モジュールベクターセット。本発明のCas13b系及びタンパク質を使用して、Xingが標的とする遺伝子を標的化し得る。

40

【0586】

本発明のCas13b CRISPR系は、植物ウイルスの検出に使用し得る。Gambino et al. (Phytopathology. 2006 Nov; 96 (11) : 1223-9. doi: 10.1094/PHYTO-96-1223) は増幅及びマルチプレックスPCRに依存して9つのブドウウイルスを同時検出する。本発明のCas13b系及びタンパク質を同様に使用して、宿主における複数の標的を検出し得る。

50

更に、本発明の系を使用して高価値な栽培品種におけるウイルス遺伝子発現を同時にノックダウンし、且つ発現したウイルスRNA (viral RNA) のターゲティングにより活性化又は更なる感染を防ぐことができる。

【0587】

Murray et al. (Proc Biol Sci. 2013 Jun 26; 280 (1765): 20130965. doi: 10.1098/rspb.2013.0965; 2013年8月22日発表) は12の植物RNAウイルスを分析して進化速度を調べ、恐らく異なる宿主遺伝子型間又は種間でのシフトに起因する一時的選択のエビデンスを見出した。本発明のCas13b系及びタンパク質を使用して宿主におけるかかるウイルスを標的化するか、又はそれに対して免疫を付与し得る。例えば、本発明の系を使用して、ウイルスRNA発現、従って複製を遮断することができる。また、本発明を使用して切断のため核酸 (nucleic acids) を標的化し、且つ発現又は活性化を標的化することもできる。更に、本発明の系は多重化することができ、そのため同じウイルスの複数の標的又は複数の分離株に当てることができる。

【0588】

Ma et al. (Mol Plant. 2015 Aug 3; 8 (8): 1274-84. doi: 10.1016/j.molp.2015.04.007) は、単子葉及び双子葉植物における簡便で高効率な多重ゲノム編集のための、植物コドン最適化Cas9遺伝子を利用したロバストなCRISPR-Cas9ベクター系を報告している。Ma et al. は、複数のsgRNA発現カセットを迅速に作成するためのPCRベースの手順を設計しており、これはゴールデンゲートライゲーション又はギブソンアセンブリにより1ラウンドのクローニングでバイナリーCRISPR-Cas9ベクターにアセンブルすることができる。この系で、Ma et al. はコメの46ヵ所の標的部位を編集し、平均85.4%の突然変異率で、ほとんどがニアレル及びホモ接合状態であった。Ma et al. は、遺伝子ファミリーの複数の(最大8個の)メンバー、生合成経路の複数の遺伝子又は単一遺伝子内の複数の部位を同時に標的化することにより、T0コメ及びT1アラビドプシス属 (Arabidopsis) 植物の機能喪失型遺伝子突然変異の例を提供している。同様に、本発明のCas13b系は複数の遺伝子の発現を同時に差次的に (differentially) 標的化することができる。

【0589】

Lowder et al. (Plant Physiol. 2015 Aug 21. pii: pp. 00636. 2015) も植物における発現した、サイレンシングされた又は非コードの遺伝子の多重ゲノム編集及び転写調節を可能にするCRISPR-Cas9ツールボックスを開発した。このツールボックスは、ゴールデンゲート及びゲートウェイクローニング方法を用いて単子葉類及び双子葉類のための機能性CRISPR-Cas9-T-DNA構築物を迅速且つ効率的にアセンブルするためのプロトコル及び試薬を研究者に提供する。これは、植物内因性遺伝子の多重遺伝子編集及び転写活性化又は抑制を含め、完全な一揃いの能力を備えている。T-DNAベースの形質転換技術は、現代の植物バイオテクノロジー、遺伝学、分子生物学及び生理学の基礎である。そのため、本発明者らは、Cas9 (WT、ニックアーゼ又はdCas9) 及びgRNAを目的のデスティネーションT-DNAベクターにアセンブルする方法を開発した。このアセンブル方法は、ゴールデンゲートアセンブリ及びマルチサイトゲートウェイ組換えの両方に基づく。アセンブリには3つのモジュールが必要である。第1のモジュールはCas9エントリーベクターであり、これは、attL1及びattR5部位が隣接したプロモーターレスCas9又はその誘導遺伝子を含む。第2のモジュールはgRNAエントリーベクターであり、これは、attL5及びattL2部位が隣接したエントリーgRNA発現カセットを含む。第3のモジュールは、Cas9発現用に選択されたプロモーターを提供するattR1-attR2含有デスティネーションT-DNAベクターを含む。Lowder et al. のツールボックスは、本発明のCas13bエフェクタータンパク質系に適用し得る。

10

20

30

40

50

【0590】

酵母及び微細藻類などの生物は、合成生物学に広く用いられている。Stovicek et al. (Metab. Eng. Comm., 2015; 2:13は、工業生産用のロバストな株を効率的に作製するための工業用酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) のゲノム編集について記載している。Stovicekは、酵母にコドン最適化されたCRISPR-Cas9系を使用して内因性遺伝子の両方のアレルを同時に破壊し、異種遺伝子をノックインした。ゲノム又はエピソーム2 μ 系ベクター位置からCas9及びgRNAを発現させた。この著者らは、Cas9及びgRNA発現レベルを最適化することにより遺伝子破壊効率を改善できたことも示した。Hlavova et al. (Biotechnol. Adv. 2015)は、挿入突然変異誘発及びスクリーニングのため核及び葉緑体遺伝子を標的化するCRISPRなどの技法を用いた微細藻類の種又は株の開発を考察している。本発明のCas13b系に同じプラスミド及びベクターを適用することができる。

10

【0591】

Petersen ("Towards precisely glycol engineered plants", Plant Biotech Denmark Annual meeting 2015, Copenhagen, Denmark)は、所望の翻訳後修飾を有するタンパク質及び産物の産生のため、CRISPR/Cas9を用いてアラビドプシス属 (*Arabidopsis*) におけるゲノム変化をエンジニアリングする方法、例えばアラビドプシス属 (*Arabidopsis*) を糖鎖エンジニアリングする方法を開発した。Hebelstrup et al. (Front Plant Sci. 2015 Apr 23; 6:247)は、デンプン修飾酵素を発現し、且つ通常はデンプンを工業的に化学処理及び／又は物理処理することによって作られる生産物を直接産生する作物を提供するインプラントでのデンプンバイオエンジニアリングを概説している。Petersen及びHebelstrupの方法は、本発明のCas13bエフェクタータンパク質系に適用し得る。

20

【0592】

Kurth et al., J Virol. 2012 Jun; 86(11):6002-9. doi:10.1128/JVI.00436-12. Epub 2012 Mar 21)は、ゲノムの遺伝的改変なしにブドウに所望の形質を導入するためのRNAウイルスベースのベクターを開発した。このベクターは、ウイルス誘導性遺伝子サイレンシングによって内因性遺伝子の発現を調節する能力をもたらした。本発明のCas13b系及びタンパク質を使用して、ゲノムの遺伝的改変なしに遺伝子及びタンパク質をサイレンシングすることができる。

30

【0593】

ある実施形態において、植物はマメ科植物であり得る。本発明は、本明細書に開示されるCRISPR-Cas系を利用して、例えば、限定なしに、ダイズ、エンドウマメ及びピーナッツを調査及び改変し得る。Curtin et al. がマメ科植物機能ゲノミクス用のツールボックスを提供している (Curtin et al., "A genome engineering toolbox for legume Functional genomics", International Plant and Animal Genome Conference XXII 2014を参照されたい)。CurtinはCRISPRの遺伝子形質転換を用いて単一コピーをノックアウト／ノックダウンし、毛状根及び全植物系の両方でマメ科植物遺伝子を複製した。標的遺伝子のうちのあるものは、ノックアウト／ノックダウン系 (例えば、フィトエンデサチュラーゼ) の特徴を調査し及び最適化するために選択される一方、別のものは、アラビドプシス属 (*Arabidopsis*) ダイサー様遺伝子とのダイズ相同性によるか、又はウマゴヤシ属 (*Medicago*) における根粒形成のゲノムワイド関連分析によって同定された。本発明のCas13b系及びタンパク質をノックアウト／ノックダウン系に使用することができる。

40

50

【0594】

ピーナッツアレルギー及び一般にマメ科植物に対するアレルギーは、実在する重大な健康問題である。本発明のCas13bエフェクタータンパク質系を使用して、かかるマメ科植物のアレルゲンタンパク質をコードする遺伝子を同定し、次にそれを編集し又はサイレンシングすることができる。かかる遺伝子及びタンパク質に関して限定なしに、Nicolaou et al. が、ピーナッツ、ダイズ、レンズマメ、エンドウマメ、ルピナス、サヤマメ及びヤエナリのアレルゲンタンパク質を同定している。Nicolaou et al., Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology 2011; 11 (3): 222) を参照されたい。

10

【0595】

有利な実施形態において、植物は樹木であり得る。本発明は、本明細書に開示されるCRISPR-Cas系を草本系にも利用し得る（例えば、Belhaj et al., Plant Methods 9: 39及びHarrison et al., Gene & Development 28: 1859-1872を参照されたい）。特に有利な実施形態において、本発明のCRISPR-Cas系は樹木における一塩基変異多型（SNP）を標的化し得る（例えば、Zhou et al., New Phytologist, Volume 208, Issue 2, pages 298-301, October 2015を参照されたい）。Zhou et al. の研究では、著者らは事例研究として4-クマル酸：CoAリガーゼ（4CL）遺伝子ファミリーを用いて木本多年生ポプルス属（Populus）でCRISPR-Cas系を適用し、標的化した2つの4CL遺伝子について100%の突然変異効率を達成しており、ここで、調べた形質転換体は、全て二対立遺伝子改変を有していた。Zhou et al. の研究では、CRISPR-Cas9系は一塩基変異多型（SNP）に対する感受性が極めて高く、標的配列中のSNPに起因して3番目の4CL遺伝子の切断が無効になった。これらの方法は、本発明のCas13bエフェクタータンパク質系に適用し得る。

20

【0596】

Zhou et al. (New Phytologist, Volume 208, Issue 2, pages 298-301, October 2015) の方法は、以下のとおり本発明に適用し得る。それぞれリグニン及びフラボノイド生合成に関連する2つの4CL遺伝子、4CL1及び4CL2が、CRISPR-Cas9編集の標的とされる。ルーチンで形質転換に用いられるポプルス・トレムラ×アルバクローン（Populus tremula x alba clone）717-1B4は、ゲノムシーケンシングされたポプルス・トリコカルパ（Populus trichocarpa）からの分岐である。従って、参照ゲノムから設計された4CL1及び4CL2 gRNAをインハウスの717 RNA-Seqデータで調べることで、Cas効率を制限し得るSNPがないことを確認する。4CL5用に設計された、4CL1のゲノムデュプリケートである第3のgRNAも含める。対応する717配列は各対立遺伝子のPAMの近傍／その内部に1つのSNPを有し、これらの両方は、4CL5-gRNAによるターゲティングを無効にするものと思われる。3つ全てのgRNA標的部位が第1のエクソン内に位置する。717形質転換について、ウマゴヤシ属（Medicago）U6.6プロモーターからgRNAが、バイナリーベクター中でCaMV 35Sプロモーターの制御下にあるコドン最適化ヒトCasと共に発現する。Casのみのベクターによる形質転換が対照としての役割を果たし得る。無作為に選択した4CL1及び4CL2株をアンプリコンシーケンシングに供する。次に、データを処理し、全ての場合において二対立遺伝子突然変異を確認する。これらの方法は、本発明のCas13bエフェクタータンパク質系に適用し得る。

30

40

【0597】

植物では、病原体は多くの場合に宿主特異的である。例えば、フザリウム・オキシスポラム・f・エスピー・リコベルシシ（Fusarium oxysporum f. sp

50

. lycopersici) はトマト萎凋病を引き起こすが、攻撃するのはトマトのみであり、F. オキシスポラム・f・ジアンチ (F. oxysporum f. dianthii)、プクシニア・グラミニス・f・エスピー・トリチシ (Puccinia graminis f. sp. tritici) はコムギのみを攻撃する。植物は既存の誘導防御を有して多くの病原体に抵抗する。特に病原体が植物より高い頻度で複製することに伴い、植物世代間での突然変異及び組換えイベントが、感受性を生じさせる遺伝的変異性をもたらす。植物には非宿主抵抗性が存在することもあり、例えばその宿主と病原体とが適合しない。また、水平抵抗性、例えば典型的には多くの遺伝子によって制御される、あらゆる病原体系統に対する部分抵抗性及び垂直抵抗性、例えば典型的には数個の遺伝子によって制御される、他の系統に対しては存在しない、一部の病原体系統に対する完全抵抗性も存在し得る。遺伝子対遺伝子レベルでは、植物と病原体とは共に進化し、一方の遺伝的变化が他方の変化と均衡する。従って、育種家は自然変異性を用いて、収穫量、品質、均一性、耐寒性、抵抗性に関して最も有用な遺伝子をかけ合わせる。抵抗性遺伝子の供給源には、天然又は外来品種、在来品種、野生植物の近縁種及び誘発突然変異（例えば、突然変異誘発物質による植物材料の処理）が含まれる。本発明を用いることで、突然変異を誘発する新規の手段が植物育種家に提供される。従って、当業者は抵抗性遺伝子の供給源のゲノムを分析し、且つ所望の特性又は形質を有する品種において本発明を用いることにより、これまでの突然変異誘発物質より高い精度で抵抗性遺伝子の産生を誘発し、従って植物育種プログラムを加速及び改善することができる。

10

【0598】

20

本明細書及び上記で他に考察される植物に加えて、提供されるとおりの、エフェクタータンパク質及び好適なガイドによって改変されたエンジニアリング植物及びその子孫。これには、コムギ、オオムギ、コメ、ダイズ又はトウモロコシなど、病害又は干ばつ耐性作物；自家授粉能力を取り除き又は低下させるように改変された（しかし、代わりに、任意選択で、代わりに雑種形成する）植物；及びエフェクタータンパク質及び好適なガイドによるターゲティングによって免疫原性タンパク質が無効になった、破壊された、又は断たれたピーナッツ及び堅果などのアレルギー誘発性食品が含まれる。

【0599】

治療処置

本発明の系は、本願がこの系を情報に基づいてエンジニアリングするための基礎を提供するため、本開示から、過度の実験を行うことなく、治療、アッセイ及び他の適用を含めた旧RNA切断技術の領域において適用することができる。本発明は、RNAの過剰発現、毒性RNA及び／又は突然変異したRNA（例えば、スプライシング欠損又はランケーションなど）によって引き起こされる疾患の治療処置を提供する。毒性RNAの発現は、核封入体の形成及び脳、心臓又は骨格筋における遅発性変性変化に関連し得る。最もよく研究された例、筋強直性ジストロフィーでは、毒性RNAの主要な病原性効果は、結合タンパク質を隔離し、且つ選択的スプライシングの調節を損なうことと見られる (Hum. Mol. Genet. (2006) 15 (suppl 2): R162-R169)。筋強直性ジストロフィー [筋緊張性異栄養症 (DM)] は、極めて幅広い臨床的特徴を生じるため、遺伝学者にとって特に興味深い。一部を挙げれば、筋肉の消耗、白内障、インスリン抵抗性、精巣萎縮、心伝導の減速、皮膚腫瘍及び認知への効果であろう。現在DM1型 (DM1) と呼ばれている古典的形態のDMは、細胞質タンパク質キナーゼをコードする遺伝子DMPKの3'非翻訳領域 (UTR) におけるCTGリピートの伸長によって引き起こされる。

30

40

【0600】

以下の表は、DM1骨格筋、心臓又は脳に選択的スプライシングの誤調節があることが示されているエクソンのリストを提示する。

【表 3】

組織/遺伝子 標的		参考文献	
骨格筋			
ALP	エクソン 5a, 5b	Lin X., et al. Failure of MBNL1-dependent postnatal splicing transitions in myotonic dystrophy. Hum. Mol. Genet 2006;15:2087-2097	
CAPN3	エクソン 16	Lin X., et al. Failure of MBNL1-dependent postnatal splicing transitions in myotonic dystrophy. Hum. Mol. Genet 2006;15:2087-2097	10
CLCN1	イントロン 2, エクソン 7a, 8a	Mankodi A., et al. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. Mol. Cell 2002;10:35-44 Charlet-B N., et al. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. Mol. Cell 2002;10:45-53	
FHOS	エクソン 11a	Lin X., et al. Failure of MBNL1-dependent postnatal splicing transitions in myotonic dystrophy. Hum. Mol. Genet 2006;15:2087-2097	20
GFAT1	エクソン 10	Lin X., et al. Failure of MBNL1-dependent postnatal splicing transitions in myotonic dystrophy. Hum. Mol. Genet 2006;15:2087-2097	
IR	エクソン 11	Savkur R.S., et al. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. Nat. Genet. 2001;29:40-47	
MBNL1	エクソン 7	Lin X., et al. Failure of MBNL1-dependent postnatal splicing transitions in myotonic dystrophy. Hum. Mol. Genet 2006;15:2087-2097	
MBNL2	エクソン 7	Lin X., et al. Failure of MBNL1-dependent postnatal splicing transitions in myotonic dystrophy. Hum. Mol. Genet 2006;15:2087-2097	30
MTMR1	エクソン 2.1, 2.2	Buj-Bello A., et al. Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells. Hum. Mol. Genet. 2002;11:2297-2307	
NRAP	エクソン 12	Lin X., et al. Failure of MBNL1-dependent postnatal splicing transitions in myotonic dystrophy. Hum. Mol. Genet 2006;15:2087-2097	
RYR1	エクソン 70	Kimura T., et al. Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase in myotonic dystrophy type 1. Hum. Mol. Genet. 2005;14:2189-2200	40
SERCA1	エクソン 22	Kimura T., et al. Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase in myotonic dystrophy type 1. Hum. Mol. Genet. 2005;14:2189-2200 Lin X., et al. Failure of MBNL1-dependent postnatal splicing transitions in myotonic dystrophy. Hum. Mol. Genet 2006;15:2087-2097	

組織/遺伝子 標的

参考文献

骨格筋

z-タイチン	エクソン Zr4, Zr5	Lin X., et al. Failure of MBNL1-dependent postnatal splicing transitions in myotonic dystrophy. Hum. Mol. Genet 2006;15:2087-2097
m-タイチン	M 線エクソン 5	Lin X., et al. Failure of MBNL1-dependent postnatal splicing transitions in myotonic dystrophy. Hum. Mol. Genet 2006;15:2087-2097
TNNT3	胎児性エクソン	Kanadia R.N., et al. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. Science 2003;302:1978-1980
ZASP	エクソン 11	Lin X., et al. Failure of MBNL1-dependent postnatal splicing transitions in myotonic dystrophy. Hum. Mol. Genet 2006;15:2087-2097

10

心臓

TNNT2	エクソン 5	Philips A.V., et al. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. Science 1998;280:737-741
ZASP	エクソン 11	Mankodi A., et al. Nuclear RNA foci in the heart in myotonic dystrophy. Circ. Res. 2005;97:1152-1155
m-タイチン	M 線エクソン 5	Mankodi A., et al. Nuclear RNA foci in the heart in myotonic dystrophy. Circ. Res. 2005;97:1152-1155
KCNAB1	エクソン 2	Mankodi A., et al. Nuclear RNA foci in the heart in myotonic dystrophy. Circ. Res. 2005;97:1152-1155
ALP	エクソン 5	(Mankodi A., et al. Nuclear RNA foci in the heart in myotonic dystrophy. Circ. Res. 2005;97:1152-1155

20

脳

TAU	エクソン 2, エクソン 10	Sergeant N., et al. Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. Hum. Mol. Genet. 2001;10:2143-2155 Jiang H., et al. Myotonic dystrophy type 1 associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins, and deregulated alternative splicing in neurons. Hum. Mol. Genet. 2004;13:3079-3088
APP	エクソン 7	Jiang H., et al. Myotonic dystrophy type 1 associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins, and deregulated alternative splicing in neurons. Hum. Mol. Genet. 2004;13:3079-3088
NMDAR1	エクソン 5	Jiang H., et al. Myotonic dystrophy type 1 associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins, and deregulated alternative splicing in neurons. Hum. Mol. Genet. 2004;13:3079-3088

30

40

【 0 6 0 1 】

本発明の酵素は、過剰発現 RNA 又は毒性 RNA、例えば DMPK 遺伝子など、又は例えば上記の表にある、DM1 骨格筋、心臓又は脳における誤調節された選択的スプライシ

50

ングのいずれかを標的化し得る。

【0602】

本発明の酵素は、以下の表に示されるとおりの疾患を引き起こすRNA依存的機能に影響を及ぼすトランス作用性突然変異も標的化し得る（Cell. 2009 Feb 20; 136(4): 777-793に要約されている）。

【表 4】

疾患	遺伝子 / 突然変異	機能
プラダー・ウィリー症候群	SNORD116	リボソームバイオジェネシス
脊髄性筋萎縮症(SMA)	SMN2	スプライシング
先天性角化異常症(X連鎖性)	DKC1	テロメラーゼ / 翻訳
先天性角化異常症(常染色体優性)	TERC	テロメラーゼ
先天性角化異常症(常染色体優性)	TERT	テロメラーゼ
ダイヤモンド・ブラックファン貧血	RPS19, RPS24	リボソームバイオジェネシス
シュワックマン・ダイヤモンド症候群	SBDS	リボソームバイオジェネシス
トリーチャー・コリンズ症候群	TCOF1	リボソームバイオジェネシス
前立腺癌	SNHG5	リボソームバイオジェネシス
筋強直性ジストロフィー, 1 型 (DM1)	DMPK (RNA 機能獲得)	プロテインキナーゼ
筋強直性ジストロフィー 2 型 (DM2)	ZNF9 (RNA 機能獲得)	RNA 結合
脊髄小脳失調症 8 型(SCA8)	ATXN8 / ATXN8OS (RNA 機能獲得)	不明 / 非コード RNA
ハンチントン病様 2 (HDL2)	JPH3 (RNA 機能獲得)	イオンチャネル機能
脆弱 X 関連振戦失調症候群 (FXTAS)	FMR1 (RNA 機能獲得)	翻訳 / mRNA 局在
脆弱 X 症候群	FMR1	翻訳 / mRNA 局在
X連鎖性精神遅滞	UPF3B	翻訳/ ナンセンス媒介性崩壊
咽頭型筋ジストロフィー (OPMD)	PABPN1	3'末端形成
ヒト色素性遺伝性皮膚症	DSRAD	編集
網膜色素変性症	PRPF31	スプライシング
網膜色素変性症	PRPF8	スプライシング
網膜色素変性症	HPRP3	スプライシング
網膜色素変性症	PAP1	スプライシング

10

20

30

40

疾患	遺伝子 / 突然変異	機能
軟骨毛髪形成不全症(劣性)	RMRP	スプライシング
自閉症	7q22-q33 遺伝子座切断点	非コード RNA
ベックウィズ・ウィーデマン症候群(BWS)	H19	非コード RNA
シャルコー・マリー・トゥース(CMT)病	GRS	翻訳
シャルコー・マリー・トゥース(CMT)病	YRS	翻訳
筋萎縮性側索硬化症(ALS)	TARDBP	スプライシング、転写
白質消失を伴う白質脳症	EIF2B1	翻訳
ウォルコット・ラリソン症候群	EIF2AK3	翻訳(プロテアーゼ)
ミトコンドリアミオパチー及び鉄芽球性貧血(MLASA)	PUS1	翻訳
脳筋症及び肥大型心筋症	TSFM	翻訳(ミトコンドリア)
遺伝性痙性対麻痺	SPG7	リボソームバイオジェネシス
白質脳症	DARS2	翻訳(ミトコンドリア)
真性糖尿病に対する感受性	LARS2	翻訳(ミトコンドリア)
難聴	MTRNR1	リボソームバイオジェネシス(ミトコンドリア)
MELAS 症候群、難聴	MTRNR2	リボソームバイオジェネシス(ミトコンドリア)
癌	SFRS1	スプライシング、翻訳、核外移行
癌	RBM5	スプライシング
複合障害	ミトコンドリア tRNA 突然変異	翻訳(ミトコンドリア)
癌	miR-17-92 クラスター	RNA 干渉
癌	miR-372 / miR-373	RNA 干渉

本発明の酵素は、原発性年齢関連タウオパチー（P A R T）／神経原線維変化優位型老年性認知症（A Dと同様のN F Tを伴うがブラークがない）、ボクサー痴呆（慢性外傷性脳症）、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、17番染色体に連鎖する前頭側頭型認知症及びパーキンソンニズム、リティコーボディグ病（グアム島パーキンソン認知症複合）、神経節腫及び神経節細胞腫、髄膜血管腫症、脳炎後パーキンソンニズム、亜急性硬化性全脳炎並びに鉛脳症、結節性硬化症、ハレルフォルデン・スパッツ病及びリポフスチン沈着症、アルツハイマー病など、原発性及び二次性タウオパチーを含め、様々なタウオパチーの治療においても使用し得る。本発明の酵素は、スプライシング欠損及び疾患を引き起こす、シス作用スプライシングコードを破壊する突然変異も標的とし得る（C e l l . 2 0 0 9 F e b 2 0 ; 1 3 6 (4) : 7 7 7 - 7 9 3 に要約されている）。運動ニューロン変性疾患SMAはSMN1遺伝子の欠失によって起こる。残るSMN2遺伝子はエクソン7にC→T置換を有し、これがエクソンスプライシングエンハンサー（E S E）を不活性化してエクソンスプライシングサイレンサー（E S S）を作り出し、エクソン7のスキッピング及びトランケート型タンパク質（SMNΔ7）につながる。同時にジストロフィン遺伝子のエクソン31におけるT→A置換が未熟終止コドン（S T O P）及びE S Sを作り出し、エクソン31のスキッピングにつながる。エクソン31が欠損したmRNAは部分的に機能性のタンパク質を産生するため、この突然変異は軽症型のDMDを引き起こす。タウタンパク質をコードするM A P T遺伝子のエクソン10の範囲内及び下流における突然変異はスプライシング調節エレメントに影響を及ぼし、エクソン10をインクルージョン又はエクスクルージョンするmRNAの正常な1:1比を破壊させる。この結果、4つ又は3つのいずれかの微小管結合ドメインを含有するタウタンパク質（それぞれ4 Rタウ及び3 Rタウ）の間の均衡が乱れ、神経病理学的障害F T D P - 1 7が引き起こされる。示される例はN 2 7 9 K突然変異であり、これはE S E機能を亢進させて、エクソン10のインクルージョン及び4 Rタウが増加する方への均衡のシフトを促進する。C F T R遺伝子エクソン9の3'スプライス部位内における多型（U G）m（U）nトラクトはエクソン9インクルージョンの程度及び完全長機能タンパク質のレベルに影響を与え、C F T R遺伝子の他の部分の突然変異によって引き起こされる嚢胞性線維症（C F）の重症度を改変する。

【0604】

自然免疫系は、主に感染細胞内部のウイルス核酸を認識することによりウイルス感染を検出し、これはDNA又はRNAセンシングと称される。インビトロRNAセンシングアッセイを用いると、特異的RNA基質を検出することができる。例えば、生細胞におけるRNAベースのセンシングにRNAターゲティングエフェクタータンパク質を使用することができる。適用の例は、例えば、疾患特異的RNAのセンシングによる診断法である。

【0605】

本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質は、抗ウイルス活性、詳細にはRNAウイルスに対する抗ウイルス活性に更に使用することができる。選択のウイルスRNA配列に選択的な好適なガイドRNAを使用してエフェクタータンパク質をウイルスRNAに標的化することができる。詳細には、エフェクタータンパク質は、一本鎖RNAなどのRNAを切断する活性ヌクレアーゼであり得る。従って、抗ウイルス剤としての本発明のRNAターゲティングエフェクタータンパク質の使用が提供される。

【0606】

RNA、上記で言及したRNAを標的化するための本発明の酵素系の治療投薬量は、約0.1～約2mg/kgであることが企図され、これらの投薬量は、応答をモニタしながら、必要に応じて繰り返しの投薬量で患者1人当たり約7～10用量まで逐次的に投与され得る。有利には、治療レジメン中に各患者から試料が採取され、治療の有効性が確認される。例えば、RNA試料は分離及び定量化され、発現が低下しているか、又は改善しているかどうか判断され得る。かかる診断法は当業者の範囲内にある。

【0607】

転写物検出方法

10

20

30

40

50

本発明のエフェクタータンパク質及び系は、細胞又は他の試料中のRNAの特異的検出に有用である。目的のRNA標的の存在下では、ガイド依存性Cas13bヌクレアーゼ活性に、コラテラル標的に対する非特異的RNAアーゼ活性が付随し得る。このRNAアーゼ活性を利用するには、検出可能に切断されることのできるレポーター基質があれば十分である。例えば、レポーター分子は、一端に蛍光レポーター分子（fluor）及び他端に消光剤のタグを付加したRNAを含み得る。Cas13b RNAアーゼ活性が存在しない場合、消光剤が物理的に近接しているため、fluorからの蛍光は低レベルに抑えられる。目的のRNA標的及び好適なガイドRNAの存在によってCas13bの標的特異的切断が活性化されると、RNA含有レポーター分子は非特異的に切断され、fluorと消光剤とが空間的に分離される。これにより、適切な波長の光で励起したとき、fluorが検出可能シグナルを発する。

10

【0608】

ある態様において、本発明は、RNAターゲティングエフェクター；対応するRNA標的に結合するように設計された1つ以上のガイドRNA；及びRNAベースの切断誘導可能レポーター構築物を含む（標的）RNA検出系に関する。別の態様において、本発明は、試料中の（標的）RNAの検出方法に関し、この方法は、RNAターゲティングエフェクター、前記（標的）RNAに結合するように設計された1つ以上のガイドRNA及びRNAベースの切断誘導可能レポーター構築物を前記試料に加えることを含む。更なる態様において、本発明は、本明細書に定義するとおりの（標的）RNA検出系を含むキット又は装置又は少なくともRNAターゲティングエフェクターとRNAベースの切断誘導可能レポーター構築物とを含むキット又は装置に関する。更なる態様において、本発明は、（標的）RNA検出のための本明細書に定義するとおりのRNAターゲティング系又はキット又は装置の使用に関する。RNAターゲティングエフェクターは、特定の実施形態では、RNAガイド下RNAアーゼである。特定の実施形態において、RNAターゲティングエフェクターはCRISPRエフェクターである。特定の実施形態において、RNAターゲティングエフェクターはクラス2 CRISPRエフェクターである。特定の実施形態において、RNAターゲティングエフェクターはクラス2 VI-B型CRISPRエフェクターである。好ましい実施形態において、RNAターゲティングエフェクターはCas13bである。特定の実施形態において、RNAターゲティングエフェクター、好ましくはCas13bは、本明細書において他の部分に記載されるとおりの種に由来する。本明細書に記載されるとおりの前記（標的）RNAに結合するように設計されたガイドRNAはRNAターゲティングエフェクターと複合体を形成可能であり、及び前記複合体中のガイドRNAは標的RNA分子に結合可能であり、同様に本明細書の他の部分に記載されるとおり、それにより標的RNAが切断されることが理解されるであろう。ガイドRNAは、典型的には、本明細書において他の部分に記載されるとおり、ガイド配列及びダイレトリピートを含むことが理解されるであろう。特定の実施形態において、1つ以上のガイドRNAは、疾患状態の診断指標となる1つ以上の標的分子に結合するように設計される。特定の実施形態において、疾患状態は、ウイルス、細菌、真菌又は寄生虫感染症など、感染症である。特定の実施形態において、疾患状態は異常な（標的）RNA発現によって特徴付けられる。特定の実施形態において、疾患状態は癌である。特定の実施形態において、疾患状態は自己免疫疾患である。RNAベースの切断誘導可能レポーター構築物はRNAを含み、RNAが切断されると検出可能なリードアウトが生じ、即ちRNAの切断時に検出可能シグナルが生成される。特定の実施形態において、RNAベースの切断誘導可能レポーター構築物は蛍光色素及び消光剤を含む。当業者は、種々のタイプの蛍光色素及び対応する消光剤が使用され得ることを理解するであろう。当業者は、本RNA切断レポーター構築物での使用に適し得る他のタイプの誘導可能レポーター系を容易に想定するであろう。

20

30

40

【0609】

1つの例示的アッセイ方法では、Cas13bエフェクター、目的の標的に特異的なガイドRNA及びレポーター分子が細胞試料に加えられる。蛍光の増加が目的のRNA標的

50

の存在を示す。別の例示的な方法では、検出アレイが提供される。アレイ上の各位置に Cas13b エフェクター、レポーター分子及び目的の標的に特異的なガイド RNA が提供される。実施するアッセイに応じて、アレイの各位置における目的の標的に特異的なガイド RNA は同じであるか、異なるか、又はこれらの組み合わせであり得る。例えば、単一の供給源試料中にある 1 つ以上の標的を試験することが所望される場合、目的の標的に特異的なガイド RNA は異なるものが提供され得る。例えば、同じ標的に関して複数の試料を試験することが所望される場合、目的の標的に特異的なガイド RNA は各位置に同じものが提供され得る。

【0610】

本明細書で使用されるとき、「マスキング構築物」は、本明細書に記載される活性化 CRISPR 系エフェクタータンパク質によって切断されるか、又は他の方法で不活性化されることのできる分子を指す。特定の例示的实施形態において、マスキング構築物は RNA ベースのマスキング構築物である。マスキング構築物は正の検出可能シグナルの生成又は検出を防ぐ。正の検出可能シグナルは、当該技術分野において公知の光学、蛍光、化学発光、電気化学又は他の検出方法を用いて検出し得る任意のシグナルであり得る。マスキング構築物は、マスキング構築物が除去されるか、又は他の方法でサイレンシングされるまで、検出可能な正のシグナルの生成を防ぐか、又はその存在をマスキングし得る。用語「正の検出可能シグナル」は、マスキング構築物の存在下で検出可能であり得る他の検出可能シグナルと区別するために使用される。例えば、特定の实施形態において、マスキング剤が存在するとき、第 1 のシグナルが検出され得（即ち負の検出可能シグナル）、これは、次に、活性化 CRISPR エフェクタータンパク質による標的分子の検出並びにマスキング剤の切断又は不活性化に伴い第 2 のシグナル（例えば、正の検出可能シグナル）に変換される。

【0611】

特定の例示的实施形態において、マスキング構築物は遺伝子産物の生成を抑制し得る。遺伝子産物は、試料に加えられるレポーター構築物によってコードされ得る。マスキング構築物は、shRNA 又は siRNA など、RNA 干渉経路に関わる干渉性 RNA であり得る。マスキング構築物は、マイクロ RNA (miRNA) も含み得る。存在する間は、マスキング構築物は遺伝子産物の発現を抑制する。遺伝子産物は、マスキング構築物の存在がなければ本来標識プローブ又は抗体によって検出可能であろう蛍光タンパク質又は他の RNA 転写物若しくはタンパク質であり得る。エフェクタータンパク質の活性化に伴いマスキング構築物が切断されるか、又は他の方法でサイレンシングされて、正の検出可能シグナルとしての遺伝子産物の発現及び検出が可能となる。

【0612】

特定の例示的实施形態において、マスキング構築物は、検出可能な正のシグナルを生成するのに必要な 1 つ以上の試薬を隔離し得、従ってマスキング構築物から 1 つ以上の試薬が放出されると、検出可能な正のシグナルが生成されることになる。1 つ以上の試薬を組み合わせて比色シグナル、化学発光シグナル、蛍光シグナル又は任意の他の検出可能シグナルを生じさせ得、かかる目的に好適であることが公知の任意の試薬を含み得る。特定の例示的实施形態において、1 つ以上の試薬は、1 つ以上の試薬に結合する RNA アプタマーによって隔離される。1 つ以上の試薬は、標的分子の検出に伴いエフェクタータンパク質が活性化されると放出される。特定の例示的实施形態において、1 つ以上の試薬は、1 つ以上の RNA アプタマーをタンパク質に結合させることによってタンパク質が検出可能シグナルを生成できないように阻害又は隔離される検出可能シグナル、例えば比色、化学発光又は蛍光シグナルなどの生成を促進可能な酵素などのタンパク質である。本明細書に開示されるエフェクタータンパク質が活性化すると、RNA アプタマーは、タンパク質が検出可能シグナルを生成する能力をもはや阻害しない程度まで切断又は分解される。

【0613】

一実施形態において、シグナル増幅酵素としてトロンピンが、例えば以下の配列：GGGACAAAGCUGAAGUACUUACCC を有する阻害性アプタマーと共に使用

される。このアプタマーが切断されるとトロンビンが活性になり、ペプチド比色基質（例えば、[www. sigmaaldrich. com/catalog/product/sigma/t3068?lang=en&region=US](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t3068?lang=en&region=US)を参照されたい）又は蛍光基質（例えば、[www. sigmaaldrich. com/catalog/product/sigma/b9385?lang=en&region=US](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b9385?lang=en&region=US)を参照されたい）を切断することになる。比色基質のパラニトロアニリド（pNA）が、トロンビンのペプチド基質に共有結合的に連結される。トロンビンによって切断されると、pNAが放出されて色が黄色に変わり、肉眼で容易に見ることができる。蛍光基質も同様の原理によって機能し、トロンビンによって切断されると、蛍光検出器を使用して検出することのできる青色フルオロフォア、7-アミノ-4-メチルクマリンを放出する。トロンビンの代替としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、 β -ガラクトシダーゼ及び仔ウシアルカリホスファターゼ（CAP）が挙げられ、これらも同様に比色又は蛍光シグナルの生成に使用し、阻害性アプタマーによって阻害することができる。

10

【0614】

特定の例示的实施形態では、マスキング構築物が個々の個別的な容量（以下に更に定義する）で固体基質上に固定化されて、単一の試薬を隔離し得る。例えば、試薬は、色素を含むビーズであり得る。固定化された試薬によって隔離されると、個々のビーズが過剰に拡散しているため検出可能シグナルは生成されないが、マスキング構築物から放出されると、例えば凝集によるか、又は単純に溶液濃度の増加により、検出可能シグナルの生成が可能となる。特定の例示的实施形態において、固定化されるマスキング剤は、標的分子の検出に伴い活性化エフェクタータンパク質によって切断されることができるRNAベースのアプタマーである。

20

【0615】

特定の他の例示的实施形態において、マスキング構築物は溶液中の固定化試薬に結合し、それにより溶液中に遊離している別個の標識結合パートナーに結合する試薬の能力を遮断する。従って、試料に洗浄ステップを適用すると、標的分子が存在しない場合、標識結合パートナーを試料から洗い流すことができる。しかしながら、エフェクタータンパク質が活性化された場合、マスキング構築物は、マスキング構築物が試薬に結合する能力に干渉するのに十分な程度に切断され、それにより標識結合パートナーによる固定化試薬への結合が可能となる。従って、標識結合パートナーは洗浄ステップの後も残り、試料中の標的分子の存在を指示する。特定の態様において、固定化試薬に結合するマスキング構築物はRNAアプタマーである。固定化試薬はタンパク質であり得、標識結合パートナー（*binding partner*）は標識抗体であり得る。代わりに、固定化試薬はストレプトアビジンであり得、標識結合パートナーは標識ビオチンであり得る。上記の実施形態において使用される結合パートナーの標識は、当該技術分野において公知の任意の検出可能標識であり得る。加えて、本明細書に記載される全体的な設計に従い他の公知の結合パートナーが使用され得る。

30

【0616】

特定の例示的实施形態において、マスキング構築物はリボザイムを含み得る。リボザイムは、触媒特性を有するRNA分子である。リボザイムは、天然のもの及びエンジニアリングされたものの両方ともRNAを含むか又はそれからなるため、これは本明細書に開示されるエフェクタータンパク質の標的となり得る。リボザイムは、負の検出可能シグナルを生成するか、又は正の対照シグナルの生成を妨げるかのいずれかの反応を触媒するように選択又はエンジニアリングされ得る。活性化エフェクタータンパク質分子によりリボザイムが失活すると、負の対照シグナルを生成するか、又は正の検出可能シグナルの生成を妨げる反応が取り除かれ、それにより正の検出可能シグナルを検出することが可能となる。一例示的实施形態において、リボザイムは比色反応を触媒して、溶液を第1の色として見えさせる。リボザイムが失活すると、次に溶液が第2の色に変わり、この第2の色が検出可能な正のシグナルである。どのようにリボザイムを比色反応の触媒に使用し得るかの例が、Zhao et al. “Signal amplification of g

40

50

lucosamine-6-phosphate based on ribozyme glms”, Biosens Bioelectron. 2014; 16: 337-42に記載され、どのようにかかるシステムを本明細書に開示される実施形態のコンテキストで機能するように改変し得るかの例を提供する。代わりに、リボザイムは、存在する場合、例えばRNA転写物の切断産物を生成することができる。従って、正の検出可能シグナルの検出は、リボザイムの非存在下に限り生成される非切断RNA転写物の検出を含み得る。

【0617】

一例示的实施形態において、マスキング構築物は、検出剤が溶液中で凝集しているか、それとも分散しているかに応じて色を変える検出剤を含む。例えば、コロイド金などの特定のナノ粒子は、凝集体から分散粒子へと移るに従い、目に見える紫色から赤色への色シフトを起こす。従って、特定の例示的实施形態では、かかる検出剤が1つ以上の架橋分子によって凝集体として保持され得る。架橋分子の少なくとも一部分はRNAを含む。本明細書に開示されるエフェクタータンパク質が活性化されると、架橋分子のRNA部分が切断されて検出剤が分散することが可能となり、対応する色の変化が起こる。特定の例示的实施形態において、架橋分子はRNA分子である。特定の例示的实施形態において、検出剤はコロイド金属である。コロイド金属材料としては、液体、ヒドロゾル又は金属ゾルに分散した水不溶性金属粒子又は金属化合物を挙げることができる。コロイド金属は、周期表のIA、IB、IIB及びIIIB族の金属並びに遷移金属、特にVII族のものから選択され得る。好ましい金属には、金、銀、アルミニウム、ルテニウム、亜鉛、鉄、ニッケル及びカルシウムが含まれる。他の好適な金属には、そのあらゆる様々な酸化状態の以下：リチウム、ナトリウム、マグネシウム、カリウム、スカンジウム、チタン、バナジウム、クロム、マンガン、コバルト、銅、ガリウム、ストロンチウム、ニオブ、モリブデン、パラジウム、インジウム、スズ、タングステン、レニウム、白金及びガドリニウムも含まれる。金属は、好ましくは適切な金属化合物に由来するイオン形態、例えば Al^{3+} 、 Ru^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 及び Ca^{2+} イオンで提供される。

【0618】

特定の他の例示的实施形態において、マスキング構築物は、検出可能標識及びその検出可能標識のマスキング剤が付加されたRNAオリゴヌクレオチドを含み得る。かかる検出可能標識／マスキング剤の組み合わせの例は、フルオロフォア及びフルオロフォアの消光剤である。フルオロフォアの消光は、フルオロフォアと別のフルオロフォア又は非蛍光性分子との間で非蛍光性複合体が形成される結果として起こり得る。この機構は、基底状態複合体形成、静的消光又は接触消光として知られる。従って、RNAオリゴヌクレオチドは、接触消光が起こるのにフルオロフォアと消光剤とが十分に近接しているように設計され得る。フルオロフォア及びそのコグネイト消光剤は、当該技術分野において公知であり、この目的で当業者が選択することができる。本発明に関連して、詳細なフルオロフォア／消光剤の組み合わせは重要でなく、フルオロフォア／消光剤の組み合わせの選択がフルオロフォアのマスキングを確実にすることのみである。本明細書に開示されるエフェクタータンパク質が活性化すると、RNAオリゴヌクレオチドが切断されて、それにより接触消光効果を維持するのに必要なフルオロフォアと消光剤との間の近接性が断たれる。従って、フルオロフォアの検出を用いて試料中の標的分子の存在を決定し得る。

【0619】

一例示的实施形態において、マスキング構築物は量子ドットを含み得る。量子ドットは、表面に付加された複数のリンカー分子を有し得る。リンカー分子の少なくとも一部分はRNAを含む。リンカー分子は一端で量子ドットに付加され、且つその長さに沿って又はリンカーの末端で1つ以上の消光剤に付加され、そのため消光剤は量子ドットの消光が起こるのに十分に近接して維持される。リンカーは分枝状であり得る。上記のとおり、量子ドット／消光剤の組み合わせは重要でなく、量子ドット／消光剤の組み合わせの選択がフルオロフォアのマスキングを確実にすることのみである。量子ドット及びそのコグネイト消光剤は、当該技術分野において公知であり、この目的で当業者が選択することができる

。本明細書に開示されるエフェクタータンパク質が活性化すると、リンカー分子のRNA部分が切断されて、それにより消光効果を維持するのに必要な量子ドットと1つ以上の消光剤との間の近接性がなくなる。一実施形態において、量子ドットは、Qdot（登録商標）625ストレプトアビジンコンジュゲート（www.thermofisher.com/order/catalog/product/A10196）など、コンジュゲートされたストレプトアビジンである。RNAはビオチンリンカーを介して付加され、消光分子を動員し、配列／5 Biosg／UCUCGUACGUUC／3 IAbRQSp／又は／5 Biosg／UCUCGUACGUUCUCUCGUACGUUC／3 IAbRQSp／〔式中、／5 Biosg／はビオチンタグであり、／3 IAbRQSp／はアイオワブラック消光剤である〕である。切断に伴い消光剤が放出されることになり、量子ドットが目に見える蛍光を発することになる。

10

【0620】

同様に、蛍光エネルギー移動（FRET）を用いて検出可能な正のシグナルを生成し得る。FRETは、エネルギー的に励起されたフルオロフォア（即ち「ドナーフルオロフォア」）からの光子によって別の分子（即ち「アクセプター」）の電子のエネルギー状態が上がり、より高い励起した一重項状態の振動準位になる無放射過程である。ドナーフルオロフォアは基底状態に戻り、そのフルオロフォアに特有の蛍光を発しなくなる。アクセプターは別のフルオロフォア又は非蛍光性分子であり得る。アクセプターがフルオロフォアである場合、移動したエネルギーは、そのフルオロフォアに特有の蛍光として放たれる。アクセプターが非蛍光性分子である場合、吸収されたエネルギーが熱として失われる。従って、本明細書に開示される実施形態のコンテキストでは、フルオロフォア／消光剤の組み合わせは、オリゴヌクレオチド分子に付加されたドナーフルオロフォア／アクセプターの組み合わせに置き換えられる。インタクトな場合、マスキング構築物は、アクセプターが発する蛍光又は熱によって検出されるとおりの第1のシグナル（負の検出可能シグナル）を生成する。本明細書に開示されるエフェクタータンパク質が活性化すると、RNAオリゴヌクレオチドが切断されてFRETが破綻するため、ここで、ドナーフルオロフォアの蛍光が検出される（正の検出可能シグナル）。

20

【0621】

RNアーゼを検出するための1つの比色リードアウトモードは、インターカレート色素に基づき、これは、長いRNAから短いヌクレオチドへの切断に応答してその吸光度を変化させる。このような特性を備える既存の色素が幾つか存在する。Wagner（1983）によれば、ピロニンYはRNAとの複合体であり、572nmの吸光度を有する複合体を形成することになる。RNAの切断により吸光度が失われ、色が変化する。Greiner-Stoeffele（1996）は同様にメチレンブルーを使用しており、RNアーゼ活性化に伴い688nmの吸光度の変化があった。

30

【0622】

別の比色リードアウトモードには、切断に伴い色が変化する核酸基質が関わる。Witmer（1991）は、切断後にレポーター基を放出する合成リボヌクレオチド基質、U-3'-BCIPを利用しており、650nmの吸光度の生成がもたらされた。

【0623】

デアミナーゼ機能化CRISPR/Cas13

40

【0624】

本発明の特定の態様及び実施形態において、本明細書に記載されるとおりのCas13タンパク質（例えば、本明細書の他の部分に記載されるものなどの任意のオルソログを含めた、Cas13a、Cas13b又はCas13cを含む）は、本明細書に記載されるとおりの任意のCas13タンパク質変異体（機能変異体、突然変異体（限定はされないが触媒不活性突然変異体を含む）、（機能性）ドメイン又はトランシェーション（スプリットCas13を含む）、Cas13融合タンパク質（例えば、NLS若しくはNES配列を含むもの又は本明細書の他の部分に記載される任意の他の融合タンパク質など）を含め、デアミナーゼ又はその機能的断片、例えばその触媒活性断片に共有結合的又は非共有結

50

合的に会合又は融合され得る。デアミナーゼは、アデノシンデアミナーゼ又はシチジンデアミナーゼであり得、好ましくは、このデアミナーゼは、RNA特異的デアミナーゼである。本明細書に記載されるとおりのデアミナーゼは、トランケート型又は突然変異型デアミナーゼであり得る。本明細書においてアデノシンデアミナーゼを参照する場合には常に、シチジンデアミナーゼにも同様の考察が適用される（及びアデニンの脱アミノ化に代えてシチジンが脱アミノ化される）ことが理解されるであろう。

【0625】

特定の態様及び実施形態において、本発明は、有利には、コドン最適化され得る、かかるCas13-デアミナーゼ融合タンパク質をコードする（又は非共有結合性の連結の場合にはCas13とデアミナーゼとを別々にコードする）ポリ核酸並びに増殖及び／又は発現、例えば原核生物又は真核生物増殖又は発現用のベクター及びベクター系に関する。例示的ポリ核酸及びベクターについては、本明細書の他の部分に記載される。

10

【0626】

特定の態様及び実施形態において、本発明は、上記に記載されるタンパク質及び／若しくはポリヌクレオチド又はベクター若しくはベクター系を含む宿主細胞（又はその子孫）、器官又は生物（又はその子供）に関する。例示的宿主細胞／器官／生物並びに発現系については、本明細書の他の部分に記載される。

【0627】

特定の態様及び実施形態において、本発明は、かかるタンパク質、ポリ核酸、ベクター又はベクター系、宿主細胞、器官又は生物を含む系、複合体又は組成物（キットを含む）、例えば医薬組成物に関する。例示的系、複合体又は組成物、例えば医薬組成物については、本明細書の他の部分に記載される。かかる系、複合体又は組成物は、任意の変異ガイドRNA（アプタマーを含むガイド誘導型を含めた、エスコート型、保護型、デッドガイド等）を含め、本明細書において他の部分に記載されるとおりのガイドRNAを更に含むことが理解されるであろう。

20

【0628】

特定の態様及び実施形態において、本発明は、かかるタンパク質、ポリ核酸、ベクター又はベクター系、宿主細胞、器官、生物、系、複合体又は組成物の使用又はその使用が関わる方法に関する。例示的方法及び使用については、本明細書の他の部分に記載される。詳細な実施形態において、本使用及び方法は、目的の標的RNA配列中のアデニン又はシチジンを改変することを含む。詳細な実施形態において、本使用又は方法は、本明細書の他の部分にも記載されるとおり、治療的又は予防的である。有利には、本使用及び方法は、標的化した塩基編集を含み得る。一態様において、本明細書に記載される発明は、GからA若しくはCからTへの点突然変異又は病原性一塩基変異多型（SNP）によって引き起こされるか又はその可能性が高い疾患状態を修復し且つ／又は予防することを目的として、標的遺伝子座におけるアデノシン残基を改変する方法を提供する。脳及び中枢神経系に発症する様々な疾患に関連する病原性のGからA又はCからTへの突然変異／SNPがClinVarデータベースに報告されている。本発明によれば、そうした突然変異／SNPの任意のものを標的とすることができる。

30

【0629】

一般に本明細書に開示される系は、ターゲティング成分と塩基編集成分とを含む。ターゲティング成分は、その中の1つ以上のヌクレオチドを編集しようとする標的ヌクレオチド配列へと塩基編集成分を特異的に標的化させる役割を果たす。次に、塩基編集成分が化学反応を触媒して標的配列中の第1のヌクレオチドを第2のヌクレオチドに変換し得る。例えば、塩基編集成分は、アデニンが細胞の転写又は翻訳機構によってグアニンとして読み取られるようなアデニンの変換又はその逆を触媒し得る。同様に、塩基編集成分は、シチジンからウラシルへの変換又はその逆を触媒し得る。特定の例示的实施形態において、塩基編集成分は、アデニンデアミナーゼ又はシチジンデアミナーゼなどの既知の塩基編集成分から出発することにより得られ、定向進化などの方法を用いて改変されて新規機能が得られる。定向進化技法は、当該技術分野において公知であり、国際公開第2015/1840

40

50

16号パンフレット「High-Throughput Assembly of Genetic Permutations」に記載されるものを挙げることができる。

【0630】

ある態様において、本発明は、(a) 触媒不活性(デッド) Cas13タンパク質、及び(b) (アデノシン) デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインであって、前記デッドCas13タンパク質に共有結合的又は非共有結合的に連結されているか又は送達後にそれに連結するように適合されている(アデノシン) デアミナーゼタンパク質、又はその触媒ドメインを含む(融合) タンパク質、又はタンパク質複合体、又はそれをコードするポリヌクレオチド(ベクター及びベクター系を含む)に関する。特定の実施形態において、(融合) タンパク質又はタンパク質複合体は、ダイレトリート配列に連結したガイド配列を含むガイド分子に結合しているか又は結合するように適合されることができ、ここで、ガイド分子は、前記デッドCas13タンパク質と複合体を形成して前記複合体による前記目的の標的RNA配列への結合を導き、前記ガイド配列は、前記アデニンを含む標的配列にハイブリダイズしてRNA二重鎖を形成する能力を有し、前記ガイド配列は、前記アデニンに対応する位置に非対合シトシンを含むため、形成されるRNA二重鎖にA-Cミスマッチが生じ、前記(アデノシン) デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインが前記RNA二重鎖の前記アデニンを脱アミノ化する。

【0631】

ある態様において、本発明は、(a) 触媒不活性(デッド) Cas13タンパク質、(b) ダイレトリート配列に連結したガイド配列を含むガイド分子、及び(c) (アデノシン) デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインを含む組成物、複合体又は系に関し、ここで、前記(アデノシン) デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、前記デッドCas13タンパク質又は前記ガイド分子に共有結合的又は非共有結合的に連結されているか、又は送達後にそれに連結するように適合され、ガイド分子は、前記デッドCas13タンパク質と複合体を形成して前記複合体による前記目的の標的RNA配列への結合を導き、前記ガイド配列は、前記アデニンを含む標的配列にハイブリダイズしてRNA二重鎖を形成する能力を有し、前記ガイド配列は、前記アデニンに対応する位置に非対合シトシンを含むため、形成されるRNA二重鎖にA-Cミスマッチが生じ、前記(アデノシン) デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインが前記RNA二重鎖の前記アデニンを脱アミノ化する。本発明は、ガイド配列を含むガイド分子又はガイド分子をコードするヌクレオチド配列、CRISPR-Casタンパク質又はCRISPR-Casタンパク質をコードする1つ以上のヌクレオチド配列、(アデノシン) デアミナーゼタンパク質若しくはその触媒ドメイン又はコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含む、目的の標的遺伝子座にあるアデニンの改変に好適である、エンジニアリングされた天然に存在しない(ベクター)系に更に関し、ここで、(アデノシン) デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、CRISPR-Casタンパク質又はガイド分子に共有結合的又は非共有結合的に連結されているか、又は送達後にそれに連結するように適合され、ガイド配列は、目的のRNAポリヌクレオチド内にあるアデニンを含む標的配列とハイブリダイズする能力を有するが、アデニンに対応する位置にシトシンを含む。

【0632】

ある態様において、本発明は、(a) 前記ガイド配列を含む前記ガイド分子をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結された第1の調節エレメント、(b) 前記触媒不活性Cas13タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結された第2の調節エレメント、及び(c) 前記第1又は第2の調節エレメントの制御下にあるか、又は第3の調節エレメントに作動可能に連結された、(アデノシン) デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む1つ以上のベクターを含む、目的の標的遺伝子座にあるアデニンの改変に好適である、エンジニアリングされた天然に存在しないベクター系に関し、ここで、(アデノシン) デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列が第3の調節エレメントに作動可能に連結されている場合、前記(アデノシン) デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、

発現後に前記ガイド分子又は前記 Cas 13 タンパク質に連結するように適合され、ここで、成分 (a)、(b) 及び (c) は、系の同じ又は異なるベクター上に位置する。

【0633】

ある態様において、本発明は、目的の標的 RNA 配列にあるアデニンを改変する方法に関する。詳細な実施形態において、この方法は、前記標的 RNA に、(a) 触媒不活性 (デッド) Cas 13 タンパク質、(b) ダイレクトリピート配列に連結したガイド配列を含むガイド分子、及び (c) (アデノシン) デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインを送達することを含み、ここで、前記 (アデノシン) デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、前記デッド Cas 13 タンパク質又は前記ガイド分子に共有結合的又は非共有結合的に連結されているか、又は送達後にそれに連結するように適合され、ガイド分子は前記デッド Cas 13 タンパク質と複合体を形成して前記複合体による前記目的の標的 RNA 配列への結合を導き、前記ガイド配列は、前記アデニンを含む標的配列にハイブリダイズして RNA 二重鎖を形成する能力を有し、前記ガイド配列は、前記アデニンに対応する位置に非対合シトシンを含むため、形成される RNA 二重鎖に A-C ミスマッチが生じ、前記 (アデノシン) デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインが前記 RNA 二重鎖の前記アデニンを脱アミノ化する。

10

【0634】

本発明は、本明細書に記載される改変細胞を、それを必要としている患者に投与することを含む、細胞療法の方法に更に関し、ここで、改変細胞の存在が患者の疾患を修復する。一実施形態において、細胞療法用の改変細胞は、腫瘍細胞を認識し及び／又は攻撃する能力を有する CAR-T 細胞である。別の実施形態において、細胞療法用の改変細胞は、神経幹細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞又は iPSC 細胞などの幹細胞である。

20

【0635】

本発明は、遺伝子の望ましくない活性をノックアウト又はノックダウンする方法にも関し、ここで、遺伝子の転写物における A の脱アミノ化が機能喪失をもたらす。例えば、一実施形態では、デアミナーゼ機能化 CRISPR 系による標的化した脱アミノ化がナンセンス突然変異を引き起こし、内因性遺伝子に未成熟終止コドンを生じさせ得る。これにより内因性遺伝子の発現を変化させ得、編集された細胞における望ましい形質につながり得る。別の実施形態では、デアミナーゼ機能化 CRISPR 系による標的化した脱アミノ化が非保存的ミスセンス突然変異を引き起こし、内因性遺伝子に異なるアミノ酸残基のコードを生じさせ得る。これにより発現した内因性遺伝子の機能を変化させ得、同様に編集された細胞における望ましい形質につながり得る。

30

【0636】

本明細書に記載されるデアミナーゼ機能化 CRISPR 系を使用して、RNA ポリヌクレオチド配列内にある特定のアデニンを脱アミノ化の標的にすることができる。例えば、ガイド分子が CRISPR-Cas タンパク質と複合体を形成し、目的の RNA ポリヌクレオチドにある標的 RNA 配列への複合体の結合を導くことができる。ガイド配列は、非対合 C を有するように設計されるため、ガイド配列と標的配列との間で形成される RNA 二重鎖は、A-C ミスマッチを含み、これによって (アデノシン) デアミナーゼが非対合 C に対向する A に接触してそれを脱アミノ化するように導かれ、A がイノシン (I) に変換される。イノシン (I) は、C と塩基対合し、細胞過程で G のように機能するため、本明細書に記載される A の標的化した脱アミノ化は、望ましくない G-A 及び C-T 突然変異の修正並びに望ましい A-G 及び T-C 突然変異の獲得に有用である。

40

【0637】

特定の例示的实施形態において、Cas 13 タンパク質は、Cas 13a、Cas 13b 又は Cas 13c である。

【0638】

(アデノシン) デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、前記デッド Cas 13 タンパク質の N 末端又は C 末端に融合され得る。特定の例示的实施形態において、(アデノシン) デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、リンカーによって前記デッ

50

ドCas13タンパク質に融合される。リンカーは、(GGGGS)_{3~11}、GSG₅又はLEPGEKPYKCPECGKSFSSQSGALTRHQRTHTRであり得る。

【0639】

特定の例示的实施形態において、(アデノシン)デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、アダプタータンパク質に連結され、前記ガイド分子又は前記デッドCas13タンパク質は、前記アダプタータンパク質への結合能を有するアダプター配列を含む。アダプター配列は、MS2、PP7、Qβ、F2、GA、fr、JP501、M12、R17、BZ13、JP34、JP500、KU1、M11、MX1、TW18、VK、SP、FI、ID2、NL95、TW19、AP205、φCb5、φCb8r、φCb12r、φCb23r、7s及びPRR1から選択され得る。

10

【0640】

特定の例示的实施形態において、(アデノシン)デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、前記デッドCas13タンパク質の内部ループに挿入される。特定の例示的实施形態において、Cas13aタンパク質は、2つのHEPNドメイン、特にレプトトリキア・ウェイデイ(*Leptotrichia wadei*)由来のCas13aタンパク質の位置R474及びR1046又はCas13aオルソログのそれに対応するアミノ酸位置に1つ以上の突然変異を含む。

【0641】

特定の例示的实施形態において、Cas13タンパク質は、Cas13bタンパク質であり、このCas13bは、バージイェラ・ゾーヘルカム(*Bergeyella zoohelcum*)ATCC 43767由来のCas13bタンパク質の位置R116、H121、R1177、H1182の1つ以上又はCas13bオルソログのそれに対応するアミノ酸位置に突然変異を含む。特定の他の例示的实施形態において、突然変異は、バージイェラ・ゾーヘルカム(*Bergeyella zoohelcum*)ATCC 43767由来のCas13bタンパク質のR116A、H121A、R1177A、H1182Aの1つ以上又はCas13bオルソログのそれに対応するアミノ酸位置である。

20

【0642】

特定の例示的实施形態において、ガイド配列は、前記標的配列と前記RNA二重鎖を形成する能力を有する約29~53ntの長さを有する。特定の他の例示的实施形態において、ガイド配列は、前記標的配列と前記RNA二重鎖を形成する能力を有する約40~50ntの長さを有する。特定の例示的实施形態において、前記ガイド配列の前記非対合Cと5'末端との間の距離は、20~30ヌクレオチドである。

30

【0643】

特定の例示的实施形態において、(アデノシン)デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、ヒト、頭足類又はショウジョウバエ属(*Drosophila*)(アデノシン)デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインである。特定の例示的实施形態において、(アデノシン)デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、hADAR2-Dアミノ酸配列のグルタミン酸⁴⁸⁸又は相同ADARタンパク質における対応する位置に突然変異を含むように改変されている。特定の例示的实施形態において、グルタミン酸残基は、位置488にあり得、又は相同ADARタンパク質における対応する位置がグルタミン残基に置き換えられ得る(E488Q)。

40

【0644】

特定の他の例示的实施形態において、(アデノシン)デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、突然変異E488Qを含む突然変異型hADAR2d又は突然変異E1008Qを含む突然変異型hADAR1dである。

【0645】

特定の例示的实施形態において、ガイド配列は、標的RNA配列における異なるアデノシン部位に対応する2つ以上のミスマッチを含み、又は2つのガイド分子が使用され、各々は、標的RNA配列における異なるアデノシン部位に対応するミスマッチを含む。

50

【0646】

特定の例示的实施形態において、Cas13タンパク質及び任意選択で前記（アデノシン）デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、1つ以上の異種核局在化シグナル（NLS）を含む。

【0647】

特定の例示的实施形態において、本方法は、目的の標的配列を決定すること、及び次に標的配列に存在する前記アデニンを最も効率的に脱アミノ化する（アデノシン）デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインを選択することを更に含む。

【0648】

目的の標的RNA配列は、細胞内にあり得る。細胞は、真核細胞、非ヒト動物細胞、ヒト細胞、植物細胞であり得る。目的の標的遺伝子座は、動物又は植物体内にあり得る。

【0649】

目的の標的RNA配列は、インビトロでRNAポリヌクレオチドに含まれ得る。

【0650】

本明細書に記載される系の成分は、リボ核タンパク質複合体として、又は1つ以上のポリヌクレオチド分子として、又はウイルス若しくは非ウイルス送達を含めた本明細書の他の部分に記載されるとおりの任意の他の送達方法で前記細胞に送達され得る。1つ以上のポリヌクレオチド分子は、成分をコードする1つ以上のmRNA分子を含み得る。1つ以上のポリヌクレオチド分子は、1つ以上のベクター内に含まれ得る。1つ以上のポリヌクレオチド分子は、前記Cas13タンパク質、前記ガイド分子及び前記デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインを発現するように作動可能に構成された1つ以上の調節エレメントを更に含み得、任意選択で、ここで、前記1つ以上の調節エレメントは、誘導性プロモーターを含む。1つ以上のポリヌクレオチド分子又は前記リボ核タンパク質複合体は、粒子、小胞又は1つ以上のウイルスベクターによって送達され得る。粒子は、脂質、糖、金属又はタンパク質を含み得る。粒子は、脂質ナノ粒子を含み得る。小胞は、エキソソーム又はリボソームを含み得る。1つ以上のウイルスベクターは、アデノウイルス、1つ以上のレンチウイルス又は1つ以上のアデノ随伴ウイルスの1つ以上を含み得る。

【0651】

本明細書に開示される方法は、1つ以上の標的RNA配列の操作による細胞、細胞株又は生物の改変に使用し得る。

【0652】

特定の例示的实施形態において、前記目的の標的RNAにある前記アデニンの脱アミノ化は、病原性G→A又はC→T点突然変異を含む転写物によって引き起こされる疾患を修復する。

【0653】

本方法は、詳細にはデアミナーゼ機能化CRISPR系を使用した標的化した脱アミノ化によるなど、疾患の治療若しくは予防又は他に疾患若しくは疾患の重症度の改善に使用することができ、ここで、Aの脱アミノ化であり、これは、病原性G→A又はC→T点突然変異を含む転写物によって引き起こされる疾患を修復するものである。特定の例示的实施形態において、疾患は、マイヤー・ゴーリン症候群、ゼッケル症候群4、ジュベール症候群5、レーベル先天黒内障10；シャルコー・マリー・トゥース病、2型；シャルコー・マリー・トゥース病、2型；アッシャー症候群、2C型；脊髄小脳失調症28；脊髄小脳失調症28；脊髄小脳失調症28；QT延長症候群2；シェーグレン・ラルソン症候群；遺伝性果糖尿症；遺伝性果糖尿症；神経芽細胞腫；神経芽細胞腫；カルマン症候群1；カルマン症候群1；カルマン症候群1；異染性白質ジストロフィー、レット症候群、筋萎縮性側索硬化症10型、リー・フラウメニ症候群から選択される。疾患は未成熟終止疾患（premature termination disease）であり得る。

【0654】

本明細書に開示される方法は、生物の受胎能に影響を及ぼす改変の作成に使用され得る。この改変は、前記標的RNA配列のスプライシングに影響を及ぼし得る。この改変は、

10

20

30

40

50

アミノ酸変化を導入して癌細胞に新規抗原の発現を生じさせる突然変異を転写物に導入し得る。

【0655】

特定の例示的实施形態において、標的RNAは、マイクロRNAであるか又はマイクロRNA内に含まれ得る。特定の例示的实施形態において、前記目的の標的RNAにある前記アデニンの脱アミノ化は、遺伝子の機能獲得又は機能喪失を引き起こす。特定の例示的实施形態において、遺伝子は、癌細胞が発現する遺伝子である。

【0656】

別の態様において、本発明は、本明細書に開示される方法を用いて得られる改変細胞又はその子孫を含み、ここで、前記細胞は、本方法に供されていない対応する細胞と比較して前記目的の標的RNAに前記アデニンの代わりにヒポキサンチン又はグアニンを含む。改変細胞又はその子孫は、真核細胞、動物細胞、ヒト細胞、治療用T細胞、抗体産生B細胞、植物細胞であり得る。

10

【0657】

別の態様において、本発明は、前記改変細胞又はその子孫を含む非ヒト動物を含む。改変されるのは、植物細胞であり得る。

【0658】

別の態様において、本発明は細胞療法の方法を含み、この方法は、本明細書に開示される改変細胞を、それを必要としている患者に投与することを含み、ここで、前記改変細胞の存在が患者の疾患を修復する。

20

【0659】

別の態様において、本発明は、A)ダイレクトリピート配列に連結したガイド配列を含むガイド分子又は前記ガイド分子をコードするヌクレオチド配列、B)触媒不活性Cas13タンパク質又は前記触媒不活性Cas13タンパク質をコードするヌクレオチド配列、C)(アデノシン)デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメイン又は前記(アデノシン)デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、目的の標的遺伝子座にあるアデニンの改変に好適である、エンジニアリングされた天然に存在しない系に関し、ここで、前記(アデノシン)デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、前記Cas13タンパク質又は前記ガイド分子に共有結合的又は非共有結合的に連結されているか、又は送達後にそれに連結するように適合され、前記ガイド配列は、アデニンを含む標的RNA配列とハイブリダイズしてRNA二重鎖を形成する能力を有し、前記ガイド配列は、前記アデニンに対応する位置に非対合シトシンを含むため、形成されるRNA二重鎖にA-Cミスマッチが生じる。

30

【0660】

別の態様において、本発明は、a)、b)及びc)のヌクレオチド配列を含む、目的の標的遺伝子座にあるアデニンの改変に好適である、エンジニアリングされた天然に存在しないベクター系に関する。

【0661】

別の態様において、本発明は、前記ガイド配列を含む前記ガイド分子をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結された第1の調節エレメント、前記触媒不活性Cas13タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結された第2の調節エレメント及び前記第1又は第2の調節エレメントの制御下にあるか、又は第3の調節エレメントに作動可能に連結された、(アデノシン)デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む1つ以上のベクターを含む、エンジニアリングされた天然に存在しないベクター系に関し、ここで、(アデノシン)デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインをコードする前記ヌクレオチド配列が第3の調節エレメントに作動可能に連結されている場合、前記(アデノシン)デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインは、発現後に前記ガイド分子又は前記Cas13タンパク質に連結するように適合され、ここで、成分A)、B)及びC)は、系の同じ又は異なるベクター上に位置する。

40

【0662】

50

別の態様において、本発明は、本明細書に開示される系を含むインビトロ又はエキソビ
ボ宿主細胞若しくはその子孫又は細胞株若しくはその子孫に関する。宿主細胞又はその子
孫は、真核細胞、動物細胞、ヒト細胞又は植物細胞であり得る。

【0663】

一態様において、本発明は、RNA、より詳細には目的のRNA配列にあるアデニンの
標的化した脱アミノ化方法を提供する。本発明の方法によれば、(アデノシン)デアミナー
ゼ(AD)タンパク質は、標的配列に特異的に結合し得るCRISPR-Cas複合体
によって目的のRNA配列にある関連するアデニンに特異的に動員される。これを実現す
るため、(アデノシン)デアミナーゼタンパク質は、CRISPR-Cas酵素に共有結
合的に連結されるか、又は別個のタンパク質として提供されるかのいずれでもあり得、但
しCRISPR-Cas複合体へのその動員が確実となるように適合され得る。

10

【0664】

本発明の方法の詳細な実施形態において、標的遺伝子座への(アデノシン)デアミナー
ゼの動員は、(アデノシン)デアミナーゼ又はその触媒ドメインをCas13タンパク質
であるCRISPR-Casタンパク質に融合することにより確実とされる。2つの別個
のタンパク質から融合タンパク質を作成する方法は、当該技術分野において公知であり、
典型的にはスペーサー又はリンカーの使用が関わる。Cas13タンパク質は、(アデノ
シン)デアミナーゼタンパク質又はその触媒ドメインにそのN端側又はC端側のいずれか
の末端で融合することができる。詳細な実施形態において、CRISPR-Casタンパ
ク質は、不活性又はデッドCas13タンパク質であり、デアミナーゼタンパク質又はそ
の触媒ドメインのN末端に連結される。

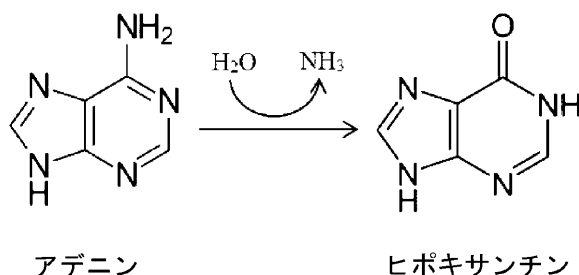
20

【0665】

用語「アデノシンデアミナーゼ」又は「アデノシンデアミナーゼタンパク質」は、本明
細書で使用されるとき、以下に示すとおり、アデニン(又は分子のアデニン部分)をヒ
ポキサンチン(又は分子のヒポキサンチン部分)に変換する加水分解性脱アミノ化反応の
触媒能を有するタンパク質、ポリペプチド又はタンパク質若しくはポリペプチドの1つ以
上の機能ドメインを指す。一部の実施形態において、アデニン含有分子は、アデノシン(
A)であり、ヒポキサンチン含有分子は、イノシン(I)である。アデニン含有分子は、
デオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)であり得る。

【0666】

【化1】



【0667】

本開示によれば、本開示に関連して使用することのできるアデノシンデアミナーゼとし
ては、限定はされないが、RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ(ADAR)として
知られる酵素ファミリーのメンバー、tRNAに作用するアデノシンデアミナーゼ(ADA
T)として知られる酵素ファミリーのメンバー及び他のアデノシンデアミナーゼドメイ
ン含有(ADAD)ファミリーメンバーが挙げられる。本開示によれば、アデノシンデア
ミナーゼは、RNA/DNA及びRNA二重鎖のアデニンを標的化する能力を有する。実
際、Zheng et al. (Nucleic Acids Res. 2017, 45
(6): 3369-3377)は、ADARがRNA/DNA及びRNA/RNA二重鎖
上でのアデノシンからイノシンへの編集反応を遂行し得ることを実証している。詳細な実
施形態において、アデノシンデアミナーゼは、本明細書において以下に詳述するとおり、

40

50

RNA/DNA RNA二重鎖におけるDNAを編集する能力が増加するように改変されている。

【0668】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、限定はされないが、哺乳類、鳥類、カエル、イカ、魚類、ハエ及び虫を含めた1つ以上の後生動物種に由来する。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、ヒト、イカ又はショウジョウバエ属 (*Drosophila*) アデノシンデアミナーゼである。

【0669】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、hADAR1、hADAR2、hADAR3を含めたヒトADARである。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、ADR-1及びADR-2を含めたカエノラブディティス・エレガンス (*Caenorhabditis elegans*) ADARタンパク質である。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、dAdarを含めたショウジョウバエ属 (*Drosophila*) ADARタンパク質である。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、sqADAR2a及びsqADAR2bを含めたイカのアメリカケンサキイカ (*Loligo pealeii*) ADARタンパク質である。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、ヒトADATタンパク質である。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、ショウジョウバエ属 (*Drosophila*) ADATタンパク質である。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、TENR (hADAD1) 及びTENRL (hADAD2) を含めたヒトADADタンパク質である。

【0670】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、二本鎖核酸基質中の1つ以上の標的アデノシン残基を認識してイノシン残基に変換する。一部の実施形態において、二本鎖核酸基質は、RNA-DNAハイブリッド二重鎖である。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、二本鎖基質上の結合ウィンドウを認識する。一部の実施形態において、結合ウィンドウは、少なくとも1つの標的アデノシン残基を含む。一部の実施形態において、結合ウィンドウは、約3bp～約100bpの範囲である。一部の実施形態において、結合ウィンドウは、約5bp～約50bpの範囲である。一部の実施形態において、結合ウィンドウは、約10bp～約30bpの範囲である。一部の実施形態において、結合ウィンドウは、約1bp、2bp、3bp、5bp、7bp、10bp、15bp、20bp、25bp、30bp、40bp、45bp、50bp、55bp、60bp、65bp、70bp、75bp、80bp、85bp、90bp、95bp又は100bpである。

【0671】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、1つ以上のデアミナーゼドメインを含む。理論によって拘束されることは意図されないが、デアミナーゼドメインが二本鎖核酸基質に含まれる1つ以上の標的アデノシン (A) 残基を認識してそれをイノシン (I) 残基に変換する役割を果たすことが企図される。一部の実施形態において、デアミナーゼドメインは、活性中心を含む。一部の実施形態において、活性中心は、亜鉛イオンを含む。一部の実施形態において、AからIへの編集過程で標的アデノシン残基における塩基対合が破壊され、標的アデノシン残基が二重らせんから「フリップ」アウトしてアデノシンデアミナーゼが接触できるようになる。一部の実施形態において、活性中心又はその近傍にあるアミノ酸残基は、標的アデノシン残基の5'側で1つ以上のヌクレオチドと相互作用する。一部の実施形態において、活性中心又はその近傍にあるアミノ酸残基は、標的アデノシン残基の3'側で1つ以上のヌクレオチドと相互作用する。一部の実施形態において、活性中心又はその近傍にあるアミノ酸残基は、逆鎖上にある標的アデノシン残基と相補的なヌクレオチドと更に相互作用する。一部の実施形態において、アミノ酸残基は、ヌクレオチドの2'ヒドロキシル基と水素結合を形成する。

【0672】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、ヒトADAR2完全タンパク質(hADAR2)又はそのデアミナーゼドメイン(hADAR2-D)を含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、hADAR2又はhADAR2-Dと相同のADARファミリーメンバーである。

【0673】

特に、一部の実施形態において、相同ADARタンパク質は、ヒトADAR1(hADAR1)又はそのデアミナーゼドメイン(hADAR1-D)である。一部の実施形態において、hADAR1-Dのグリシン1007は、グリシン487 hADAR2-Dに対応し、hADAR1-Dのグルタミン酸1008は、hADAR2-Dのグルタミン酸488に対応する。

10

【0674】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、hADAR2-Dの野生型アミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、hADAR2-D配列に1つ以上の突然変異を含み、hADAR2-Dの編集効率及び／又は基質編集優先性が具体的な必要性に応じて変更されることになる。

【0675】

hADAR1及びhADAR2タンパク質の特定の突然変異について、Kuttan et al., Proc Natl Acad Sci U S A. (2012) 109(48): E3295-304; Want et al. ACS Chem Biol. (2015) 10(11): 2512-9; 及びZheng et al. Nucleic Acids Res. (2017) 45(6): 3369-337 (これらの各々は、本明細書において全体として参照により援用される)に記載されている。

20

【0676】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、hADAR2-Dアミノ酸配列のグリシン336又は相同ADARタンパク質における対応する位置に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置336のグリシン残基は、アスパラギン酸残基に置き換えられる(G336D)。

【0677】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、hADAR2-Dアミノ酸配列のグリシン487又は相同ADARタンパク質における対応する位置に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置487のグリシン残基は、比較的小さい側鎖の非極性アミノ酸残基に置き換えられる。例えば、一部の実施形態において、位置487のグリシン残基は、アラニン残基に置き換えられる(G487A)。一部の実施形態において、位置487のグリシン残基は、バリン残基に置き換えられる(G487V)。一部の実施形態において、位置487のグリシン残基は、比較的大きい側鎖のアミノ酸残基に置き換えられる。一部の実施形態において、位置487のグリシン残基は、アルギニン残基に置き換えられる(G487R)。一部の実施形態において、位置487のグリシン残基は、リジン残基に置き換えられる(G487K)。一部の実施形態において、位置487のグリシン残基は、トリプトファン残基に置き換えられる(G487W)。一部の実施形態において、位置487のグリシン残基は、チロシン残基に置き換えられる(G487Y)。

30

40

【0678】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、hADAR2-Dアミノ酸配列のグルタミン酸488又は相同ADARタンパク質における対応する位置に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置488のグルタミン酸残基は、グルタミン残基に置き換えられる(E488Q)。一部の実施形態において、位置488のグルタミン酸残基は、ヒスチジン残基に置き換えられる(E488H)。一部の実施形態において、位置488のグルタミン酸残基は、アルギニン残基に置き換えられる(E488R)。一部の実施形態において、位置488のグルタミン酸残基は、リジン残基に置き換えられる(E488K)。一部の実施形態において、位置488のグルタミン酸残基は、アスパラギン残基に置き換えられる(E488N)。一部の実施形態において、位置488のグルタミン酸

50

残基は、アラニン残基に置き換えられる（E 4 8 8 A）。一部の実施形態において、位置 4 8 8 のグルタミン酸残基は、メチオニン残基に置き換えられる（E 4 8 8 M）。一部の実施形態において、位置 4 8 8 のグルタミン酸残基は、セリン残基に置き換えられる（E 4 8 8 S）。一部の実施形態において、位置 4 8 8 のグルタミン酸残基は、フェニルアラニン残基に置き換えられる（E 4 8 8 F）。一部の実施形態において、位置 4 8 8 のグルタミン酸残基は、リジン残基に置き換えられる（E 4 8 8 L）。一部の実施形態において、位置 4 8 8 のグルタミン酸残基は、トリプトファン残基に置き換えられる（E 4 8 8 W）。

【0679】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、h A D A R 2-D アミノ酸配列のスレオニン 4 9 0 又は相同 A D A R タンパク質における対応する位置に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置 4 9 0 のスレオニン残基は、システイン残基に置き換えられる（T 4 9 0 C）。一部の実施形態において、位置 4 9 0 のスレオニン残基は、セリン残基に置き換えられる（T 4 9 0 S）。一部の実施形態において、位置 4 9 0 のスレオニン残基は、アラニン残基に置き換えられる（T 4 9 0 A）。一部の実施形態において、位置 4 9 0 のスレオニン残基は、フェニルアラニン残基に置き換えられる（T 4 9 0 F）。一部の実施形態において、位置 4 9 0 のスレオニン残基は、チロシン残基に置き換えられる（T 4 9 0 Y）。一部の実施形態において、位置 4 9 0 のスレオニン残基は、セリン残基に置き換えられる（T 4 9 0 R）。一部の実施形態において、位置 4 9 0 のスレオニン残基は、アラニン残基に置き換えられる（T 4 9 0 K）。一部の実施形態において、位置 4 9 0 のスレオニン残基は、フェニルアラニン残基に置き換えられる（T 4 9 0 P）。一部の実施形態において、位置 4 9 0 のスレオニン残基は、チロシン残基に置き換えられる（T 4 9 0 E）。

【0680】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、h A D A R 2-D アミノ酸配列のバリン 4 9 3 又は相同 A D A R タンパク質における対応する位置に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置 4 9 3 のバリン残基は、アラニン残基に置き換えられる（V 4 9 3 A）。一部の実施形態において、位置 4 9 3 のバリン残基は、セリン残基に置き換えられる（V 4 9 3 S）。一部の実施形態において、位置 4 9 3 のバリン残基は、スレオニン残基に置き換えられる（V 4 9 3 T）。一部の実施形態において、位置 4 9 3 のバリン残基は、アルギニン残基に置き換えられる（V 4 9 3 R）。一部の実施形態において、位置 4 9 3 のバリン残基は、アスパラギン酸残基に置き換えられる（V 4 9 3 D）。一部の実施形態において、位置 4 9 3 のバリン残基は、プロリン残基に置き換えられる（V 4 9 3 P）。一部の実施形態において、位置 4 9 3 のバリン残基は、グリシン残基に置き換えられる（V 4 9 3 G）。

【0681】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、h A D A R 2-D アミノ酸配列のアラニン 5 8 9 又は相同 A D A R タンパク質における対応する位置に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置 5 8 9 のアラニン残基は、バリン残基に置き換えられる（A 5 8 9 V）。

【0682】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、h A D A R 2-D アミノ酸配列のアスパラギン 5 9 7 又は相同 A D A R タンパク質における対応する位置に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置 5 9 7 のアスパラギン残基は、リジン残基に置き換えられる（N 5 9 7 K）。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、野生型配列ではアスパラギン残基を有するアミノ酸配列の位置 5 9 7 に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置 5 9 7 のアスパラギン残基は、アルギニン残基に置き換えられる（N 5 9 7 R）。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、野生型配列ではアスパラギン残基を有するアミノ酸配列の位置 5 9 7 に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置 5 9 7 のアスパラギン残基は、アラニン残基に置き換えられる（N 5 9 7 A

）。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、野生型配列ではアスパラギン残基を有するアミノ酸配列の位置 597 に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置 597 のアスパラギン残基は、グルタミン酸残基に置き換えられる（N597E）。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、野生型配列ではアスパラギン残基を有するアミノ酸配列の位置 597 に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置 597 のアスパラギン残基は、ヒスチジン残基に置き換えられる（N597H）。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、野生型配列ではアスパラギン残基を有するアミノ酸配列の位置 597 に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置 597 のアスパラギン残基は、グリシン残基に置き換えられる（N597G）。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、野生型配列ではアスパラギン残基を有するアミノ酸配列の位置 597 に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置 597 のアスパラギン残基は、チロシン残基に置き換えられる（N597Y）。一部の実施形態において、位置 597 のアスパラギン残基は、フェニルアラニン残基に置き換えられる（N597F）。

10

【0683】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、hADAR2-Dアミノ酸配列のセリン599又は相同ADARタンパク質における対応する位置に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置599のセリン残基は、スレオニン残基に置き換えられる（S599T）。

【0684】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、hADAR2-Dアミノ酸配列のアスパラギン613又は相同ADARタンパク質における対応する位置に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置613のアスパラギン残基は、リジン残基に置き換えられる（N613K）。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、野生型配列ではアスパラギン残基を有するアミノ酸配列の位置613に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置613のアスパラギン残基は、アルギニン残基に置き換えられる（N613R）。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、野生型配列ではアスパラギン残基を有するアミノ酸配列の位置613に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置613のアスパラギン残基は、アラニン残基に置き換えられる（N613A）。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、野生型配列ではアスパラギン残基を有するアミノ酸配列の位置613に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置613のアスパラギン残基は、グルタミン酸残基に置き換えられる（N613E）。

20

30

【0685】

一部の実施形態において、編集効率を改善するため、アデノシンデアミナーゼは、突然変異：G336D、G487A、G487V、E488Q、E488H、E488R、E488N、E488A、E488S、E488M、T490C、T490S、V493T、V493S、V493A、V493R、V493D、V493P、V493G、N597K、N597R、N597A、N597E、N597H、N597G、N597Y、A589V、S599T、N613K、N613R、N613A、N613E（hADAR2-Dのアミノ酸配列位置を基準とする）の1つ以上及び上記に対応する相同ADARタンパク質における突然変異を含み得る。

40

【0686】

一部の実施形態において、編集効率を低下させるため、アデノシンデアミナーゼは、突然変異：E488F、E488L、E488W、T490A、T490F、T490Y、T490R、T490K、T490P、T490E、N597F（hADAR2-Dのアミノ酸配列位置を基準とする）の1つ以上及び上記に対応する相同ADARタンパク質における突然変異を含み得る。詳細な実施形態において、オフターゲット効果を低下させるため効率が低下したアデノシンデアミナーゼ酵素を使用することが有利であり得る。

【0687】

特定の実施形態において、オフターゲット改変の編集の改善及び低減は、gRNAの化学的改変によって実現する。Vogel et al. (2014), Angew Chem

50

em Int Ed, 53:6267-6271, doi:10.1002/anie.201402634 (全体として参照により本明細書に援用される)に例示されるとおり化学的に改変されているgRNAはオフターゲット活性を低減し、オンターゲット効率を改善する。2'-O-メチル及びホスホチオエート(phosphothioate)改変ガイドRNAは、一般に細胞における編集効率を改善する。

【0688】

ADARは、編集されたAの両側の隣接ヌクレオチドに優先性を示すことが知られている(www.nature.com/nsmb/journal/v23/n5/full/nsmb.3203.html, Matthews et al. (2017), Nature Structural Mol Biol, 23(5):426-433、全体として参照により本明細書に援用される)。従って、特定の実施形態において、gRNA、標的及び/又はADARは、モチーフ優先性に関して最適化されるように選択される。

10

【0689】

インビトロで、意図的なミスマッチが好ましくないモチーフの編集を可能にすることが実証されている(https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gku272; Schneider et al (2014), Nucleic Acid Res, 42(10):e87); Fukuda et al. (2017), Scientific Reports, 7, doi:10.1038/srep41478、全体として参照により本明細書に援用される)。従って、特定の実施形態において、好ましくない5'又は3'隣接塩基に関するRNA編集効率を亢進させるため、隣接塩基に意図的なミスマッチが導入される。

20

【0690】

結果から、ADARデアミナーゼドメインのターゲティングウィンドウにおけるCに対向するAが他の塩基と比べて優先的に編集されることが示唆される。加えて、標的塩基から数塩基以内にあるUと塩基対合したAは、Cas13b-ADAR融合物による低い編集レベルを示し、この酵素に複数のAを編集する柔軟性があることが示唆される。例えば、図18を参照されたい。これらの2つの観察は、Cas13b-ADAR融合物の活性ウィンドウにおける複数のAが、編集されるべき全てのAとCとのミスマッチによって編集に指定され得ることを示唆している。従って、特定の実施形態では、活性ウィンドウにおける複数のA:Cミスマッチは、複数のA:I編集を作り出すように設計される。活性ウィンドウにおける潜在的なオフターゲット編集を抑制する特定の実施形態において、非標的Aは、A又はGと対合する。

30

【0691】

用語「編集特異性」及び「編集優先性」は、本明細書では、二本鎖基質における特定のアデノシン部位のAからIへの編集の程度を指して同義的に使用される。一部の実施形態において、基質編集優先性は、標的アデノシン残基の5'側隣接塩基及び/又は3'側隣接塩基によって決まる。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、基質の5'側隣接塩基についてU>A>C>G(「>」はより高い優先性を示す)と順位付けされる優先性を有する。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、基質の3'側隣接塩基についてG>C>A>U(「>」は、より高い優先性を示し、「~」は、同程度の優先性を示す)と順位付けされる優先性を有する。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、基質の3'側隣接塩基についてG>C>U~A(「>」は、より高い優先性を示し、「~」は、同程度の優先性を示す)と順位付けされる優先性を有する。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、基質の3'側隣接塩基についてG>C>A>U(「>」は、より高い優先性を示す)と順位付けされる優先性を有する。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、基質の3'側隣接塩基についてC~G~A>U(「>」は、より高い優先性を示し、「~」は、同程度の優先性を示す)と順位付けされる優先性を有する。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、標的

40

50

アデノシン残基を含有するトリプレット配列について、中央のAが標的アデノシン残基の、TAG>AAG>CAC>AAT>GAA>GAC（「>」は、より高い優先性を示す）と順位付けされる優先性を有する。

【0692】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼの基質編集優先性は、アデノシンデアミナーゼタンパク質に核酸結合ドメインが存在するか否かの影響を受ける。一部の実施形態において、基質編集優先性を改変するため、デアミナーゼドメインが二本鎖RNA結合ドメイン（dsRBD）又は二本鎖RNA結合モチーフ（dsRBM）に接続される。一部の実施形態において、dsRBD又はdsRBMは、hADAR1又はhADAR2など、ADARタンパク質に由来し得る。一部の実施形態において、少なくとも1つのdsRBD及びデアミナーゼドメインを含む完全長ADARタンパク質が使用される。一部の実施形態において、1つ以上のdsRBM又はdsRBDは、デアミナーゼドメインのN末端にある。他の実施形態において、1つ以上のdsRBM又はdsRBDは、デアミナーゼドメインのC末端にある。

10

【0693】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼの基質編集優先性は、酵素の活性中心の近傍又は活性中心にあるアミノ酸残基の影響を受ける。一部の実施形態において、基質編集優先性を改変するため、アデノシンデアミナーゼは、突然変異：G336D、G487R、G487K、G487W、G487Y、E488Q、E488N、T490A、V493A、V493T、V493S、N597K、N597R、A589V、S599T、N613K、N613R（hADAR2-Dのアミノ酸配列位置を基準とする）の1つ以上及び上記に対応する相同ADARタンパク質における突然変異を含み得る。

20

【0694】

特に、一部の実施形態において、編集特異性を低下させるため、アデノシンデアミナーゼは、突然変異E488Q、V493A、N597K、N613K（hADAR2-Dのアミノ酸配列位置を基準とする）の1つ以上及び上記に対応する相同ADARタンパク質における突然変異を含むことができる。一部の実施形態において、編集特異性を増加させるため、アデノシンデアミナーゼは、突然変異T490Aを含むことができる。

【0695】

一部の実施形態において、オフターゲット効果を低下させるため、アデノシンデアミナーゼは、R348、V351、T375、K376、E396、C451、R455、N473、R474、K475、R477、R481、S486、E488、T490、S495、R510（hADAR2-Dのアミノ酸配列位置を基準とする）における突然変異の1つ以上及び上記に対応する相同ADARタンパク質における突然変異を含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、E488と、R348、V351、T375、K376、E396、C451、R455、N473、R474、K475、R477、R481、S486、T490、S495、R510から選択される1つ以上の追加的な位置とに突然変異を含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、T375と、任意選択で1つ以上の追加的な位置とに突然変異を含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、N473と、任意選択で1つ以上の追加的な位置とに突然変異を含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、V351と、任意選択で1つ以上の追加的な位置とに突然変異を含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、E488及びT375と、任意選択で1つ以上の追加的な位置とに突然変異を含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、E488及びN473と、任意選択で1つ以上の追加的な位置とに突然変異を含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、E488及びV351と、任意選択で1つ以上の追加的な位置とに突然変異を含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、E488と、T375、N473及びV351の1つ以上とに突然変異を含む。

30

40

【0696】

一部の実施形態において、オフターゲット効果を低下させるため、アデノシンデアミナ

50

ーゼは、R 3 4 8 E、V 3 5 1 L、T 3 7 5 G、T 3 7 5 S、R 4 5 5 G、R 4 5 5 S、R 4 5 5 E、N 4 7 3 D、R 4 7 4 E、K 4 7 5 Q、R 4 7 7 E、R 4 8 1 E、S 4 8 6 T、E 4 8 8 Q、T 4 9 0 A、T 4 9 0 S、S 4 9 5 T及びR 5 1 0 E（h A D A R 2－Dのアミノ酸配列位置を基準とする）から選択される突然変異の1つ以上及び上記に対応する相同A D A Rタンパク質における突然変異を含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、突然変異E 4 8 8 Qと、R 3 4 8 E、V 3 5 1 L、T 3 7 5 G、T 3 7 5 S、R 4 5 5 G、R 4 5 5 S、R 4 5 5 E、N 4 7 3 D、R 4 7 4 E、K 4 7 5 Q、R 4 7 7 E、R 4 8 1 E、S 4 8 6 T、T 4 9 0 A、T 4 9 0 S、S 4 9 5 T及びR 5 1 0 Eから選択される1つ以上の追加的な突然変異とを含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、突然変異T 3 7 5 G又はT 3 7 5 Sと、任意選択で1つ以上の追加的な突然変異とを含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、突然変異N 4 7 3 Dと、任意選択で1つ以上の追加的な突然変異とを含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、突然変異V 3 5 1 Lと、任意選択で1つ以上の追加的な突然変異とを含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、突然変異E 4 8 8 Q及びT 3 7 5 G又はT 3 7 5 Gと、任意選択で1つ以上の追加的な突然変異とを含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、突然変異E 4 8 8 Q及びN 4 7 3 Dと、任意選択で1つ以上の追加的な突然変異とを含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、突然変異E 4 8 8 Q及びV 3 5 1 Lと、任意選択で1つ以上の追加的な突然変異とを含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、突然変異E 4 8 8 Qと、T 3 7 5 G／S、N 4 7 3 D及びV 3 5 1 Lの1つ以上とを含む。

【0697】

一部の実施形態において、中央のAが標的アデノシン残基であるトリプレット配列G A Cを含む基質など、直接5'側にGを有する標的アデノシン（A）に対する編集優先性を増加させるため、アデノシンデアミナーゼは、突然変異G 3 3 6 D、E 4 8 8 Q、E 4 8 8 N、V 4 9 3 T、V 4 9 3 S、V 4 9 3 A、A 5 8 9 V、N 5 9 7 K、N 5 9 7 R、S 5 9 9 T、N 6 1 3 K、N 6 1 3 R（h A D A R 2－Dのアミノ酸配列位置を基準とする）の1つ以上及び上記に対応する相同A D A Rタンパク質における突然変異を含むことができる。

【0698】

特に、一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、中央のAが標的アデノシン残基である以下のトリプレット配列：G A C、G A A、G A U、G A G、C A U、A A U、U A Cを含む基質を編集するための突然変異E 4 8 8 Q又は相同A D A Rタンパク質における対応する突然変異を含む。

【0699】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、h A D A R 1－Dの野生型アミノ酸配列を含む。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、h A D A R 1－D配列に1つ以上の突然変異を含み、h A D A R 1－Dの編集効率及び／又は基質編集優先性が具体的な必要性に応じて変更されることになる。

【0700】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、h A D A R 1－Dアミノ酸配列のグリシン1007又は相同A D A Rタンパク質における対応する位置に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置1007のグリシン残基は、比較的小さい側鎖の非極性アミノ酸残基に置き換えられる。例えば、一部の実施形態において、位置1007のグリシン残基は、アラニン残基に置き換えられる（G 1 0 0 7 A）。一部の実施形態において、位置1007のグリシン残基は、バリン残基に置き換えられる（G 1 0 0 7 V）。一部の実施形態において、位置1007のグリシン残基は、比較的大きい側鎖のアミノ酸残基に置き換えられる。一部の実施形態において、位置1007のグリシン残基は、アルギニン残基に置き換えられる（G 1 0 0 7 R）。一部の実施形態において、位置1007のグリシン残基は、リジン残基に置き換えられる（G 1 0 0 7 K）。一部の実施形態において

、位置1007のグリシン残基は、トリプトファン残基に置き換えられる（G1007W）。一部の実施形態において、位置1007のグリシン残基は、チロシン残基に置き換えられる（G1007Y）。加えて、他の実施形態において、位置1007のグリシン残基は、ロイシン残基に置き換えられる（G1007L）。他の実施形態において、位置1007のグリシン残基は、スレオニン残基に置き換えられる（G1007T）。他の実施形態において、位置1007のグリシン残基は、セリン残基に置き換えられる（G1007S）。

【0701】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、hADAR1-Dアミノ酸配列のグルタミン酸1008又は相同ADARタンパク質における対応する位置に突然変異を含む。一部の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、比較的大きい側鎖の極性アミノ酸残基に置き換えられる。一部の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、グルタミン残基に置き換えられる（E1008Q）。一部の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、ヒスチジン残基に置き換えられる（E1008H）。一部の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、アルギニン残基に置き換えられる（E1008R）。一部の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、リジン残基に置き換えられる（E1008K）。一部の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、非極性アミノ酸残基又は小さい極性アミノ酸残基に置き換えられる。一部の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、フェニルアラニン残基に置き換えられる（E1008F）。一部の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、トリプトファン残基に置き換えられる（E1008W）。一部の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、グリシン残基に置き換えられる（E1008G）。一部の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、イソロイシン残基に置き換えられる（E1008I）。一部の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、バリン残基に置き換えられる（E1008V）。一部の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、プロリン残基に置き換えられる（E1008P）。一部の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、セリン残基に置き換えられる（E1008S）。他の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、アスパラギン残基に置き換えられる（E1008N）。他の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、アラニン残基に置き換えられる（E1008A）。他の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、メチオニン残基に置き換えられる（E1008M）。一部の実施形態において、位置1008のグルタミン酸残基は、ロイシン残基に置き換えられる（E1008L）。

【0702】

一部の実施形態において、編集効率を改善するため、アデノシンデアミナーゼは、突然変異：E1007S、E1007A、E1007V、E1008Q、E1008R、E1008H、E1008M、E1008N、E1008K（hADAR1-Dのアミノ酸配列位置を基準とする）の1つ以上及び上記に対応する相同ADARタンパク質における突然変異を含み得る。

【0703】

一部の実施形態において、編集効率を低下させるため、アデノシンデアミナーゼは、突然変異：E1007R、E1007K、E1007Y、E1007L、E1007T、E1008G、E1008I、E1008P、E1008V、E1008F、E1008W、E1008S、E1008N、E1008K（hADAR1-Dのアミノ酸配列位置を基準とする）の1つ以上及び上記に対応する相同ADARタンパク質における突然変異を含み得る。

【0704】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼの基質編集優先性、効率及び／又は選択性は、酵素の活性中心の近傍にある又は活性中心にあるアミノ酸残基の影響を受ける。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼは、hADAR1-D配列のグルタ

10

20

30

40

50

ミン酸 1008 位置又は相同 A D A R タンパク質における対応する位置に突然変異を含む。一部の実施形態において、突然変異は、E 1008 R 又は相同 A D A R タンパク質における対応する突然変異である。一部の実施形態において、E 1008 R 突然変異体は、逆鎖にミスマッチ G 残基を有する標的アデノシン残基に対する編集効率が増加している。

【0705】

一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼタンパク質は、二本鎖核酸基質を認識してそれに結合するための 1 つ以上の二本鎖 RNA (dsRNA) 結合モチーフ (dsRBM) 又はドメイン (dsRBD) を更に含むか又はそれに結び付けられている。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼと二本鎖基質との間の相互作用は、CRISPR/CAS タンパク質因子を含め、1 つ以上の追加的なタンパク質因子によって媒介される。一部の実施形態において、アデノシンデアミナーゼと二本鎖基質との間の相互作用は、ガイド RNA を含め、1 つ以上の核酸成分によって更に媒介される。

10

【0706】

特定の例示的实施形態では、定向進化を用いることにより、アデニンからヒポキサンチンへの脱アミノ化以外にも追加的な反応の触媒能を有する改変 A D A R タンパク質が設計され得る。例えば。

【0707】

本発明によれば、アデノシンデアミナーゼの基質は、ガイド分子がその DNA 標的に結合すると形成され、次に CRISPR-Cas 酵素と CRISPR-Cas 複合体を形成する RNA/DNA 又は RNA/RNA 二重鎖である。この RNA/DNA 又は DNA/RNA 二重鎖は、本明細書では「RNA/DNA ハイブリッド」、「DNA/RNA ハイブリッド」又は「二本鎖基質」とも称される。ガイド分子及び CRISPR-Cas 酵素の詳細な特徴については、以下に詳説する。

20

【0708】

用語「編集選択性」は、本明細書で使用されるとき、二本鎖基質上の全ての部位のうち、アデノシンデアミナーゼによって編集される割合を指す。理論によって拘束されるものではないが、アデノシンデアミナーゼの編集選択性は、二本鎖基質の長さ並びにミスマッチ塩基、バルジ及び／又は内部ループの存在など、二次構造の影響を受けることが企図される。

【0709】

一部の実施形態において、基質が 50 bp より長い完全に塩基対合する二重鎖であるとき、アデノシンデアミナーゼは、二重鎖内の複数のアデノシン残基を脱アミノ化することが可能であり得る（例えば、全アデノシン残基の 50 %）。一部の実施形態において、基質が 50 bp より短いとき、アデノシンデアミナーゼの編集選択性は、標的アデノシン部位におけるミスマッチの存在の影響を受ける。特に、一部の実施形態において、逆鎖にミスマッチシチジン (C) 残基を有するアデノシン (A) 残基は、高効率で脱アミノ化される。一部の実施形態において、逆鎖にミスマッチグアノシン (G) 残基を有するアデノシン (A) 残基は、編集されずにスキップされる。

30

【0710】

CRISPR-Cas 系、その構成成分及びかかる構成成分の送達に関する一般的な情報に関して、量及び製剤に関することを含めた、全て本発明の実施において有用な、方法、材料、送達ビヒクル、ベクター、粒子、AAV 並びにその作製及び使用を含め、米国特許第 8,999,641 号明細書、同第 8,993,233 号明細書、同第 8,945,839 号明細書、同第 8,932,814 号明細書、同第 8,906,616 号明細書、同第 8,895,308 号明細書、同第 8,889,418 号明細書、同第 8,889,356 号明細書、同第 8,871,445 号明細書、同第 8,865,406 号明細書、同第 8,795,965 号明細書、同第 8,771,945 号明細書及び同第 8,697,359 号明細書；米国特許出願公開第 2014-0310830 号明細書（米国特許出願第 14/105,031 号明細書）、同第 2014-0287938 A1 号明細書（米国特許出願第 14/213,991 号明細書）、同第 2014-0273234 A1

40

50

号明細書（米国特許出願第14／293，674号明細書）、同第2014-0273232 A1号明細書（米国特許出願第14／290，575号明細書）、同第2014-0273231号明細書（米国特許出願第14／259，420号明細書）、同第2014-0256046 A1号明細書（米国特許出願第14／226，274号明細書）、同第2014-0248702 A1号明細書（米国特許出願第14／258，458号明細書）、同第2014-0242700 A1号明細書（米国特許出願第14／222，930号明細書）、同第2014-0242699 A1号明細書（米国特許出願第14／183，512号明細書）、同第2014-0242664 A1号明細書（米国特許出願第14／104，990号明細書）、同第2014-0234972 A1号明細書（米国特許出願第14／183，471号明細書）、同第2014-0227787 A1号明細書（米国特許出願第14／256，912号明細書）、同第2014-0189896 A1号明細書（米国特許出願第14／105，035号明細書）、同第2014-0186958号明細書（米国特許出願第14／105，017号明細書）、同第2014-0186919 A1号明細書（米国特許出願第14／104，977号明細書）、同第2014-0186843 A1号明細書（米国特許出願第14／104，900号明細書）、同第2014-0179770 A1号明細書（米国特許出願第14／104，837号明細書）及び同第2014-0179006 A1号明細書（米国特許出願第14／183，486号明細書）、同第2014-0170753号明細書（米国特許出願第14／183，429号明細書）；欧州特許第2 784 162 B1号明細書及び同第2 771 468 B1号明細書；欧州特許出願公開第2 771 468号明細書（EP13818570.7号明細書）、同第2 764 103号明細書（EP13824232.6号明細書）及び同第2 784 162号明細書（EP14170383.5号明細書）；及びPCT特許公報、国際公開第2014／093661号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2013／074743号明細書）、同第2014／093694号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2013／074790号明細書）、同第2014／093595号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2013／074611号明細書）、同第2014／093718号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2013／074825号明細書）、同第2014／093709号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2013／074812号明細書）、同第2014／093622号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2013／074667号明細書）、同第2014／093635号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2013／074691号明細書）、同第2014／093655号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2013／074736号明細書）、同第2014／093712号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2013／074819号明細書）、同第2014／093701号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2013／074800号明細書）、同第2014／018423号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2013／051418号明細書）、同第2014／204723号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2014／041790号明細書）、同第2014／204724号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2014／041800号明細書）、同第2014／204725号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2014／041803号明細書）、同第2014／204726号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2014／041804号明細書）、同第2014／204727号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2014／041806号明細書）、同第2014／204728号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2014／041808号明細書）、同第2014／204729号パンフレット（PCT／米国特許出願公開第2014／041809号明細書）が参照される。また、それぞれ2013年1月30日；2013年3月15日；2013年3月28日；2013年4月20日；2013年5月6日及び2013年5月28日に出願された米国仮特許出願第61／758，468号明細書；同第61／802，174号明細書；同第61／806，375号明細書；同第61／814，263号明細書；同第61／819，803号明細書及び同

第61/828, 130号明細書も参照される。また、2013年6月17日に出願された米国仮特許出願第61/836, 123号明細書も参照される。加えて、各々2013年6月17日に出願された米国仮特許出願第61/835, 931号明細書、同第61/835, 936号明細書、同第61/836, 127号明細書、同第61/836, 101号明細書、同第61/836, 080号明細書及び同第61/835, 973号明細書が参照される。更に、2013年8月5日に出願された米国仮特許出願第61/862, 468号明細書及び同第61/862, 355号明細書；2013年8月28日に出願された同第61/871, 301号明細書；2013年9月25日に出願された同第61/960, 777号明細書及び2013年10月28日に出願された同第61/961, 980号明細書が参照される。なおも更に、各々2014年6月10日、6/10/14に出願されたPCT特許出願：PCT/米国特許出願公開第2014/041803号明細書、PCT/米国特許出願公開第2014/041800号明細書、PCT/米国特許出願公開第2014/041809号明細書、PCT/米国特許出願公開第2014/041804号明細書及びPCT/米国特許出願公開第2014/041806号明細書；2014年6月11日に出願されたPCT/米国特許出願公開第2014/041808号明細書；及び2014年10月28日に出願されたPCT/米国特許出願公開第2014/62558号明細書及び各々2013年12月12日に出願された米国仮特許出願第61/915, 150号明細書、同第61/915, 301号明細書、同第61/915, 267号明細書及び同第61/915, 260号明細書；2013年1月29日及び2013年2月25日に出願された同第61/757, 972号明細書及び同第61/768, 959号明細書；2013年6月17日に出願された同第61/835, 936号明細書、同第61/836, 127号明細書、同第61/836, 101号明細書、同第61/836, 080号明細書、同第61/835, 973号明細書及び同第61/835, 931号明細書；両方とも2014年6月11日に出願された同第62/010, 888号明細書及び同第62/010, 879号明細書；各々2014年6月10日に出願された同第62/010, 329号明細書及び同第62/010, 441号明細書；各々2014年2月12日に出願された同第61/939, 228号明細書及び同第61/939, 242号明細書；2014年4月15日に出願された同第61/980, 012号明細書；2014年8月17日に出願された同第62/038, 358号明細書；各々2014年9月25日に出願された同第62/054, 490号明細書、同第62/055, 484号明細書、同第62/055, 460号明細書及び同第62/055, 487号明細書；及び2014年10月27日に出願された同第62/069, 243号明細書が参照される。また、2014年9月25日に出願された米国仮特許出願第62/055, 484号明細書、同第62/055, 460号明細書及び同第62/055, 487号明細書；2014年4月15日に出願された米国仮特許出願第61/980, 012号明細書；及び2014年2月12日に出願された米国仮特許出願第61/939, 242号明細書も参照される。特に米国を指定するPCT出願、2014年6月10日に出願されたPCT/米国特許出願公開第14/41806号明細書が参照される。2014年1月22日に出願された米国仮特許出願第61/930, 214号明細書が参照される。各々2013年12月12日に出願された米国仮特許出願第61/915, 251号明細書；同第61/915, 260号明細書及び同第61/915, 267号明細書が参照される。2014年4月15日に出願された米国特許出願第61/980, 012号明細書が参照される。特に米国を指定するPCT出願、2014年6月10日に出願されたPCT/米国特許出願公開第14/41806号明細書が参照される。2014年1月22日に出願された米国仮特許出願第61/930, 214号明細書が参照される。各々2013年12月12日に出願された米国仮特許出願第61/915, 251号明細書；同第61/915, 260号明細書及び同第61/915, 267号明細書が参照される。

【0711】

また、14年12月12日に出願された米国仮特許出願第62/091, 455号明細書、「PROTECTED GUIDE RNAS (PGRNAS)」；米国仮特許出願

第62/096, 708号明細書、14年12月24日、「PROTECTED GUIDES RNAS (PGRNAS)」；米国仮特許出願第62/091, 462号明細書、14年12月12日、「DEAD GUIDES FOR CRISPR TRANSCRIPTION FACTORS」；米国仮特許出願第62/096, 324号明細書、14年12月23日、「DEAD GUIDES FOR CRISPR TRANSCRIPTION FACTORS」；米国仮特許出願第62/091, 456号明細書、14年12月12日、「ESCORTED AND FUNCTIONALIZED GUIDES FOR CRISPR-CAS SYSTEMS」；米国仮特許出願第62/091, 461号明細書、14年12月12日、「DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR GENOME EDITING AS TO HEMATOPOETIC STEM CELLS (HSCs)」；米国仮特許出願第62/094, 903号明細書、14年12月19日、「UNBIASED IDENTIFICATION OF DOUBLE-STRAND BREAKS AND GENOMIC REARRANGEMENT BY GENOME-WISE INSERT CAPTURE SEQUENCING」；米国仮特許出願第62/096, 761号明細書、14年12月24日、「ENGINEERING OF SYSTEMS, METHODS AND OPTIMIZED ENZYME AND GUIDE SCAFFOLDS FOR SEQUENCE MANIPULATION」；米国仮特許出願第62/098, 059号明細書、14年12月30日、「RNA-TARGETING SYSTEM」；米国仮特許出願第62/096, 656号明細書、14年12月24日、「CRISPR HAVING OR ASSOCIATED WITH DESTABILIZATION DOMAINS」；米国仮特許出願第62/096, 697号明細書、14年12月24日、「CRISPR HAVING OR ASSOCIATED WITH AAV」；米国仮特許出願第62/098, 158号明細書、14年12月30日、「ENGINEERED CRISPR COMPLEX INSERTIONAL TARGETING SYSTEMS」；米国仮特許出願第62/151, 052号明細書、15年4月22日、「CELLULAR TARGETING FOR EXTRACELLULAR EXOSOMAL REPORTING」；米国仮特許出願第62/054, 490号明細書、14年9月24日、「DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING DISORDERS AND DISEASES USING PARTICLE DELIVERY COMPONENTS」；米国仮特許出願第62/055, 484号明細書、14年9月25日、「SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR-CAS SYSTEMS」；米国仮特許出願第62/087, 537号明細書、14年12月4日、「SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR-CAS SYSTEMS」；米国仮特許出願第62/054, 651号明細書、14年9月24日、「DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR MODELING COMPETITION OF MULTIPLE CANCER MUTATIONS IN VIVO」；米国仮特許出願第62/067, 886号明細書、14年10月23日、「DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR MODELING COMPETITION OF MULTIPLE CANCER MUTATIONS IN VIVO」；米

国仮特許出願第62/054, 675号明細書、14年9月24日、「DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS IN NEURONAL CELLS/TISSUES」；米国仮特許出願第62/054, 528号明細書、14年9月24日、「DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS IN IMMUNE DISEASES OR DISORDERS」；米国仮特許出願第62/055, 454号明細書、14年9月25日、「DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING DISORDERS AND DISEASES USING CELL PENETRATION PEPTIDES (CPP)」；米国仮特許出願第62/055, 460号明細書、14年9月25日、「MULTIFUNCTIONAL-CRISPR COMPLEXES AND/OR OPTIMIZED ENZYME LINKED FUNCTIONAL-CRISPR COMPLEXES」；米国仮特許出願第62/087, 475号明細書、14年12月4日、「FUNCTIONAL SCREENING WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR-CAS SYSTEMS」；米国仮特許出願第62/055, 487号明細書、14年9月25日、「FUNCTIONAL SCREENING WITH OPTIMIZED FUNCTIONAL CRISPR-CAS SYSTEMS」；米国仮特許出願第62/087, 546号明細書、14年12月4日、「MULTIFUNCTIONAL CRISPR COMPLEXES AND/OR OPTIMIZED ENZYME LINKED FUNCTIONAL-CRISPR COMPLEXES」；及び米国仮特許出願第62/098, 285号明細書、14年12月30日、「CRISPR MEDIATED IN VIVO MODELING AND GENETIC SCREENING OF TUMOR GROWTH AND METASTASIS」も挙げられる。

【0712】

これらの特許、特許公報及び出願の各々並びにそれらの中に又はそれらの審査中に引用される全ての文献（「出願引用文献」）及び出願引用文献において引用又は参照される全ての文献は、それらの中で言及される又はそれらの中にある任意の文献において言及される及び参照によって本明細書に援用される任意の製品に関する任意の指示書、説明書、製品仕様書及びプロダクトシートと共に、本明細書によって参照により本明細書に援用され、且つ本発明の実施に用いられ得る。全ての文献（例えば、これらの特許、特許公報及び出願並びに出願引用文献）は、各個別の文献が参照によって援用されることが具体的且つ個別的に示されたものとみなすのと同程度に参照により本明細書に援用される。

【0713】

また、CRISPR-Cas系に関する一般情報に関しては、以下を挙げることができる（同様に参照により本明細書に援用される）：

- ・ “Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems”. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. Science Feb 15; 339 (6121): 819-23 (2013);
- ・ “RNA-guided editing of bacterial genome s using CRISPR-Cas systems”. Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F, Marraffini LA. Nat Biotechnol Mar; 31 (3): 233-9 (2013);
- ・ “One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas

- Mediated Genome Engineering”. Wang H. , Yang H. , Shivalila CS. , Dawlaty MM. , Cheng AW. , Zhang F. , Jaenisch R. Cell May 9 ; 153 (4) : 910–8 (2013) ;
- “Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states”. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Hsu PD, Heidenreich M, Cong L, Platt RJ, Scott DA, Church GM, Zhang F. Nature. Aug 22 ; 500 (7463) : 472–6. doi:10. 1038/Nature12466. Epub 2013 Aug 23 (2013) ; 10
- “Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity”. Ran, FA. , Hsu, PD. , Lin, CY. , Gootenberg, J S. , Konermann, S. , Trevino, AE. , Scott, DA. , Inoue, A. , Matoba, S. , Zhang, Y. , & Zhang, F. Cell Aug 28. pii: S0092–8674 (13) 01015–5 (2013–A) ;
- “DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases”. Hsu, P. , Scott, D. , Weinstein, J. , Ran, FA. , Konermann, S. , Agarwala, V. , Li, Y. , Fine, E. , Wu, X. , Shalem, O. , Cradick, TJ. , Marraffini, LA. , Bao, G. , & Zhang, F. Nat Biotechnol doi:10. 1038/nbt. 2647 (2013) ; 20
- “Genome engineering using the CRISPR–Cas9 system”. Ran, FA. , Hsu, PD. , Wright, J. , Agarwala, V. , Scott, DA. , Zhang, F. Nature Protocols Nov ; 8 (11) : 2281–308 (2013–B) ;
- “Genome-Scale CRISPR–Cas9 Knockout Screening in Human Cells”. Shalem, O. , Sanjana, NE. , Hartenian, E. , Shi, X. , Scott, DA. , Mikkelsen, T. , Heckl, D. , Ebert, BL. , Root, DE. , Doench, JG. , Zhang, F. Science Dec 12. (2013). [Epub ahead of print] ; 30
- “Crystal structure of cas9 in complex with guide RNA and target DNA”. Nishimasu, H. , Ran, FA. , Hsu, PD. , Konermann, S. , Shehata, SI. , Dohmae, N. , Ishitani, R. , Zhang, F. , Nureki, O. Cell Feb 27, 156 (5) : 935–49 (2014) ;
- “Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells”. Wu X. , Scott DA. , Kriz AJ. , Chiu AC. , Hsu PD. , Dado DB. , Cheng AW. , Trevino AE. , Konermann S. , Chen S. , Jaenisch R. , Zhang F. , Sharp PA. Nat Biotechnol. Apr 20. doi:10. 1038/nbt. 2889 (2014) ; 40
- “CRISPR–Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling”. Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic 50

- M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng G, Sharp PA, Zhang F. *Cell* 159 (2) : 440–455 DOI:10.1016/j.cell.2014.09.014 (2014) ;
- ・ “Development and Applications of CRISPR–Cas9 for Genome Engineering”, Hsu PD, Lander ES, Zhang F., *Cell*. Jun 5;157 (6) : 1262–78 (2014)
- ・ “Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system”, Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES., *Science*. January 3;343 (6166) : 80–84. doi:10.1126/science.1246981 (2014) ; 10
- ・ “Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR–Cas9-mediated gene inactivation”, Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Thova Z, Hegde M, Smith I, Sullender M, Ebert BL, Xavier RJ, Root DE., (オンライン発行 3 September 2014) *Nat Biotechnol*. Dec;32 (12) : 1262–7 (2014) ; 20
- ・ “In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR–Cas9”, Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li Y, Trombetta J, Sur M, Zhang F., (オンライン発行 19 October 2014) *Nat Biotechnol*. Jan;33 (1) : 102–6 (2015) ;
- ・ “Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR–Cas9 complex”, Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F., *Nature*. Jan 29;517 (7536) : 583–8 (2015) 30
- ・ “A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation”, Zetsche B, Volz SE, Zhang F., (published online 02 February 2015) *Nat Biotechnol*. Feb;33 (2) : 139–42 (2015) ;
- ・ “Genome-wide CRISPR Screen in a Mouse Model of Tumor Growth and Metastasis”, Chen S, Sanjana NE, Zheng K, Shalem O, Lee K, Shi X, Scott DA, Song J, Pan JQ, Weissleder R, Lee H, Zhang F, Sharp PA. *Cell* 160, 1246–1260, March 12, 2015 (マウスにおける多重スクリーニング)、及び 40
- ・ “In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9”, Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F., (published online 01 April 2015), *Nature*. Apr 9;520 (7546) : 186–91 (20 50

15)

- ・Shalem et al., “High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9”, *Nature Reviews Genetics* 16, 299–311 (May 2015)
- ・Xu et al., “Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design”, *Genome Research* 25, 1147–1157 (August 2015)
- ・Parnas et al., “A Genome-wide CRISPR Screen in Primary Immune Cells to Dissect Regulatory Networks”, *Cell* 162, 675–686 (July 30, 2015) 10
- ・Ramanan et al., “CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus”, *Scientific Reports* 5:10833. doi:10.1038/srep10833 (June 2, 2015)
- ・Nishimasu et al., “Crystal Structure of *Staphylococcus aureus* Cas9”, *Cell* 162, 1113–1126 (Aug. 27, 2015)
- ・Zetsche et al. (2015), “Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system”, *Cell* 163, 759–771 (Oct. 22, 2015) doi:10.1016/j.cell.2015.09.038. Epub Sep. 25, 2015 20
- ・Shmakov et al. (2015), “Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems”, *Molecular Cell* 60, 385–397 (Nov. 5, 2015) doi:10.1016/j.molcell.2015.10.008. Epub Oct 22, 2015
- ・Dahlman et al., “Orthogonal gene control with a catalytically active Cas9 nuclease”, *Nature Biotechnology* 33, 1159–1161 (November, 2015) 30
- ・Gao et al., “Engineered Cpf1 Enzymes with Altered PAM Specificities”, *bioRxiv* 091611; doi:http://dx.doi.org/10.1101/091611 Epub Dec. 4, 2016
- ・Smargon et al. (2017), “Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28”, *Molecular Cell* 65, 618–630 (Feb. 16, 2017) doi:10.1016/j.molcell.2016.12.023. Epub Jan 5, 2017 40

この各々が参照により本明細書に援用され、本発明の実施において考慮され得、及び以下に簡単に考察する：

- ・Cong et al. は、サーモフィラス菌 (*Streptococcus thermophilus*) Cas9 及びまた化膿性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9 の両方に基づき、真核細胞で使用される II 型 CRISPR/Cas 系をエンジニアリングし、Cas9 ヌクレアーゼが低分子 RNA の指図を受けてヒト及びマウス細胞で正確な DNA 切断を誘導し得ることを実証した。この著者らの研究は、ニッキング酵素に変換される Cas9 を使用して、最小限の変異原活性を有する真核 50

細胞での相同性組換え修復を促進し得ることを更に示した。加えて、この著者らの研究は、複数のガイド配列を単一のCRISPR配列にコードすることによって哺乳類ゲノム内の内在性ゲノム遺伝子座部位で幾つかを同時に編集することが可能となり得ることを実証し、RNAガイドヌクレアーゼ技術の容易なプログラム可能性及び広範な適用性を実証した。このようにRNAを使用して細胞における配列特異的DNA切断をプログラムすることが可能となり、ゲノムエンジニアリングツールの新しいクラスが定義された。これらの研究は、他のCRISPR遺伝子座が哺乳類細胞に移植可能である可能性があり、哺乳類ゲノム切断も媒介し得ることを更に示した。重要なことに、CRISPR/Cas系の幾つかの側面を更に改良してその効率及び多用途性を高め得ることが想定され得る。

・Jiang et al. は、デュアルRNAと複合体を形成したクラスター化等間隔短鎖回分リピート (CRISPR) 関連Cas9エンドヌクレアーゼを使用して、肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 及び大腸菌 (*Escherichia coli*) のゲノムに正確な突然変異を導入した。この手法は、標的ゲノム部位におけるデュアルRNA: Cas9誘導切断によって非突然変異細胞を死滅させることに依存するものであり、選択可能マーカー又は対抗選択系の必要性が回避される。この研究は、単一及び複数のヌクレオチド変化が生じるように短鎖CRISPR RNA (crRNA) の配列を変えることによってデュアルRNA: Cas9特異性を再プログラム化すると、鋳型の編集が行われることを報告した。この研究は、2つのcrRNAを同時に使用すると突然変異誘発の多重化が可能であることを示した。更に、この手法を組換えと組み合わせて用いたとき、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) では、記載される手法を用いて回収された細胞のほぼ100%が所望の突然変異を含み、大腸菌 (*E. coli*) では回収された細胞の65%が突然変異を含んだ。

・Wang et al. (2013) はCRISPR/Cas系を用いることにより、胚性幹細胞における逐次的組換え及び／又は及び／又は時間のかかる単一突然変異を有するマウスの交雑による複数の段階で従来作成された複数の遺伝子に突然変異を保有するマウスを一段階で作成した。CRISPR-Cas系は機能的に重複する遺伝子及び上位遺伝子相互作用のインビボ研究を大幅に加速させ得る。

・Koner mann et al. (2013) は、CRISPR Cas9酵素及びまた転写活性化因子様エフェクターに基づくDNA結合ドメインの光学的及び化学的調節を可能にする多用途の且つロバストな技術が当該技術分野で必要とされていることに対処した。

・Ran et al. (2013-A) は、Cas9ニッカーゼ突然変異体を対のガイドRNAと組み合わせて標的二本鎖切断を導入するという手法を記載した。これは、微生物CRISPR-Cas系のCas9ヌクレアーゼがガイド配列によって特異的なゲノム遺伝子座に標的化されるが、ガイド配列はDNA標的との幾らかのミスマッチに耐えることができるため、従って望ましくないオフターゲット突然変異誘発を促進し得るという問題に対処する。ゲノム中の個々のニックは高いフィデリティで修復されるため、二本鎖切断には適切にオフセットしたガイドRNAによる同時のニックングが必要であり、標的切断のために特異的に認識される塩基の数が大きくなる。この著者らは、対のニックングを使用して細胞系におけるオフターゲット活性を50~1, 500分の1に減らし、オンターゲット切断効率を犠牲にすることなしにマウス接合体における遺伝子ノックアウトを促進し得ることを実証した。この多用途戦略により、高い特異性が要求される多種多様なゲノム編集適用が可能となる。

・Hsu et al. (2013) は、標的部位の選択を知らせ、且つオフターゲット効果を回避するためのヒト細胞におけるSpCas9ターゲティングの特異性を特徴付けた。この研究は、700個を超えるガイドRNA変異体並びに293T及び293FT細胞の100個を超える予測ゲノムオフターゲット遺伝子座におけるSpCas9誘導インデル突然変異レベルを評価した。この著者ら、SpCas9が、ミスマッチの数、位置及び分布に感受性を示して配列依存的に種々の位置におけるガイドRNAと標的DNAとの間のミスマッチに耐えること。この著者らは、SpCas9媒介性切断がDNAメチル化

10

20

30

40

50

の影響を受けないこと、SpCas9及びsgRNAの投与量を滴定してオフターゲット改変を最小限に抑え得ることを更に示した。加えて、哺乳類ゲノムエンジニアリング適用を促進するため、この著者らは、標的配列の選択及び検証並びにオフターゲット解析をガイドするウェブベースのソフトウェアツールの提供を報告した。

・Ran et al. (2013-B)は、哺乳類細胞における非相同末端結合 (NHEJ) 又は相同性組換え修復 (HDR) を用いたCas9媒介性ゲノム編集用並びに下流機能研究のための改変細胞系作成用のツールの組を記載した。オフターゲット切断を最小限に抑えるため、この著者らは、対のガイドRNAを含むCas9ニッカーゼ突然変異体を使用した二重ニッキング戦略を更に記載した。この著者らによって提供されるプロトコルから、標的部位の選択、切断効率の評価及びオフターゲット活性の分析に関する指針が実験的に導かれた。この研究は、標的設計から始めて、僅か1～2週間以内に遺伝子改変を達成し得ると共に、2～3週間以内に改変クローン細胞系を誘導し得ることを示した。

・Shalem et al. は、ゲノムワイドな規模で遺伝子機能を調べる新しい方法を記載した。この著者らの研究は、64,751個のユニークなガイド配列で18,080個の遺伝子を標的化するゲノム規模のCRISPR-Cas9ノックアウト (GeCKO) ライブラリの送達、ヒト細胞におけるネガティブ選択及びポジティブ選択の両方のスクリーニングを可能にしたことを示した。第一に、この著者らは、GeCKOライブラリを使用した、癌及び多能性幹細胞における細胞生存にとって不可欠な遺伝子の同定を示した。次に、この著者らは黒色腫モデルにおいて、その欠損が突然変異体プロテインキナーゼBRAFを阻害する治療薬ベムラフェニブに対する耐性に関わる遺伝子をスクリーニングした。この著者らの研究は、最も上位にランク付けされた候補に、以前検証された遺伝子NF1及びMED12並びに新規ヒットNF2、CUL3、TADA2B及びTADA1が含まれたことを示した。この著者らは、同じ遺伝子を標的化する独立したガイドRNA間における高度な一致及び高率のヒット確認を観察し、従ってCas9によるゲノム規模スクリーニングの有望さを実証した。

・Nishimasu et al. は、2.5 Åの分解能でsgRNA及びその標的DNAと複合体形成する化膿性連鎖球菌 (Streptococcus pyogenes) Cas9の結晶構造を報告した。この構造から、標的認識ローブとヌクレアーゼローブとで構成された、それらの界面にある正電荷の溝にsgRNA:DNAヘテロ二本鎖を受け入れる2ローブ構成が明らかになった。認識ローブはsgRNA及びDNAの結合に決定的に重要であるのに対し、ヌクレアーゼローブはHNH及びRuvCヌクレアーゼドメインを含み、これらのドメインは標的DNAのそれぞれ相補鎖及び非相補鎖の切断に適切な位置にある。ヌクレアーゼローブは、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) との相互作用に参与するカルボキシル末端ドメインも含む。この高分解能構造解析及び付随する機能解析により、Cas9によるRNAガイド下DNAターゲティングの分子機構が明らかになることで、従って新規の多用途ゲノム編集技術の合理的な設計への道が開かれつつある。

・Wu et al. は、マウス胚性幹細胞 (mESC) においてシングルガイドRNA (sgRNA) を負荷した化膿性連鎖球菌 (Streptococcus pyogenes) 由来の触媒不活性Cas9 (dCas9) のゲノムワイドな結合部位をマッピングした。この著者らは、試験した4つのsgRNAの各々が、多くの場合にsgRNAにおける5ヌクレオチドシード領域及びNGGプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) によって特徴付けられる数十個ないし数千個のゲノム部位にdCas9を標的化することを示した。クロマチンが接触不可能であることにより、一致するシード配列を含む他の部位に対するdCas9結合が減少し、従ってオフターゲット部位の70%が遺伝子と会合する。この著者らは、触媒活性Cas9を形質移入したmESCにおける295個のdCas9結合部位の標的シーケンシングから、バックグラウンドレベルを上回って突然変異した部位は1つのみ同定されたことを示した。この著者らは、Cas9結合及び切断の2状態モデルを提案しており、このモデルではシードの一致が結合を引き起こすが、切断には標的DNAとの広範な対合が必要である。

10

20

30

40

50

・Platt et al. はCre依存性Cas9ノックインマウスを樹立した。この著者らは、ニューロン、免疫細胞及び内皮細胞においてガイドRNAのアデノ随伴ウイルス(AAV)媒介性、レンチウイルス媒介性又は粒子媒介性送達を用いたインビボ並びにエキソビボゲノム編集を実証した。

・Hsu et al. (2014) は、細胞の遺伝子スクリーニングを含めたヨーグルトからゲノム編集に至るまでのCRISPR-Cas9の歴史を広く考察するレビュー論文である。

・Wang et al. (2014) は、ゲノム規模のレンチウイルスシングルガイドRNA(sgRNA)ライブラリを使用するポジティブ選択及びネガティブ選択の両方に好適なプールされた機能喪失型遺伝子スクリーニング手法に関する。

・Doench et al. は、6個の内因性マウス遺伝子及び3個の内因性ヒト遺伝子のパネルの可能な全ての標的部位にわたってタイリングするsgRNAのプールを作成し、その標的遺伝子のヌル対立遺伝子を産生するそれらの能力を抗体対比染色及びフローサイトメトリーによって定量的に評価した。この著者らは、PAMの最適化により活性が向上することを示し、また、sgRNAを設計するためのオンラインツールも提供した。

・Swiech et al. は、AAV媒介性SpCas9ゲノム編集により脳における遺伝子機能の逆遺伝学研究が可能となり得ることを実証している。

・Koner mann et al. (2015) は、複数のエフェクタードメイン、例えば転写アクチベーター、機能及びエピゲノム調節因子をステム又はテトラループなどのガイド上の適切な位置にリンカーを伴い及び伴わず付加する能力を考察している。

・Zetsche et al. は、Cas9酵素が2つにスプリットされることができ、従って活性化のためのCas9のアセンブリを制御し得ることを実証している。

・Chen et al. は、マウスにおけるゲノムワイドなインビボCRISPR-Cas9スクリーニングによって肺転移の調節遺伝子が明らかになることを実証することによる多重スクリーニングに関する。

・Ran et al. (2015) はSaCas9及びそのゲノム編集能力に関し、生化学アッセイからは推定できないことを実証している。Shalem et al. (2015) は、触媒不活性Cas9(dCas9)融合物を使用して発現を合成的に抑制(CRISPRi)又は活性化(CRISPRa)する方法を記載し、アレイ化且つプール化されたスクリーンを含め、ゲノムスケールのスクリーン用のCas9を使用した進歩、ゲノム遺伝子座を不活性化するノックアウト手法及び転写活性を調節する戦略を示している。

・Shalem et al. (2015) は、触媒的に不活性なCas9(dCas9)の融合物を用いて発現を合成的に抑制(CRISPRi)又は活性化(CRISPRa)する方法について記載し、アレイ化及びプール化されたスクリーニングを含めたゲノム規模のスクリーニング、ゲノム遺伝子座を不活性化させるノックアウト手法及び転写活性を調節する戦略にCas9を用いる進歩を示している。

・Xu et al. (2015) は、CRISPRベースのスクリーニングにおけるシングルガイドRNA(sgRNA)の効率に寄与するDNA配列特徴を評価した。この著者らは、CRISPR/Cas9ノックアウトの効率及び切断部位におけるヌクレオチド優先度を調査した。この著者らは、CRISPRi/aの配列優先度がCRISPR/Cas9ノックアウトのものと実質的に異なることも見出した。

・Parnas et al. (2015) は、ゲノムワイドなプールCRISPR-Cas9ライブラリを樹状細胞(DC)に導入することにより、細菌リポ多糖(LPS)による腫瘍壊死因子(Tnf)の誘導を制御する遺伝子を同定した。Tlr4シグナル伝達の既知の調節因子及びこれまで知られていない候補が同定され、LPSに対するカノニカルな応答への個別的な効果を有する3つの機能モジュールに分類された。

・Ramanathan et al. (2015) は、感染細胞におけるウイルスエピソームDNA(cccDNA)の切断を実証した。HBVゲノムは感染ヘパトサイトの核に、共有結合閉環状DNA(cccDNA)と呼ばれる3.2kbの二本鎖エピソームDNA種と

10

20

30

40

50

して存在し、cccDNAは、現在の治療法によってはその複製が阻害されないHBVライフサイクルの主要な構成成分である。この著者らは、HBVの高度に保存された領域を特異的に標的化するsgRNAがウイルス複製をロバストに抑制し、cccDNAを枯渇させることを示した。

・Nishimasu et al. (2015)は、5'-TTGAAT-3' PAM及び5'-TTGGGT-3' PAMを含有する、シングルガイドRNA (sgRNA) 及びその二本鎖DNA標的との複合体中のSaCas9の結晶構造を報告した。SaCas9とSpCas9の構造比較により、構造的保存及び多様性の両方が明らかとなり、それらの特徴的なPAM特異性及びオルソログsgRNA認識が説明された。

・Zetsche et al. (2015)は、推定クラス2 CRISPRエフェクターであるCpf1の特徴付けを報告した。Cpf1はCas9と異なる特徴をもってロバストなDNA干渉を媒介することが実証された。この干渉機構の同定により、CRISPR-Cas系に関する本発明者らの理解が深まり、そのゲノム編集適用が進歩する。

・Shmakov et al. (2015)は、3つの異なるクラス2 CRISPR-Cas系の特徴付けを報告した。同定された系の2つのエフェクター、C2c1及びC2c3は、Cpf1と遠縁のRuvC様エンドヌクレアーゼドメインを含む。第3の系、Cas13bは、2つの予測HEPN RNアーゼドメインを有するエフェクターを含む。

・Gao et al. (2016)は、構造誘導型飽和突然変異誘発スクリーンを用いてCpf1のターゲティング範囲を増加させることを報告した。AsCpf1変異体が、それぞれTYCV/CCCC及びTATV PAMを有する標的部位を切断することのできる突然変異S542R/K607R及びS542R/K548V/N552Rによってエンジニアリングされ、インビトロ及びヒト細胞における活性が増進した。

【0714】

また、“Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing”, Shengdar Q. Tsai, Nicolas Wyvekens, Cyd K hayter, Jennifer A. Foden, Vishal Thapar, Deepak Reyon, Mathew J. Goodwin, Martin J. Ary ee, J. Keith Joung Nature Biotechnology 32 (6): 569-77 (2014)は、伸長した配列を認識し、且つヒト細胞において内因性遺伝子を高効率で編集することのできる二量体RNAガイド下FokIヌクレアーゼに関する。

【0715】

加えて、sgRNA・Cas9タンパク質含有粒子を調製する方法であって、sgRNA及びCas9タンパク質（及び任意選択でHDR鋳型）を含む混合物を界面活性剤、リン脂質、生分解性ポリマー、リポタンパク質及びアルコールを含むか又はそれらから本質的になるか又はそれらからなる混合物と混合することを含む方法；及びかかる方法からの粒子に関して、「DELIVERY, USE AND THERAPEUTIC APPLICATIONS OF THE CRISPR-CAS SYSTEMS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING DISORDERS AND DISEASES USING PARTICLE DELIVERY COMPONENTS」という名称のPCT出願PCT/米国特許出願公開第14/70057号明細書、代理人整理番号47627.99.2060及びBI-2013/107(2014年9月24日に出願された米国仮特許出願第62/054,490号明細書；2014年6月10日に出願された同第62/010,441号明細書；及び各々2013年12月12日に出願された同第61/915,118号明細書、同第61/915,215号明細書及び同第61/915,148号明細書の1つ以上又は全てからの優先権を主張する)（「粒子送達PCT」）（参照により本明細書に援用される）が挙げられる。例えば、Cas9タンパク質とsgRNAとが、有利には滅菌ヌクレアーゼフリー緩衝液、例えば

1×PBS中に、好適な、例えば3：1～1：3又は2：1～1：2又は1：1のモル比で、好適な温度、例えば15～30℃、例えば20～25℃、例えば室温で、好適な時間、例えば15～45、例えば30分間にわたり共に混合された。それとは別に、界面活性剤、例えばカチオン性脂質、例えば1，2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン（DOTAP）；リン脂質、例えばジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）；生分解性ポリマー、例えばエチレングリコールポリマー又はPEG及びリポタンパク質、例えば低密度リポタンパク質、例えばコレステロールなど又はそれらを含む粒子構成成分が、アルコール、有利にはC₁～₆アルキルアルコール、例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール、例えば100%エタノール中に溶解された。これらの2つの溶液が共に混合され、Cas9-sgRNA複合体を含有する粒子が形成された。従って、複合体全体を粒子に製剤化する前に、sgRNAをCas9タンパク質と予め複合体化し得る。製剤は、細胞への核酸の送達を促進することが知られる種々のモル比の種々の構成成分（例えば、1，2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン（DOTAP）、1，2-ジテトラデカノイル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン（DMPC）、ポリエチレングリコール（PEG）及びコレステロール）で作製され得る。例えば、DOTAP：DMPC：PEG：コレステロールのモル比はDOTAP100、DMPC0、PEG0、コレステロール0；又はDOTAP90、DMPC0、PEG10、コレステロール0；又はDOTAP90、DMPC0、PEG5、コレステロール5、DOTAP100、DMPC0、PEG0、コレステロール0であり得る。従って、本出願は、sgRNA、Cas9タンパク質及び粒子を形成する構成成分を混合すること；並びにか

20

かかる混合からの粒子を包含する。本発明の態様は、粒子；例えば、本発明にあるようなsgRNA及び／又はCas9を含む混合物と、例えば粒子送達PCTにあるような、粒子を形成する構成成分とを混合して粒子を形成することにより、例えば、粒子送達PCTと同様の方法を使用する粒子及びかかる混合からの粒子（又は当然ながら本発明にあるようなsgRNA及び／又はCas9を含む他の粒子）を含み得る。

【実施例】

【0716】

実施例1：Cas13bオルソログ

以下の表1に示すCas13bタンパク質は、有利には、哺乳類細胞での発現にコドン最適化される構築物から作製される。以下の配列は、タンパク質配列の受託番号と共に図1にも示す。Cas13bオルソログのPFSモチーフを表2に提供する。

10

20

30

【表 5】

表1		
バージエラ・ズーヘルカム (<i>Bergeyella zoohelcum</i>)	1	MENKTSLGNNIYYNPFKPQDKSYFAGYFNAAMENTDSVFR ELGKRLKGKEYTSENFFDAIFKENISLVEYERYVKLLSDYFP MARLLDKKEVPIKERKENFKKNFKGIKAVRDLRNFYTHKE HGEVEITDEIFGVLDMLKSTVLTVKKKKVKTDKTEILKK SIEKQLDILCQKKLEYLRDTARKIEEKRRNQRRERGEKELVAP FKYSDKRDDLIAAIYNDAFDVYIDKKKDSLKESSKAKYNTK SDPQQEEGDLKIPISKNGVVFLLSLFLTQEIHAFFSKSIAGFK ATVIDEATVSEATVSHGKNSICFMATHEIFSHLAYKKLKRK VRTAEINYGEAENAEQLSVYAKETLMMQMLDELSKVPDV VYQNLSEDVQKTFIEDWNEYLKENNGDVGTMEEEQVIHPV IRKRYEDKFNYFAIRFLDEFAQFPTLRFQVHLGNYLHDSRPK ENLISDRRIKEKITVFGRLSELEHKKALFIKNTETNEDREHY WEIFPNPNYDFPKENISVNDKDFPIAGSILDREKQPVAGKIGI KVKLLNQYVSEVDKAVKAHQLKQRKASKPSIQNIIEEIVPI NESNPKEAIVFGGQPTAYLSMNDIHSILYEFFDKWEKKKEK LEKKGEKELRKEIGKELEKKIVGKIQAQIQIIDKDTNAKILK PYQDGNSTAIIDKEKLIKDLKQEQNILQKLKDEQTVREKEYN DFIAYQDKNREINKVRDRNHKQYLKDNLKRKYPEARKE VLYYREKGVAVWLANDIKRFMPPTDFKNEWKGEQHSLLQ KSLAYYEQCKEELKNLLPEKVFQHLPFKLGGYFQQKYLYQ FYTCYLDKRLEYISGLVQQAENFKSENKVFKKVENECFKFL KKQNYTHKELDARVQSILGYPIFLERGFMDKPTIHKGKTFK GNEALFADWFRYYKEYQNFQTFYDTENYPLVELEKKQADR KRKTKIYQQKKNDVFTLLMAKHIFKSVFKQDSIDQFSLEDL YQSREERLGNQERARQTGERNTNYIWNKTVDLKLCDGKIT VENVKLKNVGDFIKYEYDQQRVQAFKYEENIEWQAFLIKES KEEENYPYVVEREIEQYEKVRREELLKEVHLIEEYILEKVKD KEILKKGDNQNFKYIILNGLLKQLKNEDVESYKVFNLNTEP EDVNINQLKQEATDLEQKAFVLTYIRNKFAHNQLPKKEFW DYCQEKYGKIEKEKTYAEYFAEVFKKEKEALIK
プレボテラ・インターメディア (<i>Prevotella intermedia</i>)	2	MEDDKKTTDSIRYELKDKHFWAAFLNLARHNVYITVNHIN KILEEGEINRDGYETTLKNTWNEIKDINKKDRLSKLIKHFPF LEAATYRLNPTDTTKQKEEKQAEASLESRLKSFFVFIYKLR DLRNHYSHYKHSKSLERPKEEGLLEKMYNIFNASIRLVKE DYQYNKDINPDEDFKHLDRTEEEFNYYFTKDNEGNITESGL LFFVSLFLEKKDAIWMQQKLRGFKDNRENKKKMTNEVFCR SRMLLPKLRLQSTQTQDWILLDMLNELIRCPKSLYERLREE DREKFRVPIEIADEDYDAEQEPFKNTLVHRHQDRFPYFALRYF DYNEIFTNLRFAQIDLGTYHFSIYKKQIGDYKESHHLTHKLYG FERIQEFTKQNRPDDEWRKFVKTFSFETSKEPYIPETTPHYH LENQKIGIRFRNDNDKIWPSLKTNSEKNEKSKYKLDKSFQA EAFLSVHELLPMMFYLLKTENTDNDNEIETKKKENKND KQEKHKIEEIIENKITEIYALYDTFANGEIKSIDELEEYCKGK DIEIGHLPKQMIAILKDEHKVMATEAERKQEEMLVQVQKSL ESLDNQINEEIIENVERKNSSLSKSGKIASWLVNDMMRFQPVQ KDNEGKPLNNSKANSTHEYQLLQRTLAFSGSEHERLAPYFKQ TKLIESSNPHPFLKDTWEKCNNILSFYRSYLEAKKNFLESL KPEDWEKNQYFLKLKEPKTKPKTLVQGWKNGFNLPRGIFT

10

20

30

40

		EPIRKWFMKHRENITVAELKRVGLVAKVIPLFFSEEYKDSV QPFYNYHFNVGNINKPDEKNFLNCEERRELLRKKKDEFKK MTDKEKEENPSYLEFKSWNKFERELRLVRNQDIVTWLLCM ELFNKKKIKELNVEKIYLNINTNTTKKEKNTEEKNGEEKNI KEKNNILNRIMPMRLPIKVYGRENFSKNKKKKIRRNFTFTV YIEEKGTKLLKQGNFKALERDRRLGGLFSFVKTPSKAESKS NTISKLRVEYELGEYQKARIEIHKDMLALEKTLIDKYNSLDT DNFNKMLTDWLELKGEPAKSFQNDVDLLIAVRNAFASHNQ YPMRNRIAFANINPFSLSANTSEEKGLGIANQLKDKTHKTI EKIIEIEKPIETKE
プレボテラ・ブ ッカエ (Prevotella buccae)	3	MQKQDKLFVDRKKNAIFAFPKYITIMENKEKPEPIYYELTD KHFWAAFLNLARHNVYTTINHINRRLEIAELKDDGYMMGI KGSWNEQAKKLDKKVRLRDLIMKHFPFLEAAA YEMTNSKS PNNKEQREKEQSEALSLNNLKNVLFIFLEKLQVLRNYYSHY KYSEESPKPIFETSLLKNMYKVFDANVRLVKRDYMHENID MQRDFTHLNRKKQVGRTKNIIDSPNFHYHFADKEGNMTIA GLLFFVSLFLDKKDAIWMQKKLKGFKDGRNLREQMTNEVF CRSRISLPKLKLENVQTKDWMQLDMLNELVRCPKSLYERL REKDRESFKVPFDIFSDDYNAEEEPFKNTLVRHQDRFPYFVL RYFDLNEIFEQLRFQIDLGTYHFSIYNKRIGDEDEVRLTHH LYGFARIQDFAPQNQPEEWRKLVKDLDFHETSQEPYISKTA PHYHLENEKIGIKFCSAHNNLPSLQTDKTCNGRSKFNLTGTQ FTAEAFLSVHELLPMMFYLLLT KDYSRKESADKVEGIIRK EISNIYAIYDAFANNEINSIADLTRRLQNTNILQGHLPKQMISI LKGRQKDMGKEAERKIGEMIDDTQRRLDLLCKQTNQKIRIG KRNAGLLKSGKIADWL VNDMMRFQPVQKDQNNIPINNSKA NSTEYRMLQRALALFGSENFRLKAYFNQMNLVGNDNPHPF LAETQWEHQTNILSFYRNYLEARKKYLKGLKPQNWKQYQ HFLILKVQKTNRNTLVTGWKNSFNLPRGIFTQPIREWFEKH NNSKRIYDQILSFDRVGFVAKAIPLYFAEEYKDNVQPFYDY PFNIGNRLKPKKRQFLDKKERVWQKNKELFKNYPSEKK KTDLAYLDFLSWKKFERELRLIKNQDIVTWLMFKELFNMA TVEGLKIGEIHLRDIDTNTANEESNNILNRIMPMKLPVKTYE TDNKGNILKERPLATFYIETETKVLKQGNFKALVKDRRLN GLFSFAETTDNLNLEEHPISKLSVDLELIKYQTTRISIFEMTLGL EKKLIDKYSTLPTDSFRNMLERWLQCKANRPELKNYVNSLI AVRNAFSHNQYPMYDATLFAEVKKFTLFPSVDTKKIELNIA PQLLEIVGKAIKEIEKSENKN
ポルフィロモナ ス・ジンジバリ ス (Porphyromonas gingivalis)	4	MNTVPASENKGQSRTVEDDPQYFGLYLNLAENLIEVESHV RIKFGKKKLNEESLKQSLLCDHLLSVDRWTKVYGHSRRYLP FLHYFDPDSQIEKDHDSTGTGVPDSAQRLIRELYSLDFLRN DFSHNRLDGTTFEHLEVSPDISSFITGTYSLACGRAQSRFAVF FKPDDFVLAKNRKEQLISVADGKECLTVSGFAFFICLFLDRE QASGMLSRIRGFKRTDENWARAVHETFCDL CIRHPHDRLES SNTKEALLDMLNELNRCPRILYDMLPEEERAQFLPALDEN SMNNLSESLDEESRLLWDGSSDWAELTKRIRHQDRFPYL MLRFIEEMDLLKGIRFRVDLGEIELDSYSKKVGRNGEYDRTI TDHALAFGKLSDFQNEEEVSRMISGEASYPVRFSLFAPRYAI YDNKIGYCHTSDPVYPKSKTGEKRALSNPQSMGFISVHDLR KLLLMELLCEGSFSRMQSDFLRKANRILDETAEGKLQFSAL FPEMRHRFIPPQNPKSKDRREKAETTLEKYKQEIKGRKDKL

10

20

30

40

40

		YASINGKDVNKSVEQYLYHLHLLYEKILTISGQTIKEGRVD VEDYRPLLDKLLLRPASNGEELRRELKLLPKRVC DLLSNR FDCSEGVS AVEKRLKAILLRHEQLLLSQNPALHIDKIKSVID YLYLFFSDDEKFRQQPTEKAHRGLKDEEFQMYHYLVGDYD SHPLALWKELEASGR LKPEMRKLT SATSLHGLYMLCLKGT VEWCRKQLMSIGKGTAKVEAIADRVGLKLYDKLKEYTPEQ LREVKLVVMHGYAAAATPKPKAQA AIPSKLTELRFYSFLG KREMSFAAFIRQDKKAQKLWLRNFYTVENIKTLQKRQAAA DAACKKLYNLVGEVERVHTNDKVLVLVAQRYRERLLNVG SKCAVTLDNPERQQKLADVVEVQNAWLSIRFDDLDFTLTH VNLSNLRKAYNLIPRKHILAFKEYLDNRVKQKLCEE CRNVR RKEDLCTCCSPRYSNLT SWLKENHSESSIEREAATMMLLDV ERKLLSFLLDERRKAIEY GKFIPFSALVKECRLADAGLCGIR NDVLHDNVISYADAIGKLSAYFPKEASEAVEYIRRTKEVRE QRREELMANSSQ	10
プレボテラ属種 (Prevotella sp.) MA2016	7	MSKECKKQRQEKKRRLQKANFSISLTGKHVFGAYFNMART NFVKTINYILPIAGVRGNYS ENQINKMLHALFLIQAGRNEEL TTEQKQWEKKLRLNPEQQTKFQKLLFKHFPVLGPMMA DV ADHKAYLNKKKSTVQTEDETFAMLKGVSLADCLDIICLMA DTLTECRNFYTHKDPYNKPSQLADQYLHQEMI AKKLDKVV VASRRILKDREGLSVNEVEFLT GIDHLHQEVLKDEF GNAKV KDGKVMKTFVEYDDFYFKISGKRLVNGYTVTTKDDKPVN VNTMLPALSDFGLLYFCVLF LSKPYAKLFIDEVRLFEYSPFD DKENMIMSEMLSIYRIRTPRLHKIDSHDSKATLAM DIFGELR RCPMELYNLLDKNAGQPFFHDEVKHPNSHTPDVSKRLRYD DRFPTLALRYIDETELFKRIRFQLQLGSFRYKFYDKENCIDG RVRVRRIQKEINGYGRMQEVADKRM DKWGD LIQKREERS VKLEHEELYINLDQFLED TADSTPYVTD RRPAYNIHANRIGL YWEDSQNPKQYKVFDENGMYIPELVVTE DKKAPIKMPAPR CALSVYDLPAMLFYEYLREQQDNEFP SAEQVIEYEDDYRK FFKAVAEGK LKPFKRPKEFRDF LKKEYPKLRMADIPKKLQL FLCSHGLCYNNKPETVYERLDRLTLQHLEERELHIQNRLEH YQKDRDMIGNKDNQYGKKSFS DVRHGALARYLAQSMME WQPTKLKDKEKGHDKLTGLNYNVLTAYLATY GHPQVPPEE GFTPR TLEQVLINAH LIGGSNPHPFINKVLALGNRNIEELYLH YLEEELKHIRSRIQSLSSNPSDKALSALPFIH HDRMRYHERTS EEMMALAARYTTIQLPDGLFTPYILEILQKH YTENS DLQNA LSQDVPVKLNPTCNAAYLITLFYQTVLKDNAQPFYLS DKTY TRNKDGEKAESFSFKRAYELFSVLN NNNKKDTFPFEMIPLFLT SDEIQUERLSAKLLDGDGNPVPEVGEKGK PATDSQGN TIWKR RIYSEVDDYAEKLTDRDMKISFKGEWEKLPRWKQDKI IRR DETRRQMRDELLQRMPRYIRDIKDNERTL RRYKTQDMVLF LLAEKMFTNIISEQSSEFNWKQMRLSKVCNEAFLRQTLTFR VPVTVGETTIYVEQENMSLK NYGEFYRFLTDDR LMSLLNNI VETLKP NENGDLVIRHTDLMSELAAYDQYRSTIFMLIQSIEN LIITNNAVLDDPDADGFWVREDLPKRNNFASLLELINQLNN VELTDDERKLLVAIRNAFSHNSYNIDFSLIKDV KHLPEVAKG ILQHLQSM LGVEITK	20 30 40

リエメラ・アナティペステファー (Riemerella anatipestifer)	8	MEKPLLPNVYTLKHKFFWGAFLNIARHNAFITICHINEQLGL KTPSNDDKIVDVVCETWNNILNNDHDLKKSQTELILKHF PFLTAMCYHPPKKEGKKKGHQKEQQKEKESEAQSQAELN PSKLIEALEILVNQLHSLRNYYSHYKHKKPDAEKDIFKHLY KAFDASLRMVKEDYKAHFTVNLTRDFAHLNRKGKNKQDN PDFNRYRFEKDGFFTESGLFFTNLFLDKRDAYWMLKKVS GFKASHKQREKMTTEVFCSRILLPKLRLESRYDHNQMLLD MLSELSRCPKLLYEKLSEENKKHFQVEADGFLDEIEEEQNP KDTLIRHQDRFPYFALRYLDL NESFKSIRFQVDLGTYHYCIY DKKIGDEQEKRLHTRTLLSFGRLQDFTENRPQEWKALTKD LDYKETSQPFISKTTPHYHITDNKIGFRLGTSKELYPSEIK DGANRIAKYPYNSGFVAHAFISVHELLPLMFYQHLTGKSED LLKETVRHIQRIYKDFEERINTIEDLEKANQGRPLGAFPK QMLGLLQNKQPDLESEKAKIKIEKLAETKLLSHRLNTKLKSS PKLGKRREKLIKTVGLADWLKDFMRFQPVAYDAQNQPIK SSKANSTEFWFIRRALALYGGEKNRLEGYFKQTNLIGNTP HPFLNKFNWKACRNLVDFYQQYLEQREKFLEAIKNQPWEP YQYCLLLKIPKENRKNLVKGWEQGGISLPRGLFTEAIRETLS EDLMLSKPIRKEIKKHGRVGFISRAITLYFKEYQDKHQSFY NLSYKLEAKAPLLKREEHYEYWQQNKQSPTESQRLELHTS DRWKDYLLYKRWQHLEKKRLRYRNQDVMLWMLTLELTK NHFKELNLYHQLKLENLAVNVQEADAKLNPLNQTLPMV LPVKVYPATAFGEVQYHKTPIRTVYIREEHTKALKMGNFKA LVKDRRLNGLFSFIKEENDTQKHPISQLRLRRELEIYQSLRV DAFKETLSLEEKLLNKHTSLSSLENEFRALLEEWKKEYAAS SMVTDEHIAFIASVRNAFCHNQYPFYKEALHAPIPLFTVAQP TTEEKDGLGIAEALLKVLREYCEIVKSQI
プレボテラ・アウランティアカ (Prevotella aurantiaca)	9	MEDDKKTTGSISYELKDKHFWAAFLNLARHNVYITINHINK LLEIREIDNDEKVLDIKTLWQKGNKDLNQKARLRELMTKHF PFLATAIYTKNKEDKKEVKQEKQAEQAQSLESKDCFLFLD KLQEARNNYSHYKYSEFSKEPEFEEGLLEKMYNIFGNNIQL VINDYQHNDKINPDEDFKHLDRKGQFKYSFADNEGNITESG LLFFVSLFLEKKDAIWMQQKLNFGKDNLENKKKMTHEVFC RSRILMPKLRLESTQTQDWILLDMLNELIRCPKSLYERLQGD DREKFKVPFDPADEDYNAEQEPFKNTLIRHQDRFPYFVLRY FDYNEIFKNLRFQIDLGTYHFSIYKKLIGGQKEDRHLTHKLY GFERIQEFAKQNRPDDEWKAIVKDLDTYETSNKRYISETTPH YHLENQKIGIRFRNGNKEIWPSLKTNDENNEKSKYKLDKQY QAEAFLSVHELLPMMFYLLKKEKPNNDENASIVEGFIKR EIRNIFKLYDAFANGEINNIDDLEKYCADKGIPKRHLPKQMV AILYDEHKDMVKEAKRKQKEMVKDTKKLLATLEKQTQKE KEDDGRNVKLLKSGEIARWL VNDMMRFQPVQKDN EGKPL NNSKANSTEYQMLQRSLALYNNEEKPTRYFRQVN LIESNNP HPFLKWKWECCNNILTFYYSYLT KKIEFLNKLKPEDWKK NQYFLKLKEPKTNRET LVQGWKNGFNLPRGIFTEPIREWFK RHQNNKEYEYKVEALDRVGL VTKVIPLFFKEEYFKDKEENF KEDTQKEINDCVQPFYNFPYNVGNHHPKEKDFLHREERIEL WDKKKDKFKGYKEKIKSKKLT EKDKKEEFRSYLEFQSWNKF ERELRLVRNQDIVTWLLCKELIDKLKIDELNIEELKKLRLNN IDTDTAKKEKNILNRVMPMELPVTVYEIDDSHKIVKDKPL HTIYIKEAETKLLKQGNFKALVKDRRLNGLFSFVKTNSEAE

10

20

30

40

		SKRNPISKLRVEYELGEYQEARIEIIQDMLALEEKLINKYKD LPTNKFSEMLNSWLEGKDEADKARFQNDVDFLIAVRNAFS HNQYPMHNKIEFANIKPFSLYTANNSEEKGLGIANQLKDKT KETTDKIKKIEKPIETKE
プレボテラ・サ ッカロリティカ (Prevotella saccharolytica)	10	MEDKPFWAFFNLARHNVYLTVNHINKLLDLEKLYDEGKH KEIFEREDIFNISDDVMNDANSNGKKRKLDIKKIWDDLDTD LTRKYQLRELILKHFPFIQPAIIGAQTKERTTIDKDKRSTSTS NDSLKQTGEGDINDLLSLSNVKSMMFFRLLQILEQLRNYYS VKHSKSATMPNFDEDDLNMWRYIFIDSVNKVKEDYSSNSVI DPNTSFSHLIYKDEQGGKIKPCRYPFTSKDGSINAFGLFFVSL FLEKQDSIWMQKKIPGFKKASENYMKMTNEVFCRNHILLP KIRLETVYDKDWMLLDMLNEVVRCPLSLYKRLTPAAQNKF KVPEKSSDNANRQEDDNPFSRILVRHQNRFPYFVLRFFDLN EVFTTLRFQINLGCYHFAICKKQIGDKKEVHHLIRTLYGFSR LQNFTQNTRPEEWNTLVKTTEPSSGNDGKTVQGVPLPYISY TIPHYQIENEKIGIKIFDGDТАVDTDIWPSVSTЕКQLNKPDKY TLTPGFKADVFLSVHELLPMMFYQQLLLCEGMLKTDAGNA VEKVLIDTRNAIFNLDAFVQEKINTITDLENYLQDKPILIGH LPKQMIDLLKGHRDMLKAVEQKKAMLIKDTERRRLKLLDK QLKQETDVAANKNTGTLLKNGQIADWL VNDMMRFQPVKRD KEGNPINCSCANSTEYQMLQRAFAFYATDSCRLSRYFTQLH LIHSDNSHLFLSRFEYDKQPNLIAFYAAYLKAKLEFLNELQP QNWASDNYFLLLRAPKNDRQKLAEGWKNGFNLPGLFTE KIKTWFNEHKTIVDISDCDIFKNRVGQVARLIPVFFDKKFKD HSQPFYRYDFNVGNVSKPTEANYLSKKGREELFKSYQNKF KNNIPAEKTKEYREYKNFSLWKKFERELRLIKNQDILIWLM CKNLFDEKIKPKKDILEPRIAVSYIKLDSLQTNTSTAGSLNAL AKVVPMTLAIHIDSPKPKGKAGNNEKENKEFTVYIKEEGTK LLKWGNFKTLLADRRIKGLFSYIEHDDIDLKQHPLTKRRVD LELDLYQTCRIDIFQQTLGLEAQLLDKYSDLNTDNFYQMLI GWRKKEGIPRNIKEDTDFLKDV RNAFSHNQYPDSKKIAFRR IRKFNPKELEEEEEGLGIATQMYKEVEKVVNRIKRIELFD
HMPREF9712_ 03108 [ミロイデ ス・オドラティ ミマス(Myroides odoratimimus) CCUG 10230]	11	MKDILTDTTEKQNRFYSHKIADKYFFGGYFNLASNNIYEV FEEVNKRNTFGKLAKRDNGNLKNYIIHVFKDELSISDFEKR VAIFASYFPILETVDKKS IKERNRTIDLTLSQRIRQFREMLISL VTAVDQLRNIFYTHYHHS DIVIENKVLDLNFSSFVSTALHVK DKYLKTDKTKEFLKETIAAELDILIEAYKKKQIEKKNTRFKA NKREDILNAIYNEAFWSFINDKDKDKDKETVVAKGADAYF EKNHHKSNDPDFALNISEKGIVYLLSFFLTNKEMDSLKANL TGFKGKVDRESGNSIKYMATQRIYSFHTYRGLKQKIRTSEE GVKETLLMQMIDELSKVPNVVYQHLSTTQQNSFIEDWNEY YKDYEDDVETDDLSRVIHPVIRKRYEDRFNYFAIRFLDEFFD FPTLRFQVHLGDYVHDRRTKQLGKVESDRIIKEKVTVFARL KDINSAKASYFHSLEEQDKEELDNKWTLFPNPSYDFPKEHT LQHQQEQKNAGKIGIYVKLRDTQYKEKAAL EEARKSLNPK ERSATKASKYDIITQIEANDNVKSEKPLVFTGQPIAYLSMN DIHSMFLSLLTDNAELKKTPEEVEAKLIDQIGKQINEILSKDT DTKILKKYKDNDLKETD TDKITRDLARDKEEIEKLILEQKQR ADDYNYTSSTKFNIDKSRKRKHLLFNAEK GKIGVWLANDIK RFMFKESKSKWKGYQHTELQKLFAYFDTSKSDLELILSNM VMVKDYPIELIDL VKKSRTLVD FLNKYLEARLEYIENVITRV

10

20

30

40

		KNSIGTPQFKTVRKECFTFLKKSNYTVVSLDKQVERILSMPL FIERGFMDDKPTMLEGKSYKQHKEKFADWFWVHYKENSNY QNFYDTEVYEITTEDKREKAKVTKKIKQQQKNDVFTLMMV NYMLEEVCLKSSNDRLSLNELYQTKEERIVNKQVAKDTQE RNKNYIWNKVVDLQLCDGLVHIDNVKLKDIGNFRKYENDS RVKEFLTYSQDIVWSAYLSNEVDSNKLIVIERQLDNYESIRS KELLKEVQEIECSVYNQVANKESELKQSGNENFKQYVLQGL LPIGMDVREMLILSTDVKFKKEEIIQLGQAGEVEQDLYSLIYI RNKFAHNQLPIKEFFDFCENNYRSISDNEYAAYEYMEIFRSI KEYAN
プレボテラ・イ ンターメディア (Prevotella intermedia)	12	MEDDKKTTDSIRYELKDKHFWAAFLNLARHNVYITVNHIN KILEEDEINRDGYENTLENSWNEIKDINKKDRLSKLIKHFPF LEATTYRQNPTDTTKQKEEKQAEASLESLSKKSFFVFIYKL RDLRNHYSHYKHSKSLERPKEEDLQNKMYNIFDVSIQFVK EDYKHNTDINPKKDFKHLDRKRKGKFHYSFADNEGNITESG LLFFVSLFLEKKDAIWVQKKLEGFKCSNKSQKMTNEVFC RSRMLLPKLRLESTQTQDWILLDMNLIRCPKSLYERLQG VNRKKFYVSFDPADEDYDAEQEPFKNTLVRHQDRFPYFAL RYFDYNEVFANLRFQIDLGTYHFSIYKKLIGGQKEDRHLTH KLYGFERIQEFDKQNRPDWKAIVKDSDTFKKKEEKEEKP YISETTPHYHLENKKIGIAFKNHNIWPSTQTELNNKRKKYN LGTSIKAFAFLSVHELLPMMFYLLKTENTKNDNKVGGK KETKKQGGKHKEAIESKIKDIYALYDAFANGEINSEDELKE YLKGGDIKIVHLPKQMIAILKNEHKDMAEKAQAEAKQEKMKL ATENRLKTLDKQLKGKIQNGKRYNSAPKSGEIASWLNDM MRFQPVQKDENGESLNNSKANSTEYQLLQRTLAFFGSEHER LAPYFKQTKLIESSNPHPLNDTEWEKCSNLSFYRSYLKAR KNFLESCLKPEDWEKNQYFLMLKEPKTNRETLVQGWKNGF NLPRGFFTEPIRKWFMEHWKSIKVDDLKRVGLVAKVTPLFF SEKYKDSVQPFYNYPFNVGDVNKPKEEDFLHREERIELWD KKKDKFKGYKAKKKFKEMTDKEKEEHRSYLEFQSWNKFE RELRLVRNQDIVTWLLCTELIDKLKIDELNIKELKKLRLKDI NTDTAKKEKNILNRVMPMELPVTYKVNKGGYIKNKPL HTIYIKEAETKLLKQGNFKALVKDRRLNGLFSFVKTPSEAES ESNPISKLRVEYELGKYQNARLDIIEDMLALEKKLIDKYNSL DTDNFHNMLTGWLELKGEAKKARFQNDVKLLTAVRNAFS HNQYPMYDENLFGNIERFSLSSSNIIESKGLDIAAKLKEEVS KAAKKIQNEEDNKKEKET
キャプノサイト ファーガ・カニ モルサス (Capnocytophaga canimorsus)	13	MKNIQRLGKGNEFSPPFKKEDKFYFGGFLNLANNNIEDFFKEI ITRFGIVITDENKKPKETFGEKILNEIFKKDISIVDYEKWVNIF ADYFPFTKYLSLYLEEMQFKNRVICFRDVMKELLKTVEALR NFYTHYDHEPIKIEDRVFYFLDKVLLDVSLTVKNKYLKTDK TKEFLNQHIGEELKELCKQRKDYLVGKGKRIDKESEIINGIY NNAFKDFICKREKQDDKENHNSVEKILCNKEPQNKKQKSS ATVWELCSKSSSKYTEKSFPNRENDKHCLEVPISQKGIVFLL SFFLNKGEIYALTSNIKGFKAKITKEEPVTYDKNSIRYMATH RMFSFLAYKGLKRKIRTSEINYNEDGQASSTYEKETLMLQM LDELNKVPDVVYQNLSEDVQKTFIEDWNEYLKENNGDVG MEEEEQVIHPVIRKRYEDKFNYFAIRFLDEFAQFPTLRFQVHL GNYLCDKRTKQICDTTTEREVKKKITVFGRLSELENKKAIFL NEREEIKGWEVFPNPSYDFPKENISVNYKDFPIVGSILDREK

10

20

30

40

40

40

ミロイデス・オ ドラティミマス (Myroides odoratimimus)	17	MKDILTTDTTEKQNRIFYSHKIADKYFFGGYFNLASNNIYEV FEEVNKRNTFGKLAQRDNGNLKNYIIHVFKDELSISDFEKR VAIFASYFPILETVDKKSIIKERNRTIDLTLSQLRQFREMLISL VTAVDQLRNFYTHYHHSDIVIENKVLDLFLNSSFVSTALHVK DKYLKTDKTKEFLKETIAAELDILIEAYKKKQIEKKNTRFKA NKREDILNAIYNEAFWSFINDKDKDKDKETVVAKGADAYF EKNHHKSNDPFDALNISEKGIVYLLSFFLTNKEMDSLKANL TGFKGKVDRESGNSIKYMATQRIYSFHTYRGLKQKIRTSEE GVKETLLMQMIDELSKVPNVVYQHLSTTQQNSFIEDWNEY YKDYEDDVETDDLSRVTHPVIRKRYEDRFNYFAIRFLDEFF DFPTLRFQVHLGDYVHDRRTKQLGKVESDRIIEKVTVFAR LKDINSAKASYFHSLEEQDKEELDNKWTLFPNPSYDFPKEH TLQHQQEQKNAGKIGIYVKLRDTQYKEKAAL EEARKSLNP KERSATKASKYDIITQIEANDNVKSEKPLVFTGQPIAYLSM NDIHSMLFSLT DNAELKKTPEEVEAKLIDQIGKQINEILSKD TDTKILKKYKDNDLKETDTDKITRDLARDKEEIEKLILEQKQ RADDYNYTSSTKFNIDKSRKRKHLNFNAEKGGKIGVWLANDI KRFMFKESKSKWKGYQHIELQKLFAYFDTSKSDLELILSNM VMVKDYPIELIDL VKKSRTLVDLFLNKYLEARLEYIENVITRV KNSIGTPQFKTVRKECFTFLKKSNTTVVSLDKQVERILSMPL FIERGFMDDKPTMLEGKSYKQHKEKFADWFWHYKENSNY QNFYDTEVYEITTEDKREKAKVTKKIKQQQKNDVFTLMMV NYMLEEVLKLSSNDRLSLNELYQTKEERIVNKQVAKDTQE RNKNYIWNKVVDLQLCDGLVHIDNVKLKDIGNFRKYENDS RVKEFLTYQSDIVWSAYLSNEVDNKLIVIERQLDNYESIRS KELLKEVQEIECSVYNQVANKEKSLKQSGNENFKQYVLQGL LPIGMDVREMLILSTDVKFKKEEIIQLGQAGEVEQDLYSLIYI RNKFAHNQLPIKEFFDFCENNYRSISDNEYA EYMEIFRSI KEYAN
フラボバクテリ ウム・コルムナ レ (Flavobacterium columnare)	18	MSSKNESYNKQKTFNHYKQEDKYFFGGFLNNADDNLRQV GKEFKTRINFNHNNNELASVFKDYFNKEKSVAKREHALNL LSNYFPVLERIQKHTNHNFEQTREIFELLDTIKKLRDYYTH HYHKPITINPKIYDFLDDTLVDLITIKKKVKNDTSRELLKE KLRPELTQLKNQKREELIKKGKKLLEENLENAVFNHCLIPFL EENKTDDKQNKTVSLRKYRKSKPNEETSITLTQSGLVFLMS FFLHRKEFQVFTSGLERFKAKVNTIKEEEISLNKNIVYMIT HWSYSYNNFKGLKHRIKTDQGVSTLEQNNTTHSLTNTNTK EALLTQIVDYLSKVPNEIYETLSEKQQKEFEEDINEYMREN ENEDSTFSSIVSHKVIRKRYENKFNYFAMRFLDEYAELPTLR FMVNF GDYIKDRQKKILES IQFDSERII KKEIHLFEKLSL VTE YKKNVYLKETSNIDLSRFPLFPNPSYVMANNIPFYIDSRSN NLDEYLNQKKKAQSQNKRNLT FEKYNKEQSKDAIIAMLQ KEIGVKDLQQRSTIGLLSCNELPSMLYEVIVKDIKGAELENK IAQKIREQYQSIRDFTLDS PQKDNIPTTLIKTINTDSSVTFENQ PIDIPRLKNALQKELTLTQEKLLNVKEHEIEVDNYNRNKNT YKFKNQPKNKVDDKKLQRKYVFYRNEIRQEANWLASDLIH FMKNKSLWKGYMHNELQSFLAFFEDKKNDICIALLETVFNL KEDCILTKGLKNLFLKHGNFIDFYKEYLKLKEDFLSTESTFL ENGFIGLPPKILKKELSKRLKYIFIVFQKRQFIKELEEKKNNL YADAINLSRGIFDEKPTMIPFKKPNPDEFASWVASYQYNN YQSFYELTPDIVERDKKKKYKNLRAIN KVKIQDY YLKL MV

10

20

30

40

		DTLYQDLFNQPLDKSLSDFYVSKAEREKIKADAKAYQKLN DSSLWNKVIHLSLQNNRITANPKLKDIGKYKRALQDEKIAT LLTYDARTWTYALQKPEKENENDYKELHYTALNMELQEY EKVRSKELLKQVQELEKKILDKFYDFSNNASHPEDLEIEDK KGKRHPNFKLYITKALLKNESEIINLENIDIEILLKYDYDYTE ELKEKIKNMEDEDEKAKIINTKENYNKITNVLIKKALVLIIRN KMAHNQYPPKFIYDLANRFVPKKEEEYFATYFNRVFETITK ELWENKEKKDKTQV
ポルフィロモナス・ジンジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	19	MTEQNEKPYNGTYTLEDKHFWA AFLNLARHNA YITLAHI DRQLAYSKADITNDEDILFFKGQWKNLDNDLERKARLSLI LKHFSFLEGAAYGKKLFESQSSGNKSSKKKELSKKEKEELQ ANALSLDNLKSILFDLQKLKDFRNYYSHYRHPESELPLFD GNMLQRLYNVFDVSVQVRKRDHEHNDKVDPHRHFNLVR KGKKDKYGNNDNPFFKH H FVDREGTVTEAGLLFFVSLFLE KRDAIWMQKKIRGFKGGTEAYQQMTNEVFCRSRISLPKLK LESLRTDDWMLLDMLNELVRCPKSLYDRLREEDRARFRVP VDILSDEDDTDGTEEDPFKNTLVRHQDRFPYFALRYFDLKK VFTSLRFHIDLGTYHFAIYKKNIGE QPEDRHLTRNLYGFGRI QDFAEEHRPEEWKRLVRDL DYFETGDKPYITQTTPHYHIEK GKIGLRFVPEGQHLWPSPEVGATRTGRSKYAQDKRLTAEAF LSVHELMPMMFYFLLREKYSEEVS AEKVQGRIKRVIEDVY AVYDAFARDEINTRDELDA CLADKGIRRGHLPRQMIALSQ EHKDMEEKVRKKLQEMIADTDHRLDMLDRQTDRKIRIGRK NAGLPKSGVVADWLVRDMMRFQPVAKDTSGKPLNNSKAN STEYRMLQRALALFGGEKERLTPYFRQMNL TGGNNPHPFL HETRWESHTNLSFYRSYLEARKAFLQSIGRSDRVENHRFLL LKEPKTDRQTLVAGWKGEFHLPRGIFTEAVRDCLIEMGYDE VGSYKEVGFMAKAVPLYFERASKDRVQPFYDYPFNVGNSL KPKKGRFLSKEKRAEEWESGKERFRLAKLKEILEAKEHPY HDFKSWQKFERELRLVKNQDIITWMMCRDLMEENKVEGL DTGTLYLKDIRTDVQEQGSLNVLNRVKPMRLPVVVYRADS RGHVHKEQAPLATVYIEERDTKLLKQGNFKSFVKDRRLNG LFSFVDTGALAMEQYPISKLRVEYELAKYQTARVCAFEQTL ELEESLLTRYPHLPDKNFRKMLESWSDPLLDKWPDLHGNV RLLIAVRNAF SHNQYPMYDETLFSSIRKYDPSSPDAIEERMG LNIAHRLSEEVKQAKEMVERIIQA
ポルフィロモナス属種 (<i>Porphyromonas</i> sp.) COT-052 OH4946	20	MTEQSERPYNGTYTLEDKHFWA AFLNLARHNA YITLTHI DRQLAYSKADITNDQDVLSFKALWKNFDNDLERKSRLSLI LKHFSFLEGAAYGKKLFESKSSGNKSSKNKELTKKEKEELQ ANALSLDNLKSILFDLQKLKDFRNYYSHYRHSESELPLFD GNMLQRLYNVFDVSVQVRKRDHEHNDKVDPHRHFNLVR KGKKDRYGHNDNPSFKHHFVDSEGMVTEAGLLFFVSLFLE KRDAIWMQKKIRGFKGGTETYQQMTNEVFCRSRISLPKLK ESLRTDDWMLLDMLNELVRCPKPLYDRLREDDRACFRVPV DILPDEDDTDGGGEDPFKNTLVRHQDRFPYFALRYFDLKKV FTSLRFHIDLGTYHFAIYKKMIGE QPEDRHLTRNLYGFGRIQ DFAEEHRPEEWKRLVRDL DYFETGDKPYISQTTPHYHIEKG KIGLRFVPEGQHLWPSPEVGTTTRTGRSKYAQDKRLTAEAF SVHELMPMMFYFLLREKYSEEVS AEKVQGRIKRVIEDVY AIYDAFARDEINTL KELDACLADKGIRRGHLPKQMIGILSQE RKDMEEKVRKKLQEMIADTDHRLDMLDRQTDRKIRIGRKN

10

20

30

40

		AGLPKSGVIADWLVRDMMRFQPVAKDTSGKPLNNSKANST EYRMLQRALALFGGEKERLTPYFRQMNL TGGNNPHPFLE TRWESHNTNLSFYRSYLRARKAFLERIGRSDRVENC PFLLLK EPKTDQRQTLVAGWKGEFHLPRGIFTEAVRDCLIEMGYDEV GSYREVGFMAKAVPLYFERACEDRVQPFYDSPFNVGNSLK PKKGRFLSKEDRAEEWERGKERFRDLEAWSHSAARRIKDA FAGIEYASPGNKKKIEQLLRDLSLWEAFESKLKVRADKINL AKLKKEILEAQEHYPYHDFKSWQKFERELRLVKNQDIITWM MCRDLMEENKVEGLDTGTLYLKDIRPNVQEQQSLNVLNRV KPMRLPVVVYRADSRGHVHKEEAPLATVYIEERDTKLLKQ GNFKSFVKDRRLNGLFSFVDTGGLAMEQYPISKLRVEYELA KYQTARVCVFELTLRLEESLLSRYPHLPDES FREMLESWSD PLLAKWPELHGKVRLLI AVRNAF SHNQYPMYDEAVFSSIRK YDPSSPDAIEERMGLNIAHRLSEEVKQAKETVERIIQA
プレボテラ・イ ンターメディア (Prevotella intermedia)	21	MEDDKKTKESTNMLDNKHFWA AFLNLARHNVYITVNHIN KVLELKNKKDQDIIDNDQDILAIKTHWEKVN GDLNKTERL RELMTKHFPFLETAIYTKNKEDKEEVKQEKQAKAQSFD SLK HCLFLFLEKLQEARNYYSHYKYSESTKEPMLEKELLKKMY NIFDDNIQLVIKDYQH NKDINPDEDFKHLDRTEEEFNYYFTT NKKGNITASGLLFFVSLFLEKKDAIWMQQKLRGFKDNRESK KKMTHEVFCRSRMLLPKLRLESTQTQDWILLDMLNELIRCP KSLYERLQGEYRK KFNVPFDSADEDYDAEQEPFKNTLVRH QDRFPYFALRYFDYNEIFTNLR FQIDLGTYHFSIYKKLIGGQ KEDRHLTHKLYGFERIQEFAKQNR TDEWKAIVKDFDTYETS EOPYISETAPHYHLENQKIGIRFRNDNDEIWPSLKTNGENNE KRKYKLDKQYQAE AFLSVHELLPMMFYLLLKKEEPNND KKNASIVEGFIKREIRDIYKLYDAFANGEINNIDDLEKYCED KGIPKRHLPKQMVAILYDEHKDMAEEAKRKQKEMVKDTK KLLATLEKQTQGEIEDGGRNIRLLKSGEIARWL VNDMMRF QPVQKDNEGNPLNNSKANST EYQMLQRSLALYNKEEKPTR YFRQVNLINSSNPHPF LKWTKWEECNNILSFYRSYLT KKIEF LNKLPEDWEKNQYFLKLKEPKTNRETLVQGWKNGFNLPR GIFTEPIREWFKRHQNDSEEYEK VETLDRVGLVTKVIPLFFK KEDSKDKEEYLLK KDAQKEINNCVQPFYGFYPNVGNIHKPD EKDFLPSEERKKLWGD KKYKFKGYKAKVKSKKLT DKEKE EYRSYLEFQSWNKFERELRLVRN QDIVTWLLCTELIDKLKV EGLNVEELKKLRLK DIDTDTAKQEKNNILNRVM PMQLPVT VYEIDDSHNIVKDRPLHTVYIEETKT KLLKQGNFKALVKDR RLNGLFSFVDTSS ETELKSNPISKSLVEYELGEYQNARIETIK DMLLLEETLIEKYKTLPTDNFSDMLNGWLEGKDEADKARF QNDVKLLVAVRNAF SHNQYPMRNRIAFANINPFSLSADTS EEKKLDIANQLKDKTHKIIKRIIEIEKPIETKE

40

【表 6】

表2				
オルソログ	番号	アクセサリータンパク質	5' PFS	3' PFS
バージイエラ・ズーヘルカム (<i>Bergeyella zoohelcum</i>)	1		A	NGA
バージイエラ・ズーヘルカム (<i>Bergeyella zoohelcum</i>)	1	csx27	A	NGA
プレボテラ・インターメディア (<i>Prevotella intermedia</i>)	2		A	NGA
プレボテラ・インターメディア (<i>Prevotella intermedia</i>)	2	csx28	A	NGA
プレボテラ・ブッカエ(<i>Prevotella buccae</i>)	3		A	NGA
プレボテラ・ブッカエ(<i>Prevotella buccae</i>)	3	csx28	A	NGA
バクテロイデス・ピオゲネス (<i>Bacteroides pyogenes</i>)	5		A	NGA
アリスティペス属種(<i>Alistipes</i> sp.) ZOR0009	6		TG	NA(G)
プレボテラ属種(<i>Prevotella</i> sp.) MA2016	7		AT	
リエメレラ・アナティペステイファ ー(<i>Riemerella anatipestifer</i>)	8		A	NGA
リエメレラ・アナティペステイファ ー(<i>Riemerella anatipestifer</i>)	8	csx28	A	NGA
プレボテラ・アウランティアカ (<i>Prevotella aurantiaca</i>)	9		G	NAA
プレボテラ・アウランティアカ (<i>Prevotella aurantiaca</i>)	9	csx28		
プレボテラ・サッカロリティカ (<i>Prevotella saccharolytica</i>)	10		AG	
プレボテラ・インターメディア (<i>Prevotella intermedia</i>)	12		AG	
キャプノサイトファーガ・カニモ ルサス(<i>Capnocytophaga</i> <i>canimorsus</i>)	13		A	NAA
キャプノサイトファーガ・カニモ ルサス(<i>Capnocytophaga</i> <i>canimorsus</i>)	13	csx27	A	NAA
ポルフィロモナス・グラエ (<i>Porphyromonas gulae</i>)	14		A	NAA

10

20

30

40

ポルフィロモナス・グラエ (<i>Porphyromonas gulae</i>)	14	csx28	A	NGA
プレボテラ属種(<i>Prevotella</i> sp.) P5-125	15		AT	
フラボバクテリウム・ブランキオ フィルム(<i>Flavobacterium</i> <i>branchiophilum</i>)	16		TG	
フラボバクテリウム・ブランキオ フィルム(<i>Flavobacterium</i> <i>branchiophilum</i>)	16	csx27	TA	
ミロイデス・オドラティミマス (<i>Myroides odoratimimus</i>)	17		T	NAA
ポルフィロモナス・ジンジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	19		A	NAA
ポルフィロモナス・ジンジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	19	csx28	A	
プレボテラ・インターメディア (<i>Prevotella intermedia</i>)	21		A	NGA
プレボテラ・インターメディア (<i>Prevotella intermedia</i>)	21	csx28	A	NGA

10

20

【0717】

実施例2：哺乳類細胞におけるCas13bの活性

HEK293T細胞に以下のプラスミドを標準的なリポフェクタミン2000プロトコルを用いてトランスフェクトした。

30

【0718】

(a) Cas13b (又は対照C2c2) 哺乳類発現プラスミド、遺伝子のC末端に1×核外移行配列タグを有する。

【0719】

(b) crRNA発現プラスミド、各々がガウシアルシフェラーゼに対するターゲティングcrRNA又はノンターゲティングcrRNAのいずれかを発現する。

【0720】

(c) ルシフェラーゼレポータープラスミド、2つの別個のプロモーターからガウシア及びウミホタルルシフェラーゼを発現する。

40

【0721】

ガウシアルシフェラーゼをノックダウンの標的とし、ウミホタルルシフェラーゼのレベルを用いてトランスフェクション効率の対照をとった。レプトトリキア・ウエイデイ (*Leptotrichia wadei*) C2c2をC2c2オルソログとの比較に使用した。

【0722】

それぞれのガイドに以下のスペーサー配列を使用した。

【表 7】

表 3	
Cas13b-ガイド 2	GGGCATTGGCTTCCATCTCTTTGAGCACCT
Cas13b-ガイド NT	GCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAA
実験#2 (14 vs. 15 vs. C2c2)	
Cas13b-ガイド 0	GAAGTCTTCGTTGTTCTCGGTGGGCTTGGC
Cas13b-ガイド 1	GGGCATTGGCTTCCATCTCTTTGAGCACCT
Cas13b-ガイド 2	GACAGGCAGATCAGACAGCCCCCTGGTGCAG
Cas13b-ガイド 3	GTAGGTGTGGCAGCGTCCTGGGATGAACTT
Cas13b-ガイド 4	GGAATGTCGACGATCGCCTCGCCTATGCCG
C2c2-ガイド 0	AGTCTTCGTTGTTCTCGGTGGGCTTGGC
C2c2-ガイド 1	GCATTGGCTTCCATCTCTTTGAGCACCT
C2c2-ガイド 2	CAGGCAGATCAGACAGCCCCCTGGTGCAG
C2c2-ガイド 3	AGGTGTGGCAGCGTCCTGGGATGAACTT
C2c2-ガイド 4	AATGTCGACGATCGCCTCGCCTATGCCG
Cas13b-ガイド NT	GCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAA
C2c2-ガイド NT	AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAA

【0723】

種々の Cas 13 b オルソログの結果を図 2 に提供する。オルソログは、活性が低い／なし、中程度、高い又はゴールドに分類される。「ゴールド」のオルソログは、試験したガイドの大多数でルシフェラーゼ活性の > 80 % のノックダウンをもたらした。「高い」オルソログは、試験したガイドの大多数でルシフェラーゼ活性の > 50 % のノックダウンをもたらした。「中程度」のオルソログは、試験したガイドの大多数でルシフェラーゼ活性の約 50 % のノックダウンをもたらした。「低い／なし」のオルソログは、試験した全てのガイドでルシフェラーゼ活性の < 80 % のノックダウンをもたらした。

【0724】

図 3 は、ガイド 2 (GGGCATTGGCTTCCATCTCTTTGAGCACCT) 及び対照としてのノンターゲットガイド (GCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAA) を使用した、試験したオルソログの幾つかの活性に関する正規化比較データを示す。Cas 13 b オルソログ 14、15、19 及び 20 番 (ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*)、プレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5-125、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) 及びポルフィロモナス属種 (*Porphyromonas* sp.) COT-052 OH4946 由来) が哺乳類細胞において特に活性であることが分かる。

【0725】

図 4 は、幾つかのルシフェラーゼターゲットガイド及びノンターゲット対照ガイドを使用した、2 つの最も有効なオルソログ 14 及び 15 を C2c2 / Cas 13 a と比較する正規化データを示す。Cas 13 b オルソログ 14 及び 15 番 (ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*) 及びプレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5-125 由来) が一貫して哺乳類細胞においてレプトトリキア・ウェイデイ (*Leptotrichia wadei*) C2c2 よりも高活性であることが分かる。

【0726】

実施例3

効率的で正確な核酸編集は、特にRNAレベルでの遺伝性疾患の治療に大いに有望であり、ここで、疾患関連転写物がレスキューされて機能性タンパク質産物が生じ得る。VI型CRISPR-Cas系は、プログラム可能なシングルフュエクターRNA誘導型RNAアーゼCas13を含有する。ここで、本発明者らは、ロバストなノックダウン能を有するCas13オルソログをエンジニアリングするためVI型系の多様性をプロファイリングし、哺乳類細胞において触媒不活性Cas13(dCas13)を使用してアデノシンデアミナーゼ活性を転写物に向けることによるRNA編集を実証する。ADAR2デアミナーゼドメインをdCas13と融合し、最適なRNA二重鎖基質が作り出されるようにガイドRNAをエンジニアリングすることにより、本発明者らは、特異的な単一のアデノシンからイノシン（これは、翻訳中、グアノシンとして読み取られる）への標的化した編集をルーチンでは20～40%の範囲及び最高89%の効率で実現する。プログラム可能なAからIへの置換のためのRNA編集(RNA Editing for Programmable A to I Replacement: REPAIR)と称されるこの系は、高い特異性を実現するように更にエンジニアリングすることができる。エンジニアリングされた変異体、REPAIRv2は、ロバストなオンターゲットのAからIへの編集を維持しつつ、170倍を超える特異性の増加を呈する。本発明者らは、REPAIRv2を使用して、既知の病原性突然変異を含む完全長転写物を編集し、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターにおけるパッケージングに好適な機能性のトランケート型を作り出す。REPAIRは、研究、治療及びバイオテクノロジーへの幅広い適用性を備えた有望なRNA編集プラットフォームを提供する。正確な核酸編集技術は、細胞機能の研究に及び新規治療法として価値がある。Cas9ヌクレアーゼなどの現在の編集ツールは、ゲノム遺伝子座のプログラム可能な改変を実現できるが、挿入又は欠失に起因して編集が不均一なことも多いか、又は正確な編集にドナー鋳型が必要である。dCas9-APOBEC融合物などの塩基編集体は、二本鎖切断を生成することなく編集が可能であるが、標的ウィンドウ内の任意のシチジンを編集するシチジンデアミナーゼ活性の性質に起因して、正確さに欠くものとなり得る。更に、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の要件により、可能な編集部位の数が制限される。ここで、本発明者らは、VI型の原核生物のクラスター化した規則的間隔の短いパリンδροームリピート(CRISPR)適応免疫系からのRNA誘導型RNAターゲティングCas13酵素を使用した正確で柔軟性のあるRNAベースの編集ツールの開発について記載する。

【0727】

正確な核酸編集技術は、細胞機能の研究にとって及び新規治療法として価値がある。現在の編集ツールは、原核生物のクラスター化した規則的間隔の短いパリンδροームリピート(CRISPR)関連ヌクレアーゼCas9(1～4)又はCpf1(5)などのプログラム可能なヌクレアーゼをベースとするものであり、標的化したDNA切断の媒介、次に非相同末端結合(NHEJ)を通じた標的化した遺伝子破壊又は鋳型依存的相同組換え修復(HDR)を介した正確な遺伝子編集のドライブに幅広く採用されている(6)。NHEJは、分裂細胞及び分裂終了細胞の両方で活性な宿主の機構を利用するものであり、タンパク質コード遺伝子のフレームシフトにつながり得る挿入又は欠失(インデル)突然変異混合物の生成によって効率的な遺伝子破壊を提供する。対照的に、HDRは、発現の大部分が複製細胞に限られている宿主の機構によって媒介される。このように、分裂終了細胞における遺伝子編集能力の開発は、依然として大きい課題である。最近では、触媒不活性Cas9(dCas9)を使用してシチジンデアミナーゼ活性を特定のゲノム標的に標的化させることにより標的ウィンドウ内でシトシンからチミンへの変換を生じさせるなど、DNAベースの編集体により、DNA二本鎖切断を生成することなく編集が可能であり、インデルの形成が有意に低下する(7、8)。しかしながら、DNAベースの編集体の標的範囲は、編集部位におけるプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)に関するCas9の要件に起因して制限される(9)。ここで、本発明者らは、VI型CRISPR関

10

20

30

40

50

連RNA誘導型RNAアーゼCas13を使用した正確で柔軟性のあるRNAベースの編集技術の開発について記載する(10~13)。

【0728】

Cas13酵素は、正確なRNA切断を媒介する2つの高等真核生物及び原核生物ヌクレオチド結合(HEPN)エンドRNAアーゼドメインを有する(10、11)。現在までに3つのCas13タンパク質ファミリーが同定されている：Cas13a(旧称C2c2)、Cas13b及びCas13c(12、13)。本発明者らは、最近になって、Cas13a酵素を核酸検出用(14)並びに哺乳類及び植物細胞RNAノックダウン及び転写物トラッキング用(15)のツールとして適合させ得ることを報告した。Cas13酵素は、そのRNA誘導型の性質により、RNA結合及び摂動適用に魅力的なツールとなる。

10

【0729】

RNAに作用するアデノシンデアミナーゼ(ADAR)酵素ファミリーは、翻訳及びスプライシングにおいて機能上はグアノシンと均等な核酸塩基であるイノシンへとアデノシンを加水分解的に脱アミノ化することによる転写物の内因性編集を媒介する(16)。2つの機能性のヒトADARオルソログ、ADAR1及びADAR2があり、これらは、N末端二本鎖RNA結合ドメイン及びC末端触媒脱アミノ化ドメインからなる。ADAR1及びADAR2の内因性標的部位は、実質的な二本鎖同一性を含み、触媒ドメインは、インビトロ及びインビボでの効率的な編集に二重鎖化した領域を必要とする(17、18)。ADARタンパク質は編集に好ましいモチーフを有し、それが潜在的なターゲティング柔軟性を制限し得るが、ADAR(E488Q)などの高活性突然変異体(19)は、配列制約を緩和し、アデノシンからイノシンへの編集率を向上させる。ADARは、RNA二重鎖においてシチジン塩基に対向するアデノシンを優先的に脱アミノ化し(20)、正確な塩基編集の有望な機会を提供する。これまでの手法ではRNAガイドによって標的のADAR融合物がエンジニアリングされているが(21~24)、これらの手法の特異性は報告されておらず、そのそれぞれのターゲティング機構は、標的認識及びストリンジェンシーを亢進させ得るタンパク質パートナーの補助なしにRNA-RNAハイブリダイゼーションに依存するものである。

20

【0730】

ここで、本発明者らは、哺乳類細胞におけるRNAノックダウン活性に関してCas13酵素ファミリー全体をアッセイし、プレボテラ属種(*Prevotella* sp.) P5-125(*PspCas13b*)からのCas13bオルソログを哺乳類細胞適用に最も効率的且つ特異的なものと同定する。次に、本発明者らは、ADAR2デアミナーゼドメイン(ADARDD)を触媒不活性*PspCas13b*に融合させて、レポーター及び内因性転写物並びに疾患関連突然変異のプログラム可能なAからI(G)への置換のためのRNA編集(REPAIR)を実証する。最後に、本発明者らは、合理的な突然変異誘発スキームを用いて*dCas13b-ADAR2DD*融合物の特異性を向上させることにより、特異性が170倍超増加したREPAIRv2を作成する。

30

【0731】

細菌構築物の設計及びクローニング

40

哺乳類コドン最適化Cas13b構築物を*Lac*プロモーターの制御下にクロラムフェニコール耐性*pACYC184*ベクターにクローニングした。次に、*BsaI*制限部位によって分けられた2つの対応するダイレクトリピート(DR)配列を*pJ23119*プロモーターの制御下にCas13bの下流に挿入した。最後に、T4 PNK(New England Biolabs)を使用してターゲティングスパーサー用のオリゴをリン酸化し、T7リガーゼ(*Enzymatics*)を使用して*BsaI*消化ベクターにアニール及びライゲートすることにより、ターゲティングCas13bベクターを生成した。

【0732】

細菌PFSスクリーニング

NEB Gibson Assembly(New England Biolabs

50

）を使用して、アンピシリン耐性遺伝子 *b1a* の開始コドンの直接下流にある標的部位によって分かれた2つの5'ランダム化ヌクレオチド及び4つの3'ランダム化ヌクレオチドと共に *Cas13b* 標的を含有するPCR産物を挿入することにより、PFSスクリーニング用のアンピシリン耐性プラスミドをクローニングした。次に、100 ngのアンピシリン耐性標的プラスミドを65～100 ngクロラムフェニコール耐性 *Cas13b* 細菌ターゲティングプラスミドと共に *Endura* エレクトロコンピテント細胞に電気穿孔した。プラスミドを細胞に加え、氷上で15分間インキュベートし、製造者のプロトコルを用いて電気穿孔し、次に細胞に950 μ Lの回復培地を加えた後、37℃で1時間アウトグロースさせた。このアウトグロースをクロラムフェニコール及びアンピシリン二重選択プレートにプレーティングした。アウトグロースの段階希釈物を使用して *cfu/ng*

10

DNAを推定した。プレーティングから16時間後、プレートから細胞を掻き取り、Qiagen Plasmid Plus Maxi Kit (Qiagen) を使用して生存プラスミドDNAを回収した。生存 *Cas13b* 標的配列及びその隣接領域をPCR増幅し、Illumina NextSeqを用いてシーケンシングした。PFS優先性を評価するため、カスタムのpythonスクリプトを使用して元のライブラリでランダム化ヌクレオチドを含有する位置を抽出し、両方のバイオレプリケートに存在するベクター単独条件と比べて枯渇している配列を抽出した。次に、ベクター単独対照と比較した *Cas13b* 条件におけるPFS存在量の比の $-\log_2$ を使用して好ましいモチーフを計算した。具体的には、特定の閾値を上回る $-\log_2$ (試料/ベクター) 枯渇比を有する全ての配列を使用して配列モチーフのweblogo (weblogo.berkeley.edu) を生成した。各 *Cas13b* オルソログのweblogoの生成に使用した特定の枯渇比値を表7に掲載する。

20

【0733】

RNA干渉用の哺乳類構築物の設計及びクローニング

哺乳類細胞で *Cas13* オルソログを試験するためのベクターを作成するため、哺乳類コドン最適化 *Cas13a*、*Cas13b* 及び *Cas13c* 遺伝子をPCR増幅し、EF1 α プロモーターの制御下において、デュアルNL5配列及びC末端msfGFPを含有する哺乳類発現ベクターにゴールデンゲートクローニングした。更に最適化するため、EF1 α プロモーターの制御下において、異なるC末端局在化タグを含有するデスティネーションベクターに *Cas13* オルソログをゴールデンゲートクローニングした。

30

【0734】

ガウシア及びウミホタルルシフェラーゼコードDNA、EF1 α 及びCMVプロモーターをPCR増幅し、NEB Gibson Assembly (New England Biolabs) を使用してアセンブルすることにより、デュアルルシフェラーゼレポーターをクローニングした。

【0735】

Cas13a、*Cas13b* 又は *Cas13c* オルソログ用の哺乳類ガイドRNAの発現のため、対応するダイレトリピート配列をゴールデンゲートアクセプター部位と共に合成し、制限消化クローニングによってU6発現下にクローニングした。次に、個々のガイドをゴールデンゲートクローニングによって各オルソログの対応する発現骨格にクローニングした。

40

【0736】

Cas13 干渉特異性のためのプールミスマッチライブラリのクローニング

プールミスマッチライブラリ標的部位をPCRによって作成した。PCR反応では、標的内の各位置に94%の正しい塩基と2%の各々正しくない塩基との混合物を含む半縮重標的配列をGールシフェラーゼに含むオリゴを1つのプライマーとして使用し、Gールシフェラーゼの非標的領域に対応するオリゴを第2のプライマーとして使用した。次に、NEB Gibson assembly (New England Biolabs) を使用して野生型Gールシフェラーゼの代わりにデュアルルシフェラーゼレポーターにミスマッチライブラリ標的をクローニングした。

50

【0737】

RNA編集用の哺乳類構築物の設計及びクローニング

HEPNドメインの触媒部位における2つのヒスチジンからアラニンへの突然変異（H133A/H1058A）により、PspCas13bを触媒不活性にした（dPspCas13b）。ヒトADAR1及びADAR2のデアミナーゼドメインを合成し、PCR増幅してpcDNA-CMVベクター骨格にギブソクローニングし、GS又はGSGGGGSリンカーを介してC末端でdPspCas13bに融合した。本発明者らが異なるリンカーを試験した実験について、本発明者らは、dPspCas13bとADAR2 d dとの間に以下の追加的なリンカーをクローニングした：GGGGSGGGGGSGGGGS、EAAAK、GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG及びSGSETPTGTSSESA TPES（XTEN）。適切な突然変異体をdPspCas13b-GSGGGGGSG骨格にギブソクローニングすることにより、特異性突然変異体を作成した。

10

【0738】

ノックダウン実験に使用したルシフェラーゼレポーターベクターにW85X突然変異（TGG>TAG）を作り出すことにより、RNA編集活性の測定用のルシフェラーゼレポーターベクターを作成した。このレポーターベクターは、正規化対照としての機能性Glucを発現するが、中途終止部位を付加したため、Gluc欠損である。ADAR編集モチーフ優先性を試験するため、本発明者らは、Glucのコドン85におけるアデノシンの周りの可能な全てのモチーフ（XAX）をクローニングした。

【0739】

REPAIRのPFS優先性を試験するため、本発明者らは、標的領域及びアデノシン編集部位の上流に6塩基対縮重PFS配列を含むプールプラスミドライブラリをクローニングした。このライブラリは、Integrated DNA Technologies（IDT）からのultramerとして合成し、プライマーのアニーリング及び配列のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片（New England Biolabs）フィリンによって二本鎖にした。次に、縮重配列を含むこのdsDNA断片を消化したレポーターベクターにギブソクローニングし、次にこれをイソプロパノール沈殿させて精製した。次に、クローニングしたライブラリをEnduraコンピテント大腸菌（E. coli）細胞（Lucigen）に電気穿孔し、245mm×245mm正方形バイオアッセイプレート（Nunc）にプレーティングした。16時間後、コロニーを回収し、エンドトキシン不含MACHEREY-NAGELミディプレップキットを使用してミディプレップした。クローニングしたライブラリは、次世代シーケンシングによって確認した。

20

30

【0740】

REPAIR活性の試験用の疾患関連突然変異をクローニングするため、ClinVarに定義されるとおりの疾患病因に関係する34個のG>A突然変異を選択し、これらの突然変異を囲む200bp領域をCMVプロモーター下でmScarlettとEGFPとの間にゴールドゲートクローニングした。AVPR2及びFANCCにおける2つの追加的なG>A突然変異をEF1α発現下での全遺伝子配列のギブソクローニングに選択した。

40

【0741】

REPAIR用の哺乳類ガイドRNAの発現のため、PspCas13bダイレクトリピート配列をゴールドゲートアクセプター部位と共に合成し、制限消化クローニングによってU6発現下にクローニングした。次に、ゴールドゲートクローニングによってこの発現骨格に個々のガイドをクローニングした。

【0742】

哺乳類細胞培養

HEK293FT細胞株（American Type Culture Collection（ATCC））で哺乳類細胞培養実験を実施し、この細胞株を、高グルコース、ピルビン酸ナトリウム及びGlutaMAX（Thermo Fisher Scie

50

nt i f i c) 含有の、1×ペニシリンーストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific) 及び10%ウシ胎仔血清 (VWR Sera d i g m) を更に補足したダルベッコ変法イーグル培地で成長させた。細胞は、80%未満のコンフルエンスに維持した。

【0743】

特に注記されない限り、トランスフェクションの全ては、ポリ-Dーリジン (BD Bio coat) がコートされた96ウェルプレートにおいてLipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) で実施した。トランスフェクション時点で90%のコンフルエンスが確実となるように、トランスフェクションの16時間前に細胞を約20,000細胞/ウェルでプレーティングした。プレートの各ウェルについて、トランスフェクションプラスミドを総量が25µlとなるようにOpti-MEM I 低血清培地 (Thermo Fisher) と合わせた。別途、24.5ulのOpti-MEMを0.5ulのLipofectamine 2000と合わせた。次に、プラスミド及びLipofectamine 溶液を合わせ、5分間インキュベートし、その後、細胞にピペティングした。

10

【0744】

RNAノックダウン哺乳類細胞アッセイ

レポーター構築物で哺乳類細胞におけるRNAターゲティングを評価するため、150ngのCas13構築物を300ngのガイド発現プラスミド及び12.5ngのノックダウンレポーター構築物と共にコトランスフェクトした。トランスフェクション後48時間で細胞から分泌シフェラーゼ含有培地を取り出し、PBS中に1:5希釈し、BioLuxウミホタル及びBioLuxガウシアルシフェラーゼアッセイキット (New England Biolabs) によってプレートリーダー (Biotek Synergy Neo2) において注入プロトコルで活性に関して測定した。実施したレプリケートの全ては、バイオロジカルレプリケートである。

20

【0745】

内因性遺伝子のターゲティングのため、150ngのCas13構築物を300ngのガイド発現プラスミドと共にコトランスフェクトした。トランスフェクション後48時間で細胞を溶解させ、RNAを回収し、Cells-to-CTキット (Thermo Fisher Scientific) の以前記載されている改変を用いて逆転写した。KRAS転写物に対するTaqMan qPCRプローブ (Thermo Fisher Scientific)、GAPDH対照プローブ (Thermo Fisher Scientific) 及びFast Advancedマスターミックス (Thermo Fisher Scientific) を使用してcDNA発現をqPCRで測定した。qPCR反応は、LightCycler 480 Instrument II (Roche) で読み取り、384ウェルフォーマットにおいて4つの5ulテクニカルレプリケートとした。

30

【0746】

ミスマッチ標的のプールライブラリを使用したRNA特異性の評価

6ウェルプレートに播いたHEK293FT細胞を使用して、Cas13がミスマッチ標的ライブラリに干渉する能力を試験した。2400ng Cas13ベクター、4800ngのガイド及び240ngのミスマッチ標的ライブラリを使用して、約70%コンフルエント細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション後48時間で細胞を回収し、QIAshredder (Qiagen) 及びQiagen RNeasy Mini キットを使用してRNAを抽出した。製造者の遺伝子特異的プライミングプロトコルに従いqScript Flex cDNA合成キット (Quantabio) 及びGluc 特異的RTプライマーを使用して、1ugの抽出したRNAを逆転写した。次に、cDNAを増幅し、Illumina NextSeqでシーケンシングした。

40

【0747】

1配列当たりのリードをカウントすることによりシーケンシングを分析し、log₂ (

50

ーリードカウント比) 値を決定することにより枯渇スコアを計算した。ここで、リードカウント比は、ターゲティングガイド条件対ノンターゲティングガイド条件におけるリードカウントの比である。このスコア値は、配列上での Cas 13 活性レベルを表し、値が高いほど枯渇が強い、従って Cas 13 切断活性が高いことを表す。シングルミスマッチ及びダブルミスマッチ配列について個別の分布を決定し、各ミスマッチアイデンティティについての枯渇スコアによるヒートマップとしてプロットした。ダブルミスマッチ配列について、所与の位置における可能な全てのダブルミスマッチの平均値をプロットした。

【0748】

RNAシーケンシングによる哺乳類細胞における Cas 13 のトランスクリプトームワイドプロファイリング

トランスクリプトームワイドな特異性を測定するため、150 ng の Cas 13 構築物、300 ng のガイド発現プラスミド及び15 ng のノックダウンレポーター構築物をコトランスフェクトした。shRNA 条件について、300 ng の shRNA ターゲティングプラスミド、15 ng のノックダウンレポーター構築物及び150 ng の EF1- α ドライブ mCherry (レポーター負荷の均衡をとるため) をコトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、RNeasy Plus Miniキット (Qiagen) で RNA を精製し、NEBNext ポリ (A) mRNA 磁気分離モジュール (New England Biolabs) を使用して mRNA を選択し、Illumina 用の NEBNext Ultra RNA ライブラリプレップキット (New England Biolabs) でシーケンシング用に調製した。次に、RNA シーケンシングライブラリを NextSeq (Illumina) でシーケンシングした。

【0749】

トランスクリプトームワイドなシーケンシングデータを分析するため、Bowtie 及び RSEM バージョン 1.2.31 をデフォルトパラメータで使用するリードを RefSeq GRCh38 アセンブリとアラインメントした。転写物発現を $\log_2$ (TPM+1) として定量化し、 $\log_2$ (TPM+1) > 2.5 で遺伝子をフィルタリングした。差次的に発現した遺伝子を選択するため、>2 又は <0.75 の差次的変化のある遺伝子のみを考慮した。差次的発現の統計的有意性は、3つのターゲティングレプリケート対ノンターゲティングレプリケートでのスチューデント t 検定で判定し、ベンジャミン・ホッホバーグ法 (Benjamini-Hochberg procedure) によって <0.01% の偽発見率でフィルタリングした。

【0750】

哺乳類細胞トランスフェクションにおける ADAR RNA 編集

哺乳類細胞における REPAIR 活性を評価するため、本発明者らは、150 ng の REPAIR ベクター、300 ng のガイド発現プラスミド及び40 ng の RNA 編集レポーターをトランスフェクトした。48時間後、細胞から RNA を回収し、遺伝子特異的逆転写プライマーで以前記載された方法を用いて逆転写した。次に、抽出した cDNA を NEBNext High-Fidelity 2X PCR マスターミックスを使用して2ラウンドの PCR に供することにより Illumina アダプター及び試料バーコードを付加した。次に、ライブラリを Illumina NextSeq 又は MiSeq で次世代シーケンシングに供した。次に、シーケンシングウィンドウ内にある全てのアデノシンで RNA 編集率を判定した。

【0751】

ルシフェラーゼレポーターを RNA 編集の標的とした実験では、本発明者らは、RNA 回収前に、分泌ルシフェラーゼを含む培地も回収した。この場合、補正後の Cluc は、低レベルである可能性があるため、本発明者らは、培地を希釈しなかった。本発明者らは、BioLux ウミホタル及び BioLux ガウシアルシフェラーゼアッセイキット (New England Biolabs) によってプレートリーダー (Biotek Synergy Neo2) において注入プロトコルでルシフェラーゼ活性を測定した。実施したレプリケートの全ては、バイオリジカルレプリケートである。

【0752】

PFS結合哺乳類スクリーニング

編集効率に対するPFSの寄与を決定するため、225cm²フラスコにプレーティングしたHEK293FT細胞に625ngのPFS標的ライブラリ、4.7ugのガイド及び2.35ugのREPAIRをコトランスフェクトした。プラスミドを33ulのPLUS試薬(Thermo Fisher Scientific)と混合し、Opti-MEMで533ulにし、5分間インキュベートし、30ulのLipofectamine 2000及び500ulのOpti-MEMと合わせ、更に5分間インキュベートし、次に細胞にピペティングした。トランスフェクション後48時間でRNeasy Plus Miniキット(Qiagen)によってRNAを回収し、qScript Flex(Quantabio)により遺伝子特異的プライマーを使用して逆転写し、NEBNext High-Fidelity 2X PCRマスターミックス(New England Biolabs)を使用した2ラウンドのPCRで増幅することによりIlluminaアダプター及び試料バーコードを付加した。ライブラリをIllumina NextSeqでシーケンシングし、標的アデノシンにおけるRNA編集率をPFSアイデンティティにマッピングした。カバレッジを増加させるため、PFSは、計算的に4ヌクレオチドに縮小した。各PFSについてREPAIR編集率を計算し、対応するPFSのノンターゲットティング率を差し引いてバイオロジカルレプリケートで平均した。

10

【0753】

全トランスクリプトームシーケンシングによるADAR編集特異性の評価

トランスクリプトームにわたるオフターゲットRNA編集部位を分析するため、本発明者らは、トランスフェクション後48時間にRNeasy Plusミニプレップキット(Qiagen)を使用して細胞から全RNAを回収した。次に、NEBNextポリ(A)mRNA磁気分離モジュール(NEB)を使用してmRNA画分を集積し、次にIllumina用のNEBNext Ultra RNAライブラリプレップキット(NEB)を使用してこのRNAをシーケンシング用に調製する。次に、ライブラリをIllumina NextSeqでシーケンシングし、1試料当たり少なくとも500万リードとなるようにロードした。

20

【0754】

標的化したトランスクリプトームワイドな実験についてのRNA編集分析

トランスクリプトームワイドなRNA編集RNAシーケンシングデータを分析するため、配列ファイルを500万リードにランダムにダウンサンプリングした。Gluc及びCluc配列を加えてRefSeq GRCh38アセンブリを使用してインデックスを生成し、Bowtie/RSEMバージョン1.3.0を使用してリードをアラインメントし、定量化した。次に、アラインメントBAMをソートし、REDITools[cite]を以下のパラメータで使用してRNA編集部位に関して分析した：-t 8 -e -d -l -U [AG or TC] -p -u -m 20 -T 6 -0 -W -v 1 -n 0.0。非トランスフェクト条件又はEGFPトランスフェクト条件に見られる任意の有意な編集は、SNP又はトランスフェクションのアーチファクトと見なし、オフターゲットの分析から除外した。オフターゲットは、フィッシャーの正確確率検定によって0.5未満のp値が得られ、且つ3つのバイオロジカルレプリケートの少なくとも2つで編集部位が同定された場合に有意と見なした。

30

40

【0755】

各オフターゲットの予測変異効果を分析するため、SIFT及びPolyPhen-2アノテーションを使用してUCSCゲノムブラウザツールスイートの一部としての変異体アノテーションインテグレーター(<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgVai>)を使用してオフターゲット編集部位のリストを分析した。オフターゲット遺伝子が発癌性であるかどうかを宣言するため、癌における体細胞突然変異のCOSMICカタログ(cancer.sanger.ac.uk)からの発癌アノテーションのデータベースである。

50

【0756】

REPAIR構築物がRNAレベルに摂動を与えたかどうかを分析するため、RSEM分析から出力された転写物百万分率(TPM)値を発現カウントに使用し、 $\log_2(TPM+1)$ をとることにより対数空間に変換した。差次的に調節された遺伝子を見つけ出すため、3つのターゲティングガイドレプリケート対3つのノンターゲティングガイドレプリケートに対してスチューデントt検定を実施した。統計的分析は、 $\log_2(TPM+1)$ 値が2.5より大きい遺伝子に関してのみ実施し、遺伝子は、その倍率変化が2より大きいか又は0.8より小さかった場合にのみ、差次的に調節されたと見なした。遺伝子は、その偽発見率が0.01未満の場合に報告した。

【0757】

哺乳類細胞におけるCas13ファミリーメンバーの包括的特徴付け

本発明者らは、以前、哺乳類ノックダウン適用のためのLwaCas13aを開発したが、それは、効率的なノックダウンにmsfGFP安定化ドメインが必要であったと共に、特異性は高かったものの、ノックダウン効率は、一貫して50%を下回った(15)。本発明者らは、遺伝的に多様なCas13ファミリーメンバーの組を特徴付けて哺乳類細胞におけるそのRNAノックダウン活性を評価することにより、よりロバストなRNAターゲティングCRISPR系を同定しようとした(図5A)。本発明者らは、N末端及びC末端核外移行シグナル(NES)配列並びにタンパク質安定性を高めるためC末端msfGFPと共に発現ベクターに21個のCas13a、15個のCas13b及び7個のCas13c哺乳類コドン最適化オルソログ(表4)をクローニングした。哺乳類細胞における干渉をアッセイするため、本発明者らは、別個のプロモーターの下に直交性ガウシア(Gluc)及びウミホタル(Cluc)ルシフェラーゼを発現する、それにより一方のルシフェラーゼがCas13干渉活性の尺度として機能し、他方が内部対照としての役割を果たすことが可能なデュアルレポーター構築物を設計した。各オルソログについて、本発明者らは、アンピシリン干渉アッセイから導き出されたCas13b PFSモチーフ(図11;表5)及び以前のCas13a活性の報告からの3'H PFSを使用してPFS適合性ガイドRNAを設計した(10)。

【0758】

本発明者らは、HEK293FT細胞にCas13発現、ガイドRNA及びレポータープラスミドをトランスフェクトし、48時間後に標的Glucレベルを定量化した。各Cas13オルソログについて2つのガイドRNAを試験することにより、最近特徴付けられたLwaCas13aと比べて両方のガイドRNAで干渉が同程度であるか又はより高い5つのCas13bオルソログを含め、ある範囲の活性レベルが明らかになった(図5B)。本発明者らは、これらの5つのCas13bオルソログ並びに上位2つのCas13aオルソログを更なるエンジニアリングに選択した。

【0759】

本発明者らは、次に、ロバストな活性に安定化ドメインが必要でないオルソログを選択するため、msfGFPがない場合のCas13媒介性Glucノックダウンを試験した。本発明者らは、LwaCas13aの最適化に関して既報告のとおり、Cas13活性がmsfGFPに加えて細胞内局在性の影響を受ける可能性があるかと仮定した(15)。従って、本発明者らは、msfGFPなしに6つの異なる局在化タグの1つをC末端に融合した7つの選択のCas13オルソログの干渉活性を試験した。本発明者らは、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、HIV Rev遺伝子NESをC末端に融合したPspCas13b及びPguCas13b並びにMAPK NESをC末端に融合したRanCas13bの干渉活性レベルが最も高かったことを見出した(図12A)。上位オルソログの活性レベルを更に区別するため、本発明者らは、位置対応ガイドを使用してKRA S転写物をノックダウンするその能力に関して、これらの3つの最適化Cas13b構築物を最適LwaCas13a-msfGFP融合物及びshRNAと比較した(図12B)。本発明者らは、PspCas13bについて最も高い干渉レベルを観察し(平均ノックダウン62.9%)、従ってこれをLwaCas13aとの更なる比較に選択し

10

20

30

40

50

た。

【0760】

P s p C a s 1 3 b 及び L w a C a s 1 3 a の活性レベルを更に厳密に定義付けるため、本発明者らは、G l u c 及び C l u c の両方に沿ってタイリングする位置対応ガイドを設計し、本発明者らのルシフェラーゼレポーターアッセイを用いてその活性をアッセイした。本発明者らは、G l u c 及び C l u c を標的とするそれぞれ93個及び20個の位置対応ガイドを試験し、P s p C a s 1 3 b のノックダウンレベルが L w a C a s 1 3 a と比べて一貫して増加したことを見出した (P s p C a s 1 3 b について平均92.3%、対して L w a C a s 1 3 a について40.1%のノックダウン) (図5C、図5D)。

【0761】

C a s 1 3 哺乳類干渉活性の特異性

P s p C a s 1 3 b 及び L w a C a s 1 3 a の干渉特異性を特徴付けるため、本発明者らは、標的配列及び3つの隣接5'及び3'塩基対にわたってシングルミスマッチ及びダブルミスマッチを含むルシフェラーゼ標的のプラスミドライブラリを設計した (図12C)。本発明者らは、HEK293FT細胞に、L w a C a s 1 3 a 又は P s p C a s 1 3 b のいずれか、非改変標的配列を標的とする固定的ガイドRNA及び適切な系に対応するミスマッチ標的ライブラリをトランスフェクトした。本発明者らは、次に、非切断転写物の標的化したRNAシーケンシングを実施して、ミスマッチ標的配列の枯渇を定量化した。本発明者らは、L w a C a s 1 3 a 及び P s p C a s 1 3 b が、P s p C a s 1 3 b 標的について塩基対12~26及び L w a C a s 1 3 a 標的について13~24に延在するシングルミスマッチ寛容性が比較的低い中心領域を有したことを見出した (図12D)。ダブルミスマッチは、シングル突然変異と比べて寛容性が更に低く、そのそれぞれの標的における P s p C a s 1 3 b について塩基対12~29及び L w a C a s 1 3 a について8~27に延在するより大きいウィンドウにかけてノックダウン活性は、ほとんど観察されなかった (図12E)。加えて、標的配列の5'末端及び3'末端に隣接する3ヌクレオチドにもミスマッチが含まれるため、本発明者らは、C a s 1 3 ノックダウン活性に対するPFS制約を評価することができた。シーケンシングが示したところによれば、ほぼ全てのPFSの組み合わせがロバストなノックダウンを実現したことから、試験したいずれの酵素についても、哺乳類細胞における干渉に関するPFS制約は存在しない可能性があることが指摘される。これらの結果から、C a s 1 3 a 及び C a s 1 3 b が同様の配列制約及びミスマッチに対する感度を呈することが指摘される。

【0762】

本発明者らは、次に、トランスクリプトームのmRNA画分にわたる P s p C a s 1 3 b 及び L w a C a s 1 3 a の干渉特異性を特徴付けた。本発明者らは、トランスクリプトームワイドmRNAシーケンシングを実施して、有意な差次的発現遺伝子を検出した。L w a C a s 1 3 a 及び P s p C a s 1 3 b は G l u c のロバストなノックダウンを実証し (図5E、図5F)、数百個のオフターゲットを示した位置対応shRNAと比較して高度に特異的であった (図5G)。

【0763】

C a s 1 3 - A D A R 融合物は標的RNA編集を可能にする

P s p C a s 1 3 b が哺乳類細胞において一貫したロバストで特異的なmRNAノックダウンを実現したことを踏まえて、本発明者らは、プログラム可能なRNA編集のためADARのデアミナーゼドメイン (A D A R_D) をリクルートするRNA結合プラットフォームとしてこれを適合させることができると想定した。ヌクレアーゼ活性が欠損した P s p C a s 1 3 b (d P s p C a s 1 3 b、以下d C a s 1 3 bと称する) をエンジニアリングするため、本発明者らは、HEPNドメインにおける保存された触媒残基を突然変異させて、ルシフェラーゼRNAノックダウン活性の喪失を観察した (図13A)。本発明者らは、ガイドRNAによってd C a s 1 3 b - A D A R_D 融合物を標的アデノシンにリクルートでき、ハイブリダイズしたRNAがADAR活性に必要な二重鎖基質を作り出すと仮定した (図6A)。標的アデノシン脱アミノ化率を亢進させるため、本発明者ら

は、本発明者らの当初のRNA編集設計に2つの追加的な改変を導入した。本発明者らは、標的アデノシンの反対側に、脱アミノ化頻度を増加させることが以前報告されているミスマッチシチジンを導入し、且つdCas13bを、高活性突然変異を含むヒトADAR1又はADAR2のデアミナーゼドメインと融合させて触媒活性を亢進させた(ADAR1_{DD}(E1008Q)(25)又はADAR2_{DD}(E488Q)(19))。

【0764】

dCas13b-ADAR_{DD}の活性を試験するため、本発明者らは、ナンセンス突然変異(W85X(UGG→UAG))を導入することによりCluc上にRNA編集レポーターを作成し、これは、A→I編集を通じて機能的に野生型コドンに修復され(図6B)、次にCluc発光の回復として検出することができるものであった。本発明者らは、標的アデノシンにわたってスパーサー30、50、70又は84ヌクレオチド長のガイドを均等にタイリングして、最適なガイド配置及び設計を決定した(図6C)。本発明者らは、dCas13b-ADAR1_{DD}がClucレポーターの修復に長いガイドを必要とした一方、dCas13b-ADAR2_{DD}が、試験した全てのガイド長さで機能性であったことを見出した(図6C)。本発明者らは、野生型ADAR2_{DD}によるルシフェラーゼ回復が低下したとおり、高活性E488Q突然変異が編集効率を改善したことも見出した(図13B)。このような活性の実証から、本発明者らは、更なる特徴付けにdCas13b-ADAR2_{DD}(E488Q)を選択し、この手法を、プログラム可能なAからIへの置換のためのRNA編集バージョン1(RNA Editing for Programmable A to I Replacement version 1: REPAIRv1)と命名した。

【0765】

ルシフェラーゼ活性の回復が本当に編集イベントに起因したことを確認するため、本発明者らは、逆転写及び標的化した次世代シーケンシングによって直接REPAIRv1に供したCluc転写物の編集を測定した。本発明者らは、標的部位を囲む30nt及び50ntスパーサーを試験し、両方のガイド長さとも期待されたAからIへの編集をもたらし、50ntスパーサーの方が高い編集パーセンテージを実現したことを見出した(図6D、図6E、図13C)。本発明者らは、50ntスパーサーには、恐らく二重鎖RNA領域の増加に起因した非標的アデノシンにおける編集傾向の増加があったことも観察した(図6E、図13C)。

【0766】

本発明者らは、次に、内因性遺伝子PPIBを標的とした。本発明者らは、PPIBをタイリングする50ntスパーサーを設計し、本発明者らが最高28%の編集効率でPPIB転写物を編集できたことを見出した(図13D)。REPAIRを更に最適化することができるかどうかを試験するため、本発明者らは、dCas13bとADAR2_{DD}(E488Q)との間のリンカーを改変し(図13E、表6)、リンカー選択がルシフェラーゼ活性回復にやや影響を及ぼしたことを見出した。

【0767】

RNA編集用の配列パラメータの定義付け

本発明者らが試験部位で正確なRNA編集を実現できたことを踏まえ、本発明者らは、トランスクリプトームにおける任意のRNA標的に対する系をプログラムする際の配列制約を特徴付けようとした。配列制約は、PFSなど、dCas13bターゲティング制限によるか、又はADAR配列優先性によって生じ得た(26)。REPAIRv1に関するPFS制約を調べるため、本発明者らは、Cluc転写物上の標的部位の5'末端に一連の4つのランダム化ヌクレオチドを担持するプラスミドライブラリを設計した(図7A)。本発明者らは、UAG又はAACのいずれかのモチーフ内にある中央のアデノシンを標的とし、両方のモチーフについて、全てのPFSが検出可能なレベルのRNA編集を実証し、大部分のPFSが標的部位において50%より高い編集であったことを見出した(図7B)。次に、本発明者らは、REPAIRv1中のADAR2_{DD}が、以前ADAR2_{DD}について報告されているとおり、標的塩基に直接隣接するいずれかの配列制約を有

するかどうかを決定しようとした（26）。本発明者らは、標的アデノシンを直接囲む5'及び3'隣接ヌクレオチドの可能なあらゆる組み合わせを試験し（図7C）、REPAIRv1があらゆるモチーフを編集する能力を有したことを見出した（図7D）。最後に、本発明者らは、スパーサー配列における標的Aに対向する塩基のアイデンティティが編集効率に影響を及ぼしたかどうかを分析し、A-Cミスマッチが最も高いルシフェラーゼ回復を呈し、A-G、A-U及びA-AではREPAIRv1活性が大幅に低下したことを見出した（図13F）。

【0768】

REPAIRv1を使用した疾患関連ヒト突然変異の修正

哺乳類細胞におけるRNA編集へのREPAIRv1系の幅広い適用性を実証するため、本発明者らは、2つの疾患関連突然変異：X連鎖性腎性尿崩症における878G>A（AVPR2 W293X）及びファンコニー貧血における1517G>A（FANCC W506X）に対するREPAIRv1ガイドを設計した。本発明者らは、これらの突然変異を有する遺伝子のcDNA用の発現構築物をHEK293FT細胞にトランスフェクトし、REPAIRv1がこれらの突然変異を修正することができたかどうかを試験した。50ntスパーサーを含むガイドRNAを使用して、本発明者らは、35%のAVPR2の修正及び23%のFANCCの修正を実現することが可能であった（図8A～図8D）。次に、本発明者らは、REPAIRv1が34個の異なる疾患関連G>A突然変異を修正する能力を試験し（表7）、本発明者らが33部位において最高28%の編集効率で有意な編集を実現可能であったことを見出した（図8E）。本発明者らが選択した突然変異は、ClinVarデータベース中にある病原性のGからAへの突然変異のあくまでも一部に過ぎず（5, 739個）、このデータベースには、更なる11, 943個のGからAへの変異体も含まれる（図8F及び図14）。配列制約がないため、特に本発明者らが標的モチーフに関わらず有意な編集を観察したことを踏まえると、REPAIRv1は、これらの疾患関連突然変異の全てを編集する能力を潜在的に有する（図7C及び図8G）。

【0769】

REPAIRv1系を罹患細胞に送達することは、治療用途に必須であり、従って、本発明者らは、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターなどの治療的に関連性のあるウイルスベクターにパッケージング可能なREPAIRv1構築物を設計しようとした。AAVベクターは、4.7kbのパッケージング限界を有し、これは、dCas13b-ADAR_{DD}（4473bp）の大きいサイズをプロモーター及び発現調節エレメントと共に収容することができないものである。サイズを低減するため、本発明者らは、ADAR_{2D}（E488Q）に融合したdCas13の種々のN末端及びC末端トランケーションについてRNA編集活性を試験した。本発明者らは、試験した全てのC末端トランケーションがなおも機能性で、ルシフェラーゼシグナルを回復させることが可能であった（図15）と共に、最も大きいトランケーション、C末端Δ984～1090（融合タンパク質の総サイズ4,152bp）がAAVベクターのパッケージング限界の範囲内に収まるのに十分な小ささであったことを見出した。

【0770】

REPAIRv1のトランスクリプトームワイド特異性

PspCas13bによるRNAノックダウンは、高度に特異的であったが、本発明者らのルシフェラーゼタイリング実験では、本発明者らは、ガイド：標的二重鎖内にオフターゲットアデノシン編集を観察した（図6E）。これが広範囲に及ぶ現象であったかどうかを確かめるため、本発明者らは、内因性転写物KRASをタイリングし、標的アデノシンの近傍におけるオフターゲット編集の程度を測定した（図9A）。本発明者らは、KRASについて、オンターゲット編集率は23%であったが、標的部位の周りに同様に検出可能なAからGへの編集を有した部位が多くあったことを見出した（図9B）。

【0771】

ガイド：標的二重鎖内にオフターゲット編集が観察されたため、本発明者らは、全ての

mRNAに関してRNAシーケンシングを実施することにより、可能な全てのトランスクリプトームオフターゲットを評価した。RNAシーケンシングにより、AからGへのオフターゲットイベントが多数あり、ターゲティング条件で1,732個のオフターゲット及びノンターゲティング条件で925個のオフターゲットがあり、828個のオフターゲットが重複していることが明らかになった(図9C、図9D)。トランスクリプトームにわたる全ての編集部位のうち、オンターゲット編集部位が最も高い編集率を有し、89%のAからGへの変換であった。

【0772】

Cas13ターゲティングの高い特異性を踏まえて、本発明者らは、オフターゲットがADARから生じ得ることが妥当と考えた。2つのRNA誘導型ADAR系が以前記載されている(図16A)。第1のものは、ADAR2_{DD}と、BoxB-λ RNAヘアピンに結合する低分子ウイルスタンパク質ラムダN(λN)との融合物を利用する(22)。二重BoxB-λヘアピンを有するガイドRNAが、ガイドRNAにコードされた編集部位にADAR2_{DD}を誘導する(23)。第2の設計は完全長ADAR2(ADAR2)と、ADAR2の二本鎖RNA結合ドメイン(dsRBD)が認識するヘアピンを有するガイドRNAとを利用する(21、24)。本発明者らは、REPAIRv1と比較したこれらの2つの系の編集効率を分析し、REPAIRv1によって達成された89%の編集率と比較して、BoxB-ADAR2及びADAR2系がそれぞれ63%及び36%の編集率を実証したことを見出した(図16B~図16E)。加えて、BoxB及びADAR2系は、REPAIRv1ターゲティングガイド条件での1,229個のオフターゲットと比較して、ターゲティングガイド条件でそれぞれ2018個及び174個の観察されたオフターゲットを作り出した。特に、ADAR2系は大部分が異なるオフターゲットの組を有した一方、2つのADAR2_{DD}ベースの系(REPAIRv1及びBoxB)を含む条件の全ては、そのオフターゲットに高い割合の重複を示した(図16F)。ターゲティング条件とノンターゲティング条件との間及びREPAIRv1条件とBoxB条件との間のオフターゲットの重複は、ADAR2_{DD}がdCas13ターゲティングと無関係にオフターゲットをドライブしたことを示唆している(図16F)。

【0773】

合理的プロテインエンジニアリングによるREPAIRv1の特異性の改善

REPAIRの特異性を改善するため、本発明者らは、ADAR2_{DD}(E488Q)の構造誘導型プロテインエンジニアリングを用いた。オフターゲットのガイド非依存的性質のため、本発明者らは、ADAR2_{DD}(E488Q)-RNA結合を不安定化させればオフターゲット編集を選択的に低下させ得るが、標的部位へのADAR2_{DD}(E488Q)のdCas13b係留からの局所濃度の増加に起因してオンターゲット編集が維持され得ると仮定した。本発明者らは、ADAR2_{DD}(E488Q)バックグラウンドで標的RNAの二重鎖領域に接触することが以前決定されたADAR2_{DD}(E488Q)残基を突然変異誘発した(図10A)(18)。効率及び特異性を評価するため、本発明者らは、ノンターゲティング条件でバックグラウンドルシフェラーゼ回復が検出されれば、より広いオフターゲット活性の指標となり得るという想定の下、ターゲティングガイド及びノンターゲティングガイドの両方で17個の単一突然変異体を試験した。本発明者らは、ターゲティング及びノンターゲティングガイドについて、選択の残基における突然変異がルシフェラーゼ活性に有意な効果を及ぼしたことを見出した(図10A、図10B、図17A)。大部分の突然変異体は、ターゲティングガイドについてルシフェラーゼ活性を有意に改善したか、又はターゲティング対ノンターゲティングガイド活性比(本発明者らはこれを特異性スコアと称した)を増加させたかのいずれかであった(図10A、図10B)。本発明者らは、次世代シーケンシングによるトランスクリプトームワイドな特異性のプロファイリングにこれらの突然変異体のサブセットを選択した(図10B)。予想どおり、トランスクリプトームワイドなシーケンシングから測定されたオフターゲットは、突然変異体についての本発明者らの特異性スコアと相関した(図17B)。本発明者らは、ADAR2_{DD}(E488Q/R455E)を例外として、シーケンシングした全て

10

20

30

40

50

のREPAIRv1突然変異体がレポーター転写物を有効に編集することができ（図10C）、多くの突然変異体がオフターゲット数の減少を示した（図17C及び図18）ことを見出した。本発明者らは、特異性突然変異体のオフターゲットの周囲モチーフを更に調べ、REPAIRv1及びほとんどのエンジニアリングした突然変異体が、特徴付けられたADAR2モチーフと一致して、その編集について強力な3'G優先性を呈したことを見出した（図19A）（26）。本発明者らは、更なる実験に、それが4つの突然変異体のうち、最も高いパーセント編集率を有しつつトランスクリプトームワイドなオフターゲットの数が最も少なかったことに伴い突然変異体ADAR2_{DD}（E488Q/T375G）を選択し、これをREPAIRv2と名付けた。REPAIRv1と比較して、REPAIRv2は、特異性の増加を呈し、トランスクリプトームオフターゲットが1732個から10個に減少した（図10D）。Clucにおける標的アデノシンを囲む領域において、REPAIRv2ではオフターゲット編集が減少し、これは、シーケンシングトレースに見ることができた（図10E）。次世代シーケンシングから導き出されたモチーフにおいて、REPAIRv1は3'Gに強力な優先性を呈したが、全てのモチーフについてオフターゲット編集を示した（図19B）。対照的に、REPAIRv2は、最も強力なオフターゲットモチーフを編集したのみであった（図19C）。転写物上の編集分布は、重度に偏っていて、高度に編集された遺伝子は、60個を超える編集を有する（図20A、図20B）一方、REPAIRv2は、1個の転写物（EEF1A1）のみを複数回編集した（図20D～図20F）。REPAIRv1オフターゲット編集は、1000個のミスセンス突然変異（図20C）と93個の発癌イベント（図20D）を含め、多数の変異体をもたらすと予測された。対照的に、REPAIRv2は、6個のミスセンス突然変異を有したのみで（図20E）、その中に発癌転帰を有するものはなかった（図20F）。予測オフターゲット効果のこの減少は、REPAIRv2を他のRNA編集手法と区別するものである。

【0774】

本発明者らは、REPAIRv2を内因性遺伝子に標的化させて、特異性を亢進する突然変異が高効率オンターゲット編集を維持しつつ標的転写物における近隣編集を低減するかどうかを試験した。KRAS又はPPIBのいずれかを標的とするガイドについて、本発明者らは、REPAIRv2が、REPAIRv1と異なり、検出可能なオフターゲット編集を有さず、オンターゲットアデノシンをそれぞれ27.1%及び13%で有効に編集できたことを見出した（図10F、図10G）。この特異性は、他のKRAS又はPPIB標的部位など、REPAIRv1についてノンターゲット条件で高レベルのバックグラウンドを示す領域を含め、追加的な標的部位にまで及んだ（図21）。全体的に見て、REPAIRv2は、編集されたアデノシンを囲む二重鎖領域でのオフターゲットを消失させ、トランスクリプトームワイドな特異性の劇的な亢進を示した。

【0775】

結論

本発明者らは、ここで、RNA誘導型RNAターゲティングVIB型エフェクターCas13bが極めて効率的且つ特異的なRNAノックダウン能力を有することを明らかにし、必須遺伝子及び非コードRNAの調査並びに細胞過程のトランスクリプトームレベルでの制御のための改良されたツールの基礎を提供した。触媒不活性Cas13b（dCas13b）は、プログラム可能なRNA結合能力を保持し、本発明者らは、ここで、dCas13bをアデノシンデアミナーゼADAR2に融合することによりこれを利用して、本発明者らがREPAIRv1（プログラム可能なAからIへの置換のためのRNA編集バージョン1）と称する系である正確なAからIへの編集を実現した。この系の更なるエンジニアリングにより、特異性が劇的に改善された、現在の編集プラットフォームと比べて同等の又は増加した活性を有する方法であるREPAIRv2が生み出された。

【0776】

Cas13bは、高忠実度を呈するが、dCas13b-ADAR2_{DD}融合物による本発明者らの初期の結果から、数千個のオフターゲットが明らかになった。これに対処す

るため、本発明者らは、合理的突然変異誘発戦略を用いてRNA二重鎖と接触するADAR2_{DD}残基を変異させることにより、dCas13bと融合したとき、正確で、効率的で、且つ高度に特異的な編集能力を有する変異体ADAR2_{DD} (E488Q/T375G)を同定した。この変異体による編集効率は、現在利用可能な2つの系、BoxB-ADAR_{DD}又はADAR2編集で実現したものと同等であるか又はそれより良好であった。更に、REPAIRv2系は、全トランスクリプトームにおいて観察可能なオフターゲットを10個のみ作り出し、両方の代替的編集技術と比べて少なくとも良好といえる程度であった。

【0777】

REPAIR系は、他の核酸編集ツールと比較して多くの利点を提供する。第一に、所望のアデノシンにわたってガイド伸長部内にシチジンを置いてADAR編集活性に理想的な有利なA-Cミスマッチを作り出すことにより、ガイドに正確な標的部位をコードすることができる。第二に、Cas13は、PFS又はPAMなどのターゲティング配列制約を有さず、標的アデノシンの周りのモチーフ優先性がないため、トランスクリプトーム内の任意のアデノシンを潜在的にREPAIR系による標的とすることが可能である。しかしながら、本発明者らは、DNAベースの編集体がセンス鎖又はアンチセンス鎖のいずれも標的とすることができる一方、REPAIR系は、転写された配列に限られ、そのため標的とすることのできる可能な編集部位の総数が制約を受けることを実注記しておく。しかしながら、REPAIRによるターゲティングのより柔軟性の高い性質に起因して、この系は、ClinVar内にCas9-DNAベースの編集体よりも多くの編集を生じさせることができる(図8C)。第三に、REPAIR系は、標的アデノシンをイノシンに直接脱アミノ化し、塩基除去修復又はミスマッチ修復などの内因性修復経路に依存することなく所望の編集結果を生じさせる。従って、REPAIRは、他の形態の編集をサポートできない非分裂細胞で可能なはずである。第四に、RNA編集は、一過性であり得、編集結果を一時的に制御する可能性を許容する。この特性は、局所炎症など、細胞状態の一時的な変化によって引き起こされる疾患の治療に有用であると見込まれ得る。

【0778】

REPAIR系は、更なるエンジニアリング機会を複数提供する。Cas13bは、pre-crRNAプロセシング活性を有し(13)、そのため、単独では疾患リスクを変化させない可能性があるが、一緒になると相加効果及び疾患修飾の可能性を有し得る複数の変異体の多重編集が可能である。有望な突然変異を組み合わせるなど、本発明者らの合理設計手法を拡張すれば、この系の特異性及び効率を更に増加させることができる一方、偏りのないスクリーニング手法によってREPAIR活性及び特異性を改善するための追加的な残基を同定できる可能性がある。

【0779】

現在、REPAIRによって実現可能な塩基変換は、アデノシンからのイノシンの生成に限られている。dCas13をAPOBECなどの他の触媒RNA編集ドメインと更に融合すれば、シチジンからウリジンへの編集を実現できる可能性がある。加えて、ADARを突然変異誘発すれば、シチジンを標的とするように基質優先性が緩和され、二重鎖化したRNA基質要件によって付与される亢進した特異性がC→U編集体によって利用可能となる可能性がある。DNA基質上におけるアデノシンからイノシンへの編集は、DNA-RNAヘテロ二重鎖標的の形成(27)又はADARドメインの突然変異誘発のいずれかを通じて、dCas9又はdCpf1など、触媒不活性DNAターゲティングCRISPRエフェクターでも可能であり得る。

【0780】

REPAIRは、AからIへの(AからGへの)編集が疾患の進行を逆転又は減速させ得る様々な適応疾患に適用できる可能性がある(図22)。第一に、疾患関連組織における原因となるメンデルのGからAへの突然変異を標的とするためのREPAIRの発現を用いれば、有害な突然変異を復帰させ、疾患を治療できる可能性がある。例えば、脳組織におけるAAVによる安定なREPAIR発現を用いれば、焦点性癲癇を引き起こすGR

I N 2 A ミスセンス突然変異 c. 2191 G>A (A s p 7 3 1 A s n) (28) 又は早期発症型アルツハイマー病を引き起こす A P P ミスセンス突然変異 c. 2149 G>A (V a l 7 1 7 I l e) (29) を修正できる可能性がある。第二に、R E P A I R を用いれば、疾患関連シグナル伝達に關与するタンパク質の機能を改変することにより疾患を治療できる可能性がある。例えば、R E P A I R 編集によれば、キナーゼの標的である一部のセリン、スレオニン及びチロシン残基の再コーディングが可能となり得る (図 22)。疾患関連タンパク質におけるこれらの残基のリン酸化は、アルツハイマー病及び多発神経変性病態を含め、多くの障害についての疾患の進行に影響を及ぼす (30)。第三に、R E P A I R を用いれば、発現したリスク修飾性の G から A への変異体の配列を変化させることにより、患者が疾患状態に入る可能性を先制して低下させることができる可能性がある。最も興味深いケースは、「防御性」リスク修飾アレルであり、これは、疾患状態に入る可能性を劇的に低下させ、場合により更なる健康上の利益を付与する。例えば、R E P A I R を用いれば、それぞれ心血管疾患及び乾癬性関節炎を防御する P C S K 9 及び I F I H 1 の A から G へのアレルを機能的に模倣できる可能性がある (31)。最後に、R E P A I R を用いて、エクソン調節療法のためスプライスアクセプター及びドナー部位を治療的に改変することができる。R E P A I R は、それぞれコンセンサス 5' スプライスドナー又は 3' スプライスアクセプター部位と機能的に均等なものである、A U を I U に又は A A を A I に変化させて、新規スプライスジャンクションを作り出すことができる。加えて、R E P A I R 編集は、コンセンサス 3' スプライスアクセプター部位を A G → I G に突然変異させて、隣接下流エクソンのスキッピングを促進することができ、これは、D M D の治療に多大な関心を集めている治療戦略である。スプライス部位の調節には、脊髄性筋萎縮症の治療に向けた S M N 2 スプライシングの調節のためなど、アンチセンスオリゴが何らかの成功を収めている疾患において幅広い適用性があり得る (32)。

【0781】

本発明者らは、R N A ノックダウン及び R N A 編集の両方のツールとしての P s p C a s 1 3 b 酵素の使用を実証した。プログラム可能な R N A 結合のための d C a s 1 3 b プラットフォームには、ライブ転写物イメージング、スプライシング改変、標的化した転写物局在化、R N A 結合タンパク質のプルダウン及びエピトランスクリプトーム改変を含め、多くの適用性がある。ここで、本発明者らは、d C a s 1 3 を用いて、既存の核酸編集技術スイートに加わる R E P A I R を作り出した。R E P A I R は、遺伝性疾患の治療又は防御アレルの模倣の新規手法を提供し、R N A 編集を遺伝子機能の改変に有用なツールとして確立する。

【表 8】

表 4 本研究に使用した Cas13 オルソログ

Cas13 ID	Cas13 略称	宿主生物	タンパク質受託番号
Cas13a1	LshCas13a	レプトトリキア・シャーイイ (<i>Leptotrichia shahii</i>)	WP_018451595.1
Cas13a2	LwaCas13a	レプトトリキア・ウェイデイ (<i>Leptotrichia wadei</i>) (Lw2)	WP_021746774.1
Cas13a3	LseCas13a	リステリア・ゼーリゲリ(<i>Listeria seeligeri</i>)	WP_012985477.1
Cas13a4	LbmCas13a	ラクノスピラ科細菌 (<i>Lachnospiraceae bacterium</i>) MA2020	WP_044921188.1
Cas13a5	LbnCas13a	ラクノスピラ科細菌 (<i>Lachnospiraceae bacterium</i>) NK4A179	WP_022785443.1
Cas13a6	CamCas13a	[クロストリジウム(<i>Clostridium</i>)] アミノフィルム(<i>aminophilum</i>) DSM 10710	WP_031473346.1
Cas13a7	CgaCas13a	カルノバクテリウム・ガリナルム (<i>Carnobacterium gallinarum</i>) DSM 4847	WP_034560163.1
Cas13a8	Cga2Cas13a	カルノバクテリウム・ガリナルム (<i>Carnobacterium gallinarum</i>) DSM 4847	WP_034563842.1
Cas13a9	Pprcas13a	パルディバクター・プロピオニシ ゲネス(<i>Paludibacter propionigenes</i>) WB4	WP_013443710.1
Cas13a10	LweCas13a	リステリア・ウェイヘンステファ ネンシス(<i>Listeria weihenstephanensis</i>) FSL R9- 0317	WP_036059185.1
Cas13a11	LbfCas13a	リステリア科細菌(<i>Listeriaceae bacterium</i>) FSL M6-0635	WP_036091002.1
Cas13a12	Lwa2cas13a	レプトトリキア・ウェイデイ (<i>Leptotrichia wadei</i>) F0279	WP_021746774.1
Cas13a13	RcsCas13a	ロドバクター・カプスラータス (<i>Rhodobacter capsulatus</i>) SB 1003	WP_013067728.1
Cas13a14	RcrCas13a	ロドバクター・カプスラータス (<i>Rhodobacter capsulatus</i>) R121	WP_023911507.1
Cas13a15	RcdCas13a	ロドバクター・カプスラータス (<i>Rhodobacter capsulatus</i>) DE442	WP_023911507.1
Cas13a16	LbuCas13a	レプトトリキア・ブッカリス (<i>Leptotrichia buccalis</i>) C-1013-b	WP_015770004.1

10

20

30

40

Cas13a17	HheCas13a	ハービニクス・ヘミセルロシリティカ(Herbinix hemicellulosilytica)	CRZ35554.1
Cas13a18	EreCas13a	[ユーバクテリウム(Eubacterium)]レクタレ(rectale)	WP_055061018.1
Cas13a19	EbaCas13a	ユーバクテリウム科細菌(Eubacteriaceae bacterium) CHKCI004	WP_090127496.1
Cas13a20	BmaCas13a	ブラウティア属種(Blautia sp.) Marseille-P2398	WP_062808098.1
Cas13a21	LspCas13a	レプトトリキア属種(Leptotrichia sp.)口腔細菌分類群 879 株 F0557	WP_021744063.1
Cas13b1	BzoCas13b	バージイエラ・ズーヘルカム(Bergeyella zoohelcum)	WP_002664492
Cas13b2	PinCas13b	プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia)	WP_036860899
Cas13b3	PbuCas13b	プレボテラ・ブッカエ(Prevotella buccae)	WP_004343973
Cas13b4	AspCas13b	アリストティペス属種(Alistipes sp.) ZOR0009	WP_047447901
Cas13b5	PsmCas13b	プレボテラ属種(Prevotella sp.) MA2016	WP_036929175
Cas13b6	RanCas13b	リエメレラ・アナティペステイファー(Riemerella anatipestifer)	WP_004919755
Cas13b7	PauCas13b	プレボテラ・アウランティアカ(Prevotella aurantiaca)	WP_025000926
Cas13b8	PsaCas13b	プレボテラ・サッカロリティカ(Prevotella saccharolytica)	WP_051522484
Cas13b9	Pin2Cas13b	プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia)	WP_061868553
Cas13b10	CcaCas13b	キャプノサイトファーガ・カニモルサス(Capnocytophaga canimorsus)	WP_013997271
Cas13b11	PguCas13b	ポルフィロモナス・グラエ(Porphyromonas gulae)	WP_039434803
Cas13b12	PspCas13b	プレボテラ属種(Prevotella sp.) P5-125	WP_044065294
Cas13b13	FbrCas13b	フラボバクテリウム・ブランキオフィルム(Flavobacterium branchiophilum)	WP_014084666
Cas13b14	PgiCas13b	ポルフィロモナス・ジンジバリス(Porphyromonas gingivalis)	WP_053444417
Cas13b15	Pin3Cas13b	プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia)	WP_050955369

10

20

30

40

Cas13c1	FnsCas13c	フソバクテリウム・ネクロホラム 亜種ファンデュリフォルメ (<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. funduliforme) ATCC 51357 contig00003	WP_005959231.1
Cas13c2	FndCas13c	フソバクテリウム・ネクロホラム (<i>Fusobacterium necrophorum</i>) DJ-2 contig0065, 全ゲノムショ ットガン配列	WP_035906563.1
Cas13c3	FnbCas13c	フソバクテリウム・ネクロホラム (<i>Fusobacterium necrophorum</i>) BFTR-1 contig0068	WP_035935671.1
Cas13c4	FnfCas13c	フソバクテリウム・ネクロホラム 亜種ファンデュリフォルメ (<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. funduliforme) 1_1_36S cont1.14	EHO19081.1
Cas13c5	FpeCas13c	フソバクテリウム・パーフォエテ ンス(<i>Fusobacterium perfoetens</i>) ATCC 29250 T364DRAFT_scaffold00009.9_C	WP_027128616.1
Cas13c6	FulCas13c	フソバクテリウム・ウルセランス (<i>Fusobacterium ulcerans</i>) ATCC 49185 cont2.38	WP_040490876.1
Cas13c7	AspCas13c	アナエロサリバクター属種 (<i>Anaerosalibacter</i> sp.) ND1 ゲノ ムアセンブリ アナエロサリバク ター・マシリエンシス (<i>Anaerosalibacter massiliensis</i>) ND1	WP_042678931.1

10

20

30

【表 9】

表 5 細菌スクリーニングにおける PFS カットオフ

Cas13b オルソログ	番号	PFS モチーフの作成に使用した-Log ₂ 枯渇スコア
バージイエラ・ズーヘルカム (<i>Bergeyella zoohelcum</i>)	1	2
プレボテラ・インターメディア (<i>Prevotella intermedia</i>) 遺伝子座 1	2	1
プレボテラ・ブッカエ (<i>Prevotella buccae</i>)	3	3
アリスティペス属種(<i>Alistipes</i> sp.) ZOR0009	4	1
プレボテラ属種(<i>Prevotella</i> sp.) MA2016	5	2
リエメレラ・アナティペステイファー (<i>Riemerella anatipestifer</i>)	6	4
プレボテラ・アウランティアカ (<i>Prevotella aurantiaca</i>)	7	1
プレボテラ・サッカロリティカ (<i>Prevotella saccharolytica</i>)	8	0
プレボテラ・インターメディア (<i>Prevotella intermedia</i>) 遺伝子座 2	9	0
キャプノサイトファーガ・カニモルサス (<i>Capnocytophaga canimorsus</i>)	10	3
ポルフィロモナス・グラエ (<i>Porphyromonas gulae</i>)	11	4
プレボテラ属種(<i>Prevotella</i> sp.) P5-125	12	2.1
フラボバクテリウム・ブランキオフィルム (<i>Flavobacterium branchiophilum</i>)	13	1
ポルフィロモナス・ジンジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	14	3
プレボテラ・インターメディア (<i>Prevotella intermedia</i>) 遺伝子座 2	15	4

10

20

30

40

【表 10】

表 6 哺乳類細胞における RNA 編集用の本研究に使用した
dCas13b-ADAR リンカー配列

図	リンカー
6C	GSGGGGS
6E	GS
13B	GSGGGGS
13C	GS
13D	GS
13E: GS	GS
13E: GSGGGGS	GSGGGGS
13E: (GGGS)3	GGGSGGGSGGGGS
13E: リジッド	EAAAK
13E: (GGS)6	GGSGGSGGSGGSGGSGGS
13E: XTEN	SGSETPGTSESATPES
7B	GS
13F	GS
7C	GS
8B	GS
8D	GS
8E	GS
7A: Δ 984-1090, Δ 1026-1090, Δ 1053-1090	GS
7A: Δ 1-125, Δ 1-88, Δ 1-72	GSGGGGS
9B	GS
9C	GS
9D	GS
16A	GS
16C	GS
16D	GS
17D	GS
10A	GS
18A	GS
10B	GS
18B	GS
18C	GS
19A	GS
19B	GS
10C	GS
10D	GS
10E	GS
10F	GS
22A	GS
22A	GS

10

20

30

40

【表 1 1】

表 7 疾患関連突然変異についての疾患情報

完全長候補	遺伝子	疾患
NM_000054.4(AVPR2):c.878G>A (p.Trp293Ter)	AVPR2	腎性尿崩症、X 連鎖性
NM_000136.2(FANCC):c.1517G>A (p.Trp506Ter)	FANCC	ファンコニー貧血、相補群 C
追加的なシミュレートした候補		
候補	遺伝子	疾患
NM_000206.2(IL2RG):c.710G>A (p.Trp237Ter)	IL2RG	X 連鎖性重症複合免疫不全症
NM_000132.3(F8):c.3144G>A (p.Trp1048Ter)	F8	遺伝性第 VIII 因子欠乏症
NM_000527.4(LDLR):c.1449G>A (p.Trp483Ter)	LDLR	家族性高コレステロール血症
NM_000071.2(CBS):c.162G>A (p.Trp54Ter)	CBS	CBS 欠乏に起因するホモシスチン尿症
NM_000518.4(HBB):c.114G>A (p.Trp38Ter)	HBB	β^0 サラセミア β サラセミア
NM_000035.3(ALDOB):c.888G>A (p.Trp296Ter)	ALDOB	遺伝性果糖尿症
NM_004006.2(DMD):c.3747G>A (p.Trp1249Ter)	DMD	デュシェンヌ型筋ジストロフィー
NM_005359.5(SMAD4):c.906G>A (p.Trp302Ter)	SMAD4	若年性ポリポーシス症候群
NM_000059.3(BRCA2):c.582G>A (p.Trp194Ter)	BRCA2	家族性乳癌 乳癌・卵巣癌、家族性 2 型
NM_000833.4(GRIN2A):c.3813G>A (p.Trp1271Ter)	GRIN2A	癲癇、焦点性、発話障害を伴う及び 精神遅滞を伴う又は伴わない
NM_002977.3(SCN9A):c.2691G>A (p.Trp897Ter)	SCN9A	無痛覚、先天性、常染色体劣性
NM_007375.3(TARDBP):c.943G>A (p.Ala315Thr)	TARDBP	筋萎縮性側索硬化症 10 型
NM_000492.3(CFTR):c.3846G>A (p.Trp1282Ter)	CFTR	嚢胞性線維症 遺伝性膵炎 提供なし アタルレン反応 - 有効性
NM_130838.1(UBE3A):c.2304G>A (p.Trp768Ter)	UBE3A	アンジェルマン症候群
NM_000543.4(SMPD1):c.168G>A (p.Trp56Ter)	SMPD1	ニーマン・ピック病、A 型
NM_206933.2(USH2A):c.9390G>A (p.Trp3130Ter)	USH2A	アッシャー症候群、2A 型
NM_130799.2(MEN1):c.1269G>A (p.Trp423Ter)	MEN1	遺伝性癌素因症候群
NM_177965.3(C8orf37):c.555G>A (p.Trp185Ter)	C8orf37	網膜色素変性症 64
NM_000249.3(MLH1):c.1998G>A (p.Trp666Ter)	MLH1	リンチ症候群

10

20

30

40

NM_000548.4(TSC2):c.2108G>A (p.Trp703Ter)	TSC2	結節性硬化症 2 結節性硬化症候群
NM_000267.3(NF1):c.7044G>A (p.Trp2348Ter)	NF1	神経線維腫症、1 型
NM_000179.2(MSH6):c.3020G>A (p.Trp1007Ter)	MSH6	リンチ症候群
NM_000344.3(SMN1):c.305G>A (p.Trp102Ter)	SMN1	脊髄性筋萎縮症、II 型 クーゲルバー グ・ウェランダー病
NM_024577.3(SH3TC2):c.920G>A (p.Trp307Ter)	SH3TC2	シャルコー・マリー・トゥース病、 4C 型
NM_001369.2(DNAH5):c.8465G>A (p.Trp2822Ter)	DNAH5	原発性線毛機能不全症
NM_004992.3(MECP2):c.311G>A (p.Trp104Ter)	MECP2	レット症候群
NM_032119.3(ADGRV1):c.7406G>A (p.Trp2469Ter)	ADGRV1	アッシャー症候群、2C 型
NM_017651.4(AHI1):c.2174G>A (p.Trp725Ter)	AHI1	ジュベール症候群 3
NM_004562.2(PRKN):c.1358G>A (p.Trp453Ter)	PRKN	パーキンソン病 2
NM_000090.3(COL3A1):c.3833G>A (p.Trp1278Ter)	COL3A1	エーラース・ダンロス症候群、4 型
NM_007294.3(BRCA1):c.5511G>A (p.Trp1837Ter)	BRCA1	家族性乳癌 乳癌・卵巣癌、家族性 1
NM_000256.3(MYBPC3):c.3293G>A (p.Trp1098Ter)	MYBPC3	原発性家族性肥大型心筋症
NM_000038.5(APC):c.1262G>A (p.Trp421Ter)	APC	家族性大腸腺腫症 1
NM_001204.6(BMP2):c.893G>A (p.W298*)	BMP2	原発性肺高血圧症

10

20

30

【表 1 2】

表 8: 本研究に使用した主要なプラスミド

プラスミド名	説明
pAB0006	CMV-C ルシフェラーゼ-ポリ A EF1a-G-ルシフェラーゼ-ポリ A
pAB0040	CMV-C ルシフェラーゼ(STOP85)-ポリ A EF1a-G-ルシフェラーゼ-ポリ A
pAB0048	pCDNA-ADAR2-N 末端 B12-HIV NES
pAB0050	pAB0001-A02 (crRNA 骨格)
pAB0051	pAB0001-B06 (crRNA 骨格)
pAB0052	pAB0001-B11 (crRNA 骨格)
pAB0053	pAB0001-B12 (crRNA 骨格)
pAB0014.B6	EF1a-BsiWI-Cas13b6-NES-mapk
pAB0013.B11	EF1a-BsiWI-Cas13b11-NES-HIV
pAB0013.B12	EF1a-BsiWI-Cas13b12-NES-HIV
pAB0051	pAB0001-B06 (crRNA 骨格)
pAB0052	pAB0001-B11 (crRNA 骨格)
pAB0053	pAB0001-B12 (crRNA 骨格)
pAB0079	pCDNA-ADAR1hu-EQ 突然変異-N 末端デスチネーションベクター
pAB0085	pCDNA-ADAR2 (E488Q)hu-EQ 突然変異-N 末端デスチネーションベクター
pAB0095	EF1a-BsiWI-Cas13-B12-NES-HIV、二重 H HEPN 突然変異を伴う
pAB0114	pCDNA-wtADAR2hu-EQ 突然変異-N 末端デスチネーションベクター
pAB0120	ルシフェラーゼ ADAR ガイド最適(wC0054 からのガイド 24)
pAB0122	ADAR 実験用の pAB0001-B12 NT ガイド
pAB0151	pCDNA-ADAR2hu-EQ 突然変異-N 末端デスチネーションベクター C 末端 Δ984-1090
pAB0180	T375G 特異性突然変異
pAB0181	T375G Cas13b C 末端 Δ984-1090

10

20

30

40

【表 1 3】

表 9: 哺乳類細胞におけるノックダウン用の本研究に使用したガイド/shRNA 配列

名称	スペーサー配列	干渉機構	注記	初出の図
細菌 PFS ガイド	GCCAGCUUUCGGGCA UUGGCUUCCAUC	Cas13b	全てのオルソログに使用	
Cas13a-Gluc ガイド 1	GCCAGCTTTCCGGGCA TTGGCTTCCATC	Cas13a	全ての Cas13a オルソ ログに使用	図 5B
Cas13a-Gluc ガイド 2	ACCCAGGAATCTCAGG AATGTCGACGAT	Cas13a	全ての Cas13a オルソ ログに使用	図 5B
Cas13a-ノンタ ーゲティング ガイド (LacZ)	AGGGTTTTCCCAGTCA CGACGTTGTAAA	Cas13a	全ての Cas13a オルソ ログに使用	図 5B
Cas13b-Gluc ガイド 1.1	GGGCATTGGCTTCCAT CTCTTTGAGCACCT	Cas13b	オルソログ 1~3、6、 7、10、11、12、 14、15 に使用	図 5B
Cas13b-Gluc ガイド 1.2	GUGCAGCCAGCUUUC GGGCAUUGGCUUCC	Cas13b	オルソログ 4 に使用	図 5B
Cas13b-Gluc ガイド 1.3	GCAGCCAGCUUUCGG GCAUUGGCUUCCAUC	Cas13b	オルソログ 5 に使用	図 5B
Cas13b-Gluc ガイド 1.4	GGCUUCCAUCUCUUUG AGCACCUCAGCGG	Cas13b	オルソログ 8、9 に使 用	図 5B
Cas13b-Gluc ガイド 1.5	GGAAUGUCGACGAUCG CCUCGCCUAUGCCG	Cas13b	オルソログ 13 に使用	図 5B
Cas13b-Gluc ガイド 2.1	GAAUGUCGACGAUCGC CUCGCCUAUGCCGC	Cas13b	オルソログ 1~3、6、 7、10、11、14、15 に使用	図 5B
Cas13b-Gluc ガイド 2.2	GACCUUGUGCGAUGAAC UGCUCCAUGGGCUC	Cas13b	オルソログ 12 に使用	図 5B
Cas13b-Gluc ガイド 2.2	GUGUGGCAGCGUCCUG GGAUGAACUUCUUC	Cas13b	オルソログ 4 に使用	図 5B
Cas13b-Gluc ガイド 2.3	GUGGCAGCGUCCUGGG AUGAACUUCUUCAU	Cas13b	オルソログ 5 に使用	図 5B
Cas13b-Gluc ガイド 2.4	GCUUCUUGCCGGGCAA CUUCCCGCGGUCAG	Cas13b	オルソログ 8、9 に使 用	図 5B
Cas13b-Gluc ガイド 2.6	GCAGGGUUUUCGAGU CACGACGUUGUAAAA	Cas13b	オルソログ 13 に使用	図 5B
Cas13b-ノンタ ーゲティング ガイド	GCAGGGUUUUCGAGU CACGACGUUGUAAAA	Cas13b	全てのオルソログに使用	図 5B
Cas13a-Gluc ガイド- RNASeq	ACCCAGGAAUCUCAGG AAUGUCGACGAU	Cas13a		図 5E

10

20

30

40

shRNA-Gluc ガイド	CAGCTTTCCGGGCATT GGCTT	shRNA		☒ 5F
Cas13b-Gluc ガイド- RNASeq	CCGCUGGAGGUGCUCA AAGAGAUGGAAGCC	Cas13b		☒ 5F
Cas13a-Gluc- ガイド-1	GCCAGCTTTCCGGGCA TTGGCTTCCATC	Cas13a		☒ 12A
Cas13a-Gluc- ガイド-2	ACCCAGGAATCTCAGG AATGTCGACGAT	Cas13a		☒ 12A
Cas13b-Gluc- opt-ガイド-1	GGGCATTGGCTTCCAT CTCTTTGAGCACCT	Cas13b		☒ 12A
Cas13b-Gluc- opt-ガイド-2	GAAUGUCGACGAUCGC CUCGCCUAUGCCGC	Cas13b		☒ 12A
Cas13a KRAS ガイド 1	CAAGGCACTCTTGCCCT ACGCCACCAGCT	Cas13a		☒ 12B
Cas13a KRAS ガイド 2	TCATATTCGTCCACAA AATGATTCTGAA	Cas13a		☒ 12B
Cas13a KRAS ガイド 3	ATTATTTATGGCAAAT ACACAAAGAAAG	Cas13a		☒ 12B
Cas13a KRAS ガイド 4	GAATATCTTCAAATGA TTAGTATTATT	Cas13a		☒ 12B
Cas13a KRAS ガイド 5	ACCATAGGTACATCTT CAGAGTCCTTAA	Cas13a		☒ 12B
Cas13b KRAS ガイド 1	GTCAAGGCACTCTTGC CTACGCCACCAGCT	Cas13b		☒ 12B
Cas13b KRAS ガイド 2	GATCATATTCGTCCAC AAAATGATTCTGAA	Cas13b		☒ 12B
Cas13b KRAS ガイド 3	GTATTATTTATGGCAA ATACACAAAGAAAG	Cas13b		☒ 12B
Cas13b KRAS ガイド 4	GTGAATATCTTCAAAT GATTTAGTATTATT	Cas13b		☒ 12B
Cas13b KRAS ガイド 5	GGACCATAGGTACATC TTCAGAGTCCTTAA	Cas13b		☒ 12B
shRNA KRAS ガイド 1	aagagtgccttgacgatacageCT CGAGgctgtatcgtaaggcactc tt	shRNA		☒ 12B
shRNA KRAS ガイド 2	aatcatttgtggacgaatatCTCG AGatattcgccacaaaatgatt	shRNA		☒ 12B
shRNA KRAS ガイド 3	aaataataactaaatcatttgaCTCG AGtcaaagatttagtattatt	shRNA		☒ 12B
shRNA KRAS ガイド 4	aataataactaaatcatttgaaCTCG AGttcaaagatttagtattatt	shRNA		☒ 12B
shRNA KRAS ガイド 5	aaggactctgaagatgtacctCTC GAGaggtacatcttcagagtcctt	shRNA		☒ 12B

10

20

30

40

【表 14】

表 10:Gluc ノックダウンに使用したガイド配列

名称	スパーサー配列	位置	注記	初出の図
Gluc タ イリング ガイド 1	GAGATCAGGGCAAAC AGAACTTTGACTCCC	2	Cas13a スパーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 2	GGATGCAGATCAGGG CAAACAGAACTTTGA	7	Cas13a スパーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 3	GCACAGCGATGCAGA TCAGGGCAAACAGAA	13	Cas13a スパーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 4	GCTCGGCCACAGCGA TGCAGATCAGGGCAA	19	Cas13a スパーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 5	GGGGCTTGGCCTCGG CCACAGCGATGCAGA	28	Cas13a スパーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 6	GTGGGCTTGGCCTCG GCCACAGCGATGCAG	29	Cas13a スパーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 7	GTCTCGGTGGGCTTG GCCTCGGCCACAGCG	35	Cas13a スパーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 8	GTTCGTTGTTCTCGGT GGGCTTGGCCTCGG	43	Cas13a スパーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 9	GGAAGTCTTCGTTGTT CTCGGTGGGCTTGG	49	Cas13a スパーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C

10

20

30

40

Gluc タ イリング ガイド 10	GATGTTGAAGTCTTCG TTGTTCTCGGTGGG	54	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 11	GCGGCCACGATGTTG AAGTCTTCGTTGTTC	62	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 12	GTGGCCACGGCCACG ATGTTGAAGTCTTCG	68	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 13	GGTTGCTGGCCACGG CCACGATGTTGAAGT	73	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 14	GTCGCGAAGTTGCTG GCCACGGCCACGATG	80	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 15	GCCGTGGTCGCGAAG TTGCTGGCCACGGCC	86	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 16	GCGAGATCCGTGGTC GCGAAGTTGCTGGCC	92	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 17	GCAGCATCGAGATCC GTGGTCGCGAAGTTG	98	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 18	GGGTCAGCATCGAGA TCCGTGGTCGCGAAG	101	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 19	GCTTCCCGCGGTCAG CATCGAGATCCGTGG	109	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C

10

20

30

40

Gluc アイリング ガイド 20	GGGGCAACTTCCCGC GGTCAGCATCGAGAT	115	Cas13a スペーサーは 5'末端で 2 ヌクレオチドだけトランケートされていることに留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 21	GTCTTGCCGGGCAAC TTCCCGCGGTCAGCA	122	Cas13a スペーサーは 5'末端で 2 ヌクレオチドだけトランケートされていることに留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 22	GGCAGCTTCTTGCCG GGCAACTTCCCGCGG	128	Cas13a スペーサーは 5'末端で 2 ヌクレオチドだけトランケートされていることに留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 23	GCCAGCGGCAGCTTC TTGCCGGGCAACTTC	134	Cas13a スペーサーは 5'末端で 2 ヌクレオチドだけトランケートされていることに留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 24	GCACCTCCAGCGGCA GCTTCTTGCCGGGCA	139	Cas13a スペーサーは 5'末端で 2 ヌクレオチドだけトランケートされていることに留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 25	GCTTTGAGCACCTCCA GCGGCAGCTTCTTG	146	Cas13a スペーサーは 5'末端で 2 ヌクレオチドだけトランケートされていることに留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 26	GCATCTCTTTGAGCAC CTCCAGCGGCAGCT	151	Cas13a スペーサーは 5'末端で 2 ヌクレオチドだけトランケートされていることに留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 27	GTCCATCTCTTTGAGC ACCTCCAGCGGCAG	153	Cas13a スペーサーは 5'末端で 2 ヌクレオチドだけトランケートされていることに留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 28	GGGCATTGGCTTCCAT CTCTTTGAGCACCT	163	Cas13a スペーサーは 5'末端で 2 ヌクレオチドだけトランケートされていることに留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 29	GTCCGGGCATTGGCTT CCATCTCTTTGAGC	167	Cas13a スペーサーは 5'末端で 2 ヌクレオチドだけトランケートされていることに留意されたい	5C

10

20

30

40

Gluc アイリング ガイド 30	GGCCAGCTTTCCGGG CATTGGCTTCCATCT	175	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 31	GGGTGCAGCCAGCTT TCCGGGCATTGGCTT	181	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 32	GAGCCCCTGGTGCAG CCAGCTTTCCGGGCA	188	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 33	GATCAGACAGCCCCT GGTGCAGCCAGCTTT	195	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 34	GGCAGATCAGACAGC CCCTGGTGCAGCCAG	199	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 35	GACAGGCAGATCAGA CAGCCCCTGGTGCAG	203	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 36	GTGATGTGGGACAGG CAGATCAGACAGCCC	212	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 37	GACTTGATGTGGGAC AGGCAGATCAGACAG	215	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 38	GGGGCGTGCACTTGA TGTGGGACAGGCAGA	223	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 39	GCTTCATCTTGGGCGT GCACTTGATGTGGG	232	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C

10

20

30

40

Gluc アイリング ガイド 40	GTGAACTTCTTCATCT TGGGCGTGCACCTG	239	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 41	GGGATGAACTTCTTC ATCTTGGGCGTGCAC	242	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 42	GTGGGATGAACTTCTT CATCTTGGGCGTGC	244	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 43	GGGCAGCGTCCTGGG ATGAACTTCTTCATC	254	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 44	GGGTGTGGCAGCGTC CTGGGATGAACTTCT	259	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 45	GTTCGTAGGTGTGGC AGCGTCCTGGGATGA	265	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 46	GCGCCTTCGTAGGTGT GGCAGCGTCCTGGG	269	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 47	GTCTTTGTCGCCTTCG TAGGTGTGGCAGCG	276	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 48	GCTTTGTCGCCTTCGT AGGTGTGGCAGCGT	275	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 49	GTGCCGCCCTGTGCG GACTCTTTGTCGCCT	293	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C

10

20

30

40

Gluc アイリング ガイド 50	GTATGCCGCCCTGTGC GGA CTCTTTGTGCGC	295	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 51	GCCTCGCCTATGCCGC CCTGTGCGGACTCT	302	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 52	GGATCGCCTCGCCTAT GCCGCCCTGTGCGG	307	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 53	GATGTCGACGATCGC CTCGCCTATGCCGCC	315	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 54	GCAGGAATGTCGACG ATCGCCTCGCCTATG	320	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 55	GAATCTCAGGAATGT CGACGATCGCCTCGC	325	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 56	GCCCAGGAATCTCAG GAATGTCGACGATCG	331	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 57	GCCTTGAACCCAGGA ATCTCAGGAATGTCG	338	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 58	GCCAAGTCCTTGAAC CCAGGAATCTCAGGA	344	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 59	GTGGGCTCCAAGTCC TTGAACCCAGGAATC	350	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C

10

20

30

40

Gluc アイリング ガイド 60	GCCATGGGCTCCAAG TCCTTGAACCCAGGA	353	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 61	GGAAGTGGCTCCATGG GCTCCAAGTCCTTGA	361	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 62	GTGCGATGAACTGCT CCATGGGCTCCAAGT	367	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 63	GGACCTGTGCGATGA ACTGCTCCATGGGCT	373	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 64	GACAGATCGACCTGT GCGATGAACTGCTCC	380	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 65	GACACACAGATCGAC CTGTGCGATGAACTG	384	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 66	GTGCAGTCCACACAC AGATCGACCTGTGCG	392	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 67	GCCAGTTGTGCAGTC CACACACAGATCGAC	399	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 68	GGGCAGCCAGTTGTG CAGTCCACACACAGA	404	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 69	GTTTGAGGCAGCCAG TTGTGCAGTCCACAC	409	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C

10

20

30

40

Gluc アイリング ガイド 70	GAAGCCCTTTGAGGC AGCCAGTTGTGCAGT	415	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 71	GCACGTTGGCAAGCC CTTTGAGGCAGCCAG	424	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 72	GACTGCACGTTGGCA AGCCCTTTGAGGCAG	428	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 73	GGGTCAGAACACTGC ACGTTGGCAAGCCCT	437	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 74	GCAGGTCAGAACACT GCACGTTGGCAAGCC	439	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 75	GAGCAGGTCAGAAC CTGCACGTTGGCAAG	441	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 76	GGCCACTTCTTGAGC AGGTCAGAACACTGC	452	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 77	GCGGCAGCCACTTCTT GAGCAGGTCAGAAC	457	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 78	GTGCGGCAGCCACTT CTTGAGCAGGTCAGA	459	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc アイリング ガイド 79	GAGCGTTGCGGCAGC CACTTCTTGAGCAGG	464	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C

10

20

30

40

Gluc タイリング ガイド 80	GAAAGGTCGCACAGC GTTGCGGCAGCCACT	475	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タイリング ガイド 81	GCTGGCAAAGGTCGC ACAGCGTTGCGGCAG	480	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タイリング ガイド 82	GGGCAAAGGTCGCAC AGCGTTGCGGCAGCC	478	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タイリング ガイド 83	GTGGATCTTGCTGGC AAAGGTCGCACAGCG	489	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タイリング ガイド 84	GCACCTGGCCCTGGA TCTTGCTGGCAAAGG	499	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タイリング ガイド 85	GTGGCCCTGGATCTTG CTGGCAAAGGTCGC	495	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タイリング ガイド 86	GTGATCTTGTCACCT GGCCCTGGATCTTG	509	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タイリング ガイド 87	GCCCCTTGATCTTGTC CACCTGGCCCTGGA	514	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タイリング ガイド 88	GCCCTTGATCTTGTC ACCTGGCCCTGGAT	513	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タイリング ガイド 89	GCCTTGATCTTGTC CCTGGCCCTGGATC	512	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C

10

20

30

40

Gluc タ イリング ガイド 90	GGCAAAGGTCGCACA GCGTTGCGGCAGCCA	477	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 91	GCAAAGGTCGCACAG CGTTGCGGCAGCCAC	476	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 92	GAAGGTCGCACAGCG TTGCGGCAGCCACTT	474	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
Gluc タ イリング ガイド 93	GAGGTCGCACAGCGT TGCGGCAGCCACTTC	473	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
ノンター ゲティン グガイド 1	GGTAATGCCTGGCTT GTCGACGCATAGTCT G	N/A	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
ノンター ゲティン グガイド 2	GGGAACCTTGGCCGT TATAAAGTCTGACCA G	N/A	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C
ノンター ゲティン グガイド 3	GGAGGGTGAGAATTT AGAACCAAGATTGTT G	N/A	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5C

10

20

30

【表 15】

表 11: Cluc ノックダウンに使用したガイド配列

名称	スペーサー配列	位置	注記	初出 の図
Cluc タ イリング ガイド 1	GAGTCCTGGCAATGA ACAGTGGCGCAGTAG	32	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc タ イリング ガイド 2	GGGTGCCACAGCTGC TATCAATACATTCTC	118	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc タ イリング ガイド 3	GTTACATACTGACAC ATTCGGCAACATGTT	197	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc タ イリング ガイド 4	GTATGTACCAGGTTCC TGGAAGTGAATCT	276	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc タ イリング ガイド 5	GCCTTGGTTCCATCCA GGTTCTCCAGGGTG	350	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc タ イリング ガイド 6	GCAGTGATGGGATTC TCAGTAGCTTGAGCG	431	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc タ イリング ガイド 7	GAGCCTGGCATCTCA ACAACAGCGATGGTG	512	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc タ イリング ガイド 8	GTGTCTGGGGCGATT CTTACAGATCTTCCT	593	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc タ イリング ガイド 9	GCTGGATCTGAAGTG AAGTCTGTATCTTCC	671	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D

10

20

30

40

Cluc アイリング ガイド 10	GGCAACGTCATCAGG ATTCCATAGAGTGG	747	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc アイリング ガイド 11	GAGGCGCAGGAGATG GTGTAGTAGTAGAAG	830	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc アイリング ガイド 13	GAGGGACCCTGGAAT TGGTATCTTGCTTTG	986	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc アイリング ガイド 14	GGTAAGAGTCAACAT TCCTGTGTGAAACCT	1066	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc アイリング ガイド 15	GACCAGAATCTGTTTT CCATCAACAATGAG	1143	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc アイリング ガイド 16	GATGGCTGTAGTCAG TATGTCACCATCTTG	1227	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc アイリング ガイド 17	GTACCATCGAATGGA TCTCTAATATGTACG	1304	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc アイリング ガイド 18	GAGATCACAGGCTCC TTCAGCATCAAAAGA	1380	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc アイリング ガイド 19	GCTTTGACCGGCGAA GAGACTATTGCAGAG	1461	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
Cluc アイリング ガイド 20	GCCCCTCAGGCAATA CTCGTACATGCATCG	1539	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D

10

20

30

40

Cluc タ イリング ガイド 21	GCTGGTACTTCTAGG GTGTCTCCATGCTTT	1619	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
ノンター ゲティン グガイド 1	GGTAATGCCTGGCTT GTCGACGCATAGTCT G	N/A	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
ノンター ゲティン グガイド 2	GGGAACCTTGGCCGT TATAAAGTCTGACCA G	N/A	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D
ノンター ゲティン グガイド 3	GGAGGGTGAGAATTT AGAACCAAGATTGTT G	N/A	Cas13a スペーサーは 5'末 端で 2 ヌクレオチドだけト ランケートされていること に留意されたい	5D

10

20

【表 16】

表 12:哺乳類細胞における RNA 編集用の本研究に使用したガイド配列。ミスマッチ塩基
フリップは大文字とする

名称	スペーサー配列	注記	初出 の図
タイリング 30 nt 30 ミスマッチ距離	gCatectgcggcctctactctgcattca att	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 30 nt 28 ミスマッチ距離	gacCatectgcggcctctactctgcatt caa	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 30 nt 26 ミスマッチ距離	gaaacCatectgcggcctctactctgc attc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 30 nt 24 ミスマッチ距離	gctaaacCatectgcggcctctactctg cat	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 30 nt 22 ミスマッチ距離	gttetaaacCatectgcggcctctactc tgc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 30 nt 20 ミスマッチ距離	gtgttetaaacCatectgcggcctctac tct	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 30 nt 18 ミスマッチ距離	gaatgttetaaacCatectgcggcctct act	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 30 nt 16 ミスマッチ距離	gagaatgttetaaacCatectgcggcc tcta	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 30 nt 14 ミスマッチ距離	gatagaatgttetaaacCatectgcgg cctc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 30 nt 12 ミスマッチ距離	gccatagaatgttetaaacCatectg gcc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 30 nt 10 ミスマッチ距離	gttccatagaatgttetaaacCatectg cgg	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 30 nt 8 ミスマッチ距離	gcttccatagaatgttetaaacCatect gc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 30 nt 6 ミスマッチ距離	gctcttccatagaatgttetaaacCate ct	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 30 nt 4 ミスマッチ距離	gatctcttccatagaatgttetaaacCa tc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 30 nt 2 ミスマッチ距離	ggaatctcttccatagaatgttetaaac Ca	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 50 ミスマッチ距離	gCatectgcggcctctactctgcattca attacatactgacacattcgga	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 48 ミスマッチ距離	gacCatectgcggcctctactctgcatt caattacatactgacacattcgg	U6 発現用に 5' G を有する	6C

10

20

30

40

タイリング 50 nt 46 ミスマッチ距離	gaaacCatcctgcggcctctactctgc attcaattacatactgacacattc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 44 ミスマッチ距離	gctaaacCatcctgcggcctctactctg cattcaattacatactgacacat	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 42 ミスマッチ距離	gttctaaacCatcctgcggcctctactc tgcattcaattacatactgacac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 40 ミスマッチ距離	gtgttctaaacCatcctgcggcctctac tctgcattcaattacatactgac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 38 ミスマッチ距離	gaatgttctaaacCatcctgcggcctct actctgcattcaattacatactg	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 36 ミスマッチ距離	gagaatgttctaaacCatcctgcggcc tctactctgcattcaattacatac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 34 ミスマッチ距離	gatagaatgttctaaacCatcctgcg cctctactctgcattcaattacat	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 32 ミスマッチ距離	gccatagaatgttctaaacCatcctg gcctctactctgcattcaattac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 30 ミスマッチ距離	gttccatagaatgttctaaacCatcct cggcctctactctgcattcaatt	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 28 ミスマッチ距離	gcttccatagaatgttctaaacCatcct gcggcctctactctgcattcaa	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 26 ミスマッチ距離	gctcttccatagaatgttctaaacCate ctgcggcctctactctgcatc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 24 ミスマッチ距離	gatctcttccatagaatgttctaaacCa tctgcggcctctactctgcat	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 22 ミスマッチ距離	ggaatctcttccatagaatgttctaaac Catectgcggcctctactctgc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 20 ミスマッチ距離	gtggaatctcttccatagaatgttctaa acCatectgcggcctctactct	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 18 ミスマッチ距離	gactggaatctcttccatagaatgttct aaacCatectgcggcctctact	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 16 ミスマッチ距離	ggaactggaatctcttccatagaatgtt ctaaacCatectgcggcctcta	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 14 ミスマッチ距離	gtggaactggaatctcttccatagaatg ttctaaacCatectgcggcctc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 12 ミスマッチ距離	gcctggaactggaatctcttccataga atgttctaaacCatectgcggcc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 10 ミスマッチ距離	gttctggaactggaatctcttccatag aatgttctaaacCatectgcgg	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 8 ミスマッチ距離	gggttctggaactggaatctcttccat agaatgttctaaacCatectgc	U6 発現用に 5' G を有する	6C

10

20

30

40

タイリング 50 nt 6 ミスマッチ距離	gcagggttcctggaactggaatctctttcc atagaatgttctaaacCatcct	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 4 ミスマッチ距離	gaccagggttcctggaactggaatctcttt ccatagaatgttctaaacCatc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 50 nt 2 ミスマッチ距離	ggtaccagggttcctggaactggaatctc ttccatagaatgttctaaacCa	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 70 ミスマッチ距離	gCatcctgcggcctctactctgcattca attacatactgacacattcggcaacatgt tttctctggttat	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 68 ミスマッチ距離	gacCatectgcggcctctactctgcatt caattacatactgacacattcggcaaca tgttttctctggtt	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 66 ミスマッチ距離	gaaacCatectgcggcctctactctgc attcaattacatactgacacattcggcaa catgttttctctggt	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 64 ミスマッチ距離	gctaaacCatectgcggcctctactctg cattcaattacatactgacacattcggca acatgttttctctg	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 62 ミスマッチ距離	gttctaaacCatectgcggcctctactc tgattcaattacatactgacacattcgg caacatgttttcc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 60 ミスマッチ距離	gtgttctaaacCatectgcggcctctac tctgcattcaattacatactgacacattc ggcaacatgtttt	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 58 ミスマッチ距離	gaatgttctaaacCatectgcggcctct actctgcattcaattacatactgacacatt cggcaacatgtt	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 56 ミスマッチ距離	gagaatgttctaaacCatectgcggcc tctactctgcattcaattacatactgacac attcggcaacatgt	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 54 ミスマッチ距離	gatagaatgttctaaacCatectgcgg cctctactctgcattcaattacatactgac acattcggcaacat	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 52 ミスマッチ距離	gccatagaatgttctaaacCatectgcg gcctctactctgcattcaattacatactg acacattcggcaac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 50 ミスマッチ距離	gttccatagaatgttctaaacCatectg cggcctctactctgcattcaattacatac tgacacattcggca	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 48 ミスマッチ距離	gctttccatagaatgttctaaacCatect gcggcctctactctgcattcaattacata ctgacacattcgg	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 46 ミスマッチ距離	gctctttccatagaatgttctaaacCatc ctgcggcctctactctgcattcaattaca tactgacacattc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 44 ミスマッチ距離	gatctctttccatagaatgttctaaacCa tctgcggcctctactctgcattcaatta catactgacacat	U6 発現用に 5' G を有する	6C

10

20

30

40

タイリング 70 nt 42 ミスマッチ距離	ggaatctctttccatagaatgttctaaac Catectgcggcctctactctgcattcaa ttacatactgacac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 40 ミスマッチ距離	gtggaatctctttccatagaatgttctaa acCatectgcggcctctactctgcattc aattacatactgac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 38 ミスマッチ距離	gactggaatctctttccatagaatgttct aaacCatectgcggcctctactctgcatt tcaattacatactg	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 36 ミスマッチ距離	ggaactggaatctctttccatagaatgtt ctaaacCatectgcggcctctactctgc attcaattacatac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 34 ミスマッチ距離	gtggaactggaatctctttccatagaatg ttctaaacCatectgcggcctctactct gcattcaattacat	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 32 ミスマッチ距離	gcttggaactggaatctctttccataga atgttctaaacCatectgcggcctctac tctgcattcaattac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 30 ミスマッチ距離	gttcttggaactggaatctctttccatag aatgttctaaacCatectgcggcctcta ctctgcattcaatt	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 28 ミスマッチ距離	gggttcttggaactggaatctctttccat agaatgttctaaacCatectgcggcctc tactctgcattcaa	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 26 ミスマッチ距離	gcaggttcttggaactggaatctctttcc atagaatgttctaaacCatectgcggc tctactctgcattc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 24 ミスマッチ距離	gaccaggttcttggaactggaatctcttt ccatagaatgttctaaacCatectgcg cctctactctgcatt	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 22 ミスマッチ距離	ggtaccaggttcttggaactggaatctc ttccatagaatgttctaaacCatectgc ggcctctactctgc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 20 ミスマッチ距離	gatgtaccaggttcttggaactggaatc tctttccatagaatgttctaaacCatect gcggcctctactct	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 18 ミスマッチ距離	ggtatgtaccaggttcttggaactggaa tctctttccatagaatgttctaaacCate ctgcggcctctact	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 16 ミスマッチ距離	gacgtatgtaccaggttcttggaactgg aatctctttccatagaatgttctaaacCa tctgcggcctcta	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 14 ミスマッチ距離	gacacgtatgtaccaggttcttggaact ggaatctctttccatagaatgttctaaac Catectgcggcctc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 12 ミスマッチ距離	gcaacacgtatgtaccaggttcttgga actggaatctctttccatagaatgttctaa acCatectgcggc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 10 ミスマッチ距離	gccaacacgtatgtaccaggttcttg gaactggaatctctttccatagaatgttc taaacCatectgcg	U6 発現用に 5' G を有する	6C

10

20

30

40

タイリング 70 nt 8 ミスマッチ距離	ggaccaaacacgtatgtaccaggttcct ggaactggaatctctttccatagaatgtt ctaaacCatectgc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 6 ミスマッチ距離	gttgaccaaacacgtatgtaccaggttc ctggaactggaatctctttccatagaatg ttctaaacCatect	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 4 ミスマッチ距離	gccttgaccaaacacgtatgtaccaggt tcctggaactggaatctctttccatagaa tgttctaaacCate	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 70 nt 2 ミスマッチ距離	gttccttgaccaaacacgtatgtaccag gttcctggaactggaatctctttccatag aatgttctaaacCa	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 84 ミスマッチ距離	gCatectgcggcctctactctgcattca attacatactgacacattcggaacatgt tttctctggtttattttcacacagtc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 82 ミスマッチ距離	gacCatectgcggcctctactctgcatt caattacatactgacacattcggaaca tgttttctctggtttattttcacacagtc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 80 ミスマッチ距離	gaaacCatectgcggcctctactctgc attcaattacatactgacacattcgga catgttttctctggtttattttcacacag	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 78 ミスマッチ距離	gctaaacCatectgcggcctctactctg cattcaattacatactgacacattcgga acatgttttctctggtttattttcacac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 76 ミスマッチ距離	gttctaaacCatectgcggcctctactc tgcattcaattacatactgacacattcg gaacatgttttctctggtttattttcac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 74 ミスマッチ距離	gtgttctaaacCatectgcggcctctac tctgcattcaattacatactgacacattc ggcaacatgttttctctggtttattttc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 72 ミスマッチ距離	gaatgttctaaacCatectgcggcctct actctgcattcaattacatactgacacatt cgggaacatgttttctctggtttatttt	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 70 ミスマッチ距離	gagaatgttctaaacCatectgcggcc tctactctgcattcaattacatactgacac attcgggaacatgttttctctggtttat	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 68 ミスマッチ距離	gatagaatgttctaaacCatectgcg cctctactctgcattcaattacatactgac acattcgggaacatgttttctctgggtt	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 66 ミスマッチ距離	gccatagaatgttctaaacCatectg gcctctactctgcattcaattacatactg acacattcgggaacatgttttctctgggt	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 64 ミスマッチ距離	gttccatagaatgttctaaacCatectg cggcctctactctgcattcaattacatac tgacacattcgggaacatgttttctctg	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 62 ミスマッチ距離	gctttccatagaatgttctaaacCatect gcggcctctactctgcattcaattacata ctgacacattcgggaacatgttttcc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 60 ミスマッチ距離	gctctttccatagaatgttctaaacCate ctcggcctctactctgcattcaattaca tactgacacattcgggaacatgttttt	U6 発現用に 5' G を有する	6C

10

20

30

40

タイリング 84 nt 58 ミスマッチ距離	gatctctttccatagaatgttctaaacCa tctctgcgccctctactctgcattcaatta catactgacacattcggcaacatgttt	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 56 ミスマッチ距離	ggaatctctttccatagaatgttctaaac Catctctgcgccctctactctgcattcaa ttacatactgacacattcggcaacatgt	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 54 ミスマッチ距離	gtggaatctctttccatagaatgttctaa acCatctctgcgccctctactctgcattc aattacatactgacacattcggcaacat	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 52 ミスマッチ距離	gactggaatctctttccatagaatgttct aaacCatctctgcgccctctactctgcat tcaattacatactgacacattcggcaac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 50 ミスマッチ距離	ggaactggaatctctttccatagaatgtt ctaaacCatctctgcgccctctactctgc attcaattacatactgacacattcggca	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 48 ミスマッチ距離	gtggaactggaatctctttccatagaatg ttctaaacCatctctgcgccctctactct gcattcaattacatactgacacattcgg	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 46 ミスマッチ距離	gcttggaactggaatctctttccataga atgttctaaacCatctctgcgccctctac tctgcattcaattacatactgacacattc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 44 ミスマッチ距離	gttcttggaactggaatctctttccatag aatgttctaaacCatctctgcgccctcta ctctgcattcaattacatactgacacat	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 42 ミスマッチ距離	gggttcttggaactggaatctctttccat agaatgttctaaacCatctctgcgccctc tactctgcattcaattacatactgacac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 40 ミスマッチ距離	gcaggttcttggaactggaatctctttcc atagaatgttctaaacCatctctgcgcc tctactctgcattcaattacatactgac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 38 ミスマッチ距離	gaccaggttcttggaactggaatctcttt ccatagaatgttctaaacCatctctgcg cctctactctgcattcaattacatactg	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 36 ミスマッチ距離	ggtaccaggttcttggaactggaatctc tttccatagaatgttctaaacCatctctg ggcctctactctgcattcaattacatac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 34 ミスマッチ距離	gatgtaccaggttcttggaactggaatc tctttccatagaatgttctaaacCatct gcgccctctactctgcattcaattacat	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 32 ミスマッチ距離	ggtatgtaccaggttcttggaactggaa tctctttccatagaatgttctaaacCatc ctgcgccctctactctgcattcaattac	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 30 ミスマッチ距離	gacgtatgtaccaggttcttggaactgg aatctctttccatagaatgttctaaacCa tctctgcgccctctactctgcattcaatt	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 28 ミスマッチ距離	gacacgtatgtaccaggttcttggaact ggaatctctttccatagaatgttctaaac Catctctgcgccctctactctgcattcaa	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 26 ミスマッチ距離	gcaacacgtatgtaccaggttcttgga actggaatctctttccatagaatgttctaa acCatctctgcgccctctactctgcattc	U6 発現用に 5' G を有する	6C

10

20

30

40

タイリング 84 nt 24 ミスマッチ距離	gccaacacgtatgtaccaggttcctg gaactggaatctctttccatagaatgtt taaacCatectgcggcctctactctgca t	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 22 ミスマッチ距離	ggaccaacacgtatgtaccaggttcct ggaactggaatctctttccatagaatgtt ctaaacCatectgcggcctctactctgc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 20 ミスマッチ距離	gttgaccaacacgtatgtaccaggttc ctggaactggaatctctttccatagaatg ttctaaacCatectgcggcctctactct	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 18 ミスマッチ距離	gccttgaccaacacgtatgtaccaggt tctggaactggaatctctttccatagaa tgttctaaacCatectgcggcctctact	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 16 ミスマッチ距離	gttccttgaccaacacgtatgtaccag gttctggaactggaatctctttccatag aatgttctaaacCatectgcggcctcta	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 14 ミスマッチ距離	gggttccttgaccaacacgtatgtacc aggttctggaactggaatctctttccat agaatgttctaaacCatectgcggcctc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 12 ミスマッチ距離	gttggttccttgaccaacacgtatgtac caggttctggaactggaatctctttcca tagaatgttctaaacCatectgcggcc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 10 ミスマッチ距離	gccttggttccttgaccaacacgtatgt accaggttctggaactggaatctctttc catagaatgttctaaacCatectgcgg	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 8 ミスマッチ距離	ggcccttggttccttgaccaacacgta tgtaccaggttctggaactggaatctct ttccatagaatgttctaaacCatectgc	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 6 ミスマッチ距離	gccgcccttggttccttgaccaacacg tatgtaccaggttctggaactggaatct ctttccatagaatgttctaaacCatect	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 4 ミスマッチ距離	gcgccgcccttggttccttgaccaaca cgtatgtaccaggttctggaactggaa tctctttccatagaatgttctaaacCate	U6 発現用に 5' G を有する	6C
タイリング 84 nt 2 ミスマッチ距離	ggtcgccgcccttggttccttgaccaaa cacgtatgtaccaggttctggaactgg aatctctttccatagaatgttctaaacCa	U6 発現用に 5' G を有する	6C
ADAR ノンター ゲティングガイド	GTAATGCCTGGCTTGTC GACGCATAGTCTG	U6 発現用に 5' G を有する	6C
TAG モチーフ用 の PFS 結合スクリ ーニングガイド	gaaaacgcaggttctcCagtttcggg agcagcgacgtctccctgtagtc	U6 発現用に 5' G を有する	7B
AAC モチーフ用 の PFS 結合スクリ ーニングガイド	gacgcaggttctctagCttcgaggagc agcgacgtctccctgtagtc	U6 発現用に 5' G を有する	7B
PFS 結合スクリー ニングノンターゲ ティング	GTAATGCCTGGCTTGTC GACGCATAGTCTG	U6 発現用に 5' G を有する	7B

10

20

30

40

モチーフ優先性ターゲットニングガイド	gatagaatgttctaaacCatcctgcggcctctactctgcattcaattacat	U6 発現用に 5' G を有する	7C
モチーフ優先性ノンターゲットニングガイド	GTAATGCCTGGCTTGTCGACGCATAGTCTG	U6 発現用に 5' G を有する	7C
PPIB タイリングガイド 50 ミスマッチ距離	gCaaggccacaaaattatccactgttttggaacagtctttccgaagagac	U6 発現用に 5' G を有する	13D
PPIB タイリングガイド 42 ミスマッチ距離	gcctgtagcCaaggccacaaaattatccactgttttggaacagtctttcc	U6 発現用に 5' G を有する	13D
PPIB タイリングガイド 34 ミスマッチ距離	gctttctctcctgtagcCaaggccacaaaattatccactgttttggaaca	U6 発現用に 5' G を有する	13D
PPIB タイリングガイド 26 ミスマッチ距離	ggccaaatcctttctctcctgtagcCaaggccacaaaattatccactgttt	U6 発現用に 5' G を有する	13D
PPIB タイリングガイド 18 ミスマッチ距離	gtttttagtagccaaatcctttctctcctgtagcCaaggccacaaaattatc	U6 発現用に 5' G を有する	13D
PPIB タイリングガイド 10 ミスマッチ距離	gatttgctgtttttagtagccaaatcctttctcctgtagcCaaggccaca	U6 発現用に 5' G を有する	13D
PPIB タイリングガイド 2 ミスマッチ距離	gacgatggaatttgctgtttttagtagccaaatcctttctcctgtagcCa	U6 発現用に 5' G を有する	13D
ターゲットニングガイド、対向塩基 G	gatagaatgttctaaacGatcctgcggcctctactctgcattcaattacat	U6 発現用に 5' G を有する	13D
ターゲットニングガイド、対向塩基 A	gatagaatgttctaaacAatcctgcggcctctactctgcattcaattacat	U6 発現用に 5' G を有する	13D
ターゲットニングガイド、対向塩基 C	gatagaatgttctaaacTatcctgcggcctctactctgcattcaattacat	U6 発現用に 5' G を有する	13D
AVPR2 ガイド 37 ミスマッチ距離	gggtcccacgcggccCacagctgcacaggaagaagggtgccagcacagca	U6 発現用に 5' G を有する	8A
AVPR2 ガイド 35 ミスマッチ距離	gggggtcccacgcggccCacagctgcaccaggaagaagggtgccagcacag	U6 発現用に 5' G を有する	8A
AVPR2 ガイド 33 ミスマッチ距離	gccgggtcccacgcggccCacagctgcaccaggaagaagggtgccagcac	U6 発現用に 5' G を有する	8A

10

20

30

40

FANCC ガイド 37 ミスマッチ距離	gggtgatgacatccCaggcgatcgtgt ggcctccaggagcccagagcagga	U6 発現用に 5' G を有する	8B
FANCC ガイド 35 ミスマッチ距離	gagggtgatgacatccCaggcgatcg tgtggcctccaggagcccagagcag	U6 発現用に 5' G を有する	8B
FANCC ガイド 32 ミスマッチ距離	gatcagggtgatgacatccCaggcga tcgtgtggcctccaggagcccagag	U6 発現用に 5' G を有する	8B
合成疾患遺伝子標 的 IL2RG	ggtggctccattcactcCaatgctgag cacttccacagagtgggttaaagc	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 F8	gtttctaataatatttgCagactgatgg actattctcaattaataatgat	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 LDLR	gagatgttgctgtggatCcagtccaca gccagcccgtcgggggcctggatg	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 CBS	gcaggccggcccagctgCcaggtgc acctgctcggagcatcgggccggatc	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 HBB	gcaaagaacctctgggtCcaagggtg gaccaccagcagcctgccaggggcc	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 ALDOB	gaagagaaacttagtttCcagggttg gtagagggcaaagggtgatagca	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 DMD	gtcagcctagtgcagagCcactggta gttggtggttagagtccaagtcc	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 SMAD4	ggctcattgtgaacaggCagtaatgt ccgggatggggcgcataggcggg	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 BRCA2	gtagctaaagaacttgaCcaagacata tcaggatccacctcagctcctaga	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 GRIN2A	ggggcattgttctgtgcCcagtcctgct ggtagacctgctccccggtggct	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 SCN9A	gagaagtcgttcattgtCcaccgtggg agcgtacagtcattgatcttg	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 TARDBP	gggattaatgctgaacgCaccaaagtt catcccaccaccatattactacc	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 CFTR	gtcccaaaggctttcctCactgttgca aagtattgaatcccaagacaca	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 UBE3A	gatgaatgaacgatttcCagaactcc ctaatacagaacagagtccttgta	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 SMPD1	ggagcctctgccggagcCcagagaa cccgagagtcagacagagccagcgcc	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 USH2A	ggcttccgtggagacacCcaatcaatt tgaagagatcttgaagtgatgcca	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標 的 MEN1	gtgggactgcctcctcCatttgcag atgccgtcgtagaatcgcagcagg	U6 発現用に 5' G を有する	8E

10

20

30

40

合成疾患遺伝子標的 C8orf37	gcttcttcaatagttctCagctacactg gcaggcatatgcccgtgttcct	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 MLH1	gattccttttcttctgCcaattcacctca gtggctagtcgaagaatgaag	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 TSC2	gcagcttcagcaccttcCagtcagact cctgcttcaagcactgcagcagga	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 NF1	gccatttgcttgcaagtCcaactccaga ggattccggattgccataaatact	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 MSH6	gttcaatagtttggcCagtatcgtttac agcccttcttggtagattca	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 SMN1	ggcaaccgtcttctgacCaaatggcag aacatttgcccccaactttccact	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 SH3TC2	gcgactttccaatgaacCactgaagcc caggtatgacaaagccgatgatct	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 DNAH5	gtttacactcatgcttcCacagctttaac agatcatttggttccttgatga	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 MECP2	gcttaagcttccgtgtcCagccttcagg cagggtgggggtcatcatacatgg	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 ADGRV1	ggacagctgggctgacCatgatgtca tccagaaacactggggaccctcag	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 AHI1	gtctcatctcaacttccCatatccgtatc atggaatcatagcatcctgtaa	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 PRKN	gcattgcagacgcgggttcCactgcag ccacagttccagcaccactcgagcc	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 COL3A1	gttggttagggtaaccCagtattctcc actcttgagttcaggatggcaga	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 BRCA1	gctacactgtccaacacCactctcgg gtcaccacaggtgcctcacacatc	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 MYBPC3	gctgcactgtgtaccccCagagctccg tgttgccgacatcctgggggtggct	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 APC	gagcttctgccactccCaacaggtttc acagtaagcgcgtatctgttcca	U6 発現用に 5' G を有する	8E
合成疾患遺伝子標的 BMPR2	gacggcaagagcttaccCagtcacttg tgtggagacttaatacttgcata	U6 発現用に 5' G を有する	8E
KRAS タイリングガイド 50 ミスマッチ距離	gCaaggccacaaaattatccactgtttt tggaacagcttttccgaagagac	U6 発現用に 5' G を有する	9A
KRAS タイリングガイド 42 ミスマッチ距離	gcctgtagcCaaggccacaaaattatc cactgttttgggaacagcttttcc	U6 発現用に 5' G を有する	9A

10

20

30

40

KRAS タイリング ガイド 34 ミスマ ッチ距離	gctttctctcctgtagcCaaggccacaa aattatccactgttttgaaca	U6 発現用に 5' G を有する	9A
KRAS タイリング ガイド 26 ミスマ ッチ距離	ggccaaatcctttctcctgtagcCaa ggccacaaaattatccactgttt	U6 発現用に 5' G を有する	9A
KRAS タイリング ガイド 18 ミスマ ッチ距離	gtttttagcctccaaatcctttctcctgt gcCaaggccacaaaattatc	U6 発現用に 5' G を有する	9A
KRAS タイリング ガイド 10 ミスマ ッチ距離	gatttgctgtttttagcctccaaatccttt ctcctgtagcCaaggccaca	U6 発現用に 5' G を有する	9A
KRAS タイリング ガイド 2 ミスマッ チ距離	gacgatggaatttgctgtttttagcca aatcctttctcctgtagcCa	U6 発現用に 5' G を有する	9A
KRAS タイリング ノンターゲット ングガイド	GTAATGCCTGGCTTGTC GACGCATAGTCTG	U6 発現用に 5' G を有する	9A
トランスクリプト ーム特異性用のル シフェラーゼ W85X ターグ ティングガイド	gatagaatgttctaaacCacctgcgg cctctactctgcattcaattacat	U6 発現用に 5' G を有する	53B
トランスクリプト ーム特異性用のノ ンターゲット ングガイド	GCAGGGTTTTCCCAGTC ACGACGTTGTAAAGTTG	U6 発現用に 5' G を有する	9C
内因性 KRAS ガ イド 2	gtcaaggcactcttggcCacgccacc agctccaactaccacaagtttatat	U6 発現用に 5' G を有する	10F
内因性 PPIB ガ イド 1	gcaaagatcacccggccCacatcttca tctccaattcgtaggtcaaaatac	U6 発現用に 5' G を有する	10G
内因性 KRAS ガ イド 1	GcggccaccagctccaacCaccacaa gtttatattcagtcatttcagcagg	U6 発現用に 5' G を有する	10F
内因性 KRAS ガ イド 3	GtttctccatcaattacCacttgcttct gtaggaatcctctattGTtgga	U6 発現用に 5' G を有する	10F
内因性 PPIB ガ イド 2	GctttctcctgtagcCaaggccaca aaattatccactgttttgaaca	U6 発現用に 5' G を有する	10G
内因性ノンター ゲティングガイド	GTAATGCCTGGCTTGTC GACGCATAGTCTG	U6 発現用に 5' G を有する	10F

10

20

30

40

BoxB Cluc ガイド	tctttccataGGCCCTGAAAA AGGGCCgttctaaacCatcctgc ggcctctactcGGCCCTGAAA AAGGGCCattcaattac	U6 発現用に 5' G を有する	18B
BoxB ノンターゲット ティングガイド	cagctggcgaGGCCCTGAAA AAGGGCCggggatgtgcCgca aggcgattaagtggGGCCCTGA AAAAGGGCCacgccagggt	U6 発現用に 5' G を有する	18B
Stafforst 完全長 ADAR2 ガイド 1	GTGGAATAGTATAACAA TATGCTAAATGTTGTTA TAGTATCCCACTctaaaCCA tcctgcgGGGCCCTCTTCAG GGCCC	U6 発現用に 5' G を有する	18C
Stafforst 完全長 ADAR2 ノンターゲット ティングガイド	GTGGAATAGTATAACAA TATGCTAAATGTTGTTA TAGTATCCCAcaccctggcgt taccgaGGGCCCTCTTCAG GGCCC	U6 発現用に 5' G を有する	18C

10

20

参考文献

1. P. D. Hsu, E. S. Lander, F. Zhang, Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell 157, 1262-1278 (2014).
2. A. C. Komor, A. H. Badran, D. R. Liu, CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. Cell 168, 20-36 (2017).
3. L. Cong et al., Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819-823 (2013).
4. P. Mali et al., RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339, 823-826 (2013).
5. B. Zetsche et al., Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell 163, 759-771 (2015).
6. H. Kim, J. S. Kim, A guide to genome engineering with programmable nucleases. Nat Rev Genet 15, 321-334 (2014).
7. A. C. Komor, Y. B. Kim, M. S. Packer, J. A. Zuris, D. R. Liu, Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature 533, 420-424 (2016).
8. K. Nishida et al., Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. Science 353, (2016).

30

40

50

9. Y. B. Kim et al., Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol* 35, 371-376 (2017).
10. O. O. Abudayyeh et al., C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* 353, aaf5573 (2016).
11. S. Shmakov et al., Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell* 60, 385-397 (2015).
12. S. Shmakov et al., Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 15, 169-182 (2017).
13. A. A. Smargon et al., Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28. *Mol Cell* 65, 618-630 e617 (2017).
14. J. S. Gootenberg et al., Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* 356, 438-442 (2017).
15. O. O. Abudayyeh et al., RNA targeting with CRISPR-Cas13a. *Nature* in press, (2017).
16. K. Nishikura, Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem* 79, 321-349 (2010).
17. B. L. Bass, H. Weintraub, An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate. *Cell* 55, 1089-1098 (1988).
18. M. M. Matthews et al., Structures of human ADAR2 bound to dsRNA reveal base-flipping mechanism and basis for site selectivity. *Nat Struct Mol Biol* 23, 426-433 (2016).
19. A. Kuttan, B. L. Bass, Mechanistic insights into editing-site specificity of ADARs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E3295-3304 (2012).
20. S. K. Wong, S. Sato, D. W. Lazinski, Substrate recognition by ADAR1 and ADAR2. *RNA* 7, 846-858 (2001).
21. M. Fukuda et al., Construction of a guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilising intracellular A-to-I RNA editing. *Sci Rep* 7, 41478 (2017).
22. M. F. Montiel-Gonzalez, I. Vallecillo-Vie

- jo, G. A. Yudowski, J. J. Rosenthal, Correction of mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by site-directed RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 18285–18290 (2013).
23. M. F. Montiel-Gonzalez, I. C. Vallecillo-Viejo, J. J. Rosenthal, An efficient system for selectively altering genetic information within mRNAs. *Nucleic Acids Res* 44, e157 (2016). 10
24. J. Wettengel, P. Reautschnig, S. Geisler, P. J. Kahle, T. Stafforst, Harnessing human ADAR2 for RNA repair—Recoding a PINK1 mutation rescues mitophagy. *Nucleic Acids Res* 45, 2797–2808 (2017).
25. Y. Wang, J. Havel, P. A. Beal, A Phenotypic Screen for Functional Mutants of human Adenosine Deaminase Acting on RNA 1. *ACS Chem Biol* 10, 2512–2519 (2015).
26. K. A. Lehmann, B. L. Bass, Double-stranded RNA adenosine deaminases ADAR1 and ADAR2 Have overlapping specificities. *Biochemistry* 39, 12875–12884 (2000). 20
27. Y. Zheng, C. Lorenzo, P. A. Beal, DNA editing in DNA/RNA hybrids by adenosine deaminases that act on RNA. *Nucleic Acids Res* 45, 3369–3377 (2017).
28. K. Gao et al., A de novo loss-of-function GRIN2A mutation associated with childhood focal epilepsy and acquired epileptic aphasia. *PLoS One* 12, e0170818 (2017). 30
29. H. M. Lanoiselee et al., APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med* 14, e1002270 (2017).
30. C. Ballatore, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8, 663–672 (2007). 40
31. Y. Li et al., Carriers of rare missense variants in IFIH1 are protected from psoriasis. *J Invest Dermatol* 130, 2768–2772 (2010).
32. R. S. Finkel et al., Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet* 388, 3017–3026 (2016).
- 実施例 4 — 追加的な V I - B 型エフェクター

【表 17】

表 13

パルディバクター・プロ ピオニシゲネス (<i>Paludibacter propionigenes</i>) WB4 (NC_014734.1) >WP_013446107	mktssanniyfnginsfkkifdskgaiapiaekscrnfdikaqndvnkeqrihyfavghtf kqlktenlfeyvidenlrakrptrfislqgqfdekiefienikrlisdrnshyihfrdp kidavptniidflkesfelaviqiylkekginylqfsenphadqklvafhlhdkflpldek ktsmlqnetpqlkeykeyrkyfktlskqaaidqllfaeketdyiwnlfdshpvltsisagk ylsfysclfllsmflykseanqliskikgfkknntteekskreiftffskrfsnmdidse enqlvkfrdlilylnhyvpawnkdleldssnampatdklkskieleinrsfplyegnerf atfakyqiwgkklhlgksiekeyinasftdeetaytyetdtcpelkdahkladlkaakg lfgrkkeknesdikktetsirelqhepnipkdkliqrieknlltvsygrnqdrfmdfsar flaeinyfgqdasfkmyhyfyatdegnselekyelpkdkkkysdkfhgqklvhfisykeh lkryeswddafviennaiqlklsfdgventvtiqralliyllledalnriqnntaenagkq llqeyyshnkadlsafkqiltqgdsieppqktefklklprllnnyspainhlqtpsssl plilekallaekrycslyvkakaegnnyddfikrnkgkqfklqfirkawnlmyfrnsylqn vqaaghhksfhierdefndfsrymfafeelsqykyynemfekkgffennefakilqsgt slenlyektqkqfeiwlasntaktknkpdnyhlnnyeqqfsnqlfflnshfynlktgk lqtdangqiiyealnnyqylipeyyttdkperseksgnklynklkatkledallyemam cylkadkqiadkakhpitklitdsvefnitnkegiqlylhlpvfkidafiglkmhkeqg dkkhptsflanivnylelvkndkdirktyeafstnpvkrtlttyddlakidghlksikf tnvtleleryfifkeslivkkgnnidkyikglrnyyennekkknegirnkaafhfgipdsk sydqlirdaevmfianevkpthatkytdlnkqlhtvcdkmetvhdnyfskegdgkkkre aagqkyfeniisak	10
プレボテラ属種 (<i>Prevotella</i> sp.) P5-60 (NZ_JXQJ01000080.1) >WP_044074780.1	mnipalvenqkkyfgtysvmamlnaqtvlhdhigkvadiegeqnennenlwfhpvmshlyn akngydkqpektmfiierlqsyfplkimaengreysngkyqnrvevnnsndifevlkra fgvlkmyrdltnhyktyeeklndgcefltsteqplsgminkyytvalrntkerygykaed lafiqdnrykftkdaygkrksqvtngsfllslqdyngdtqkklhlsqvgiallicfldkq yiniflsrlpifssynaqseerriiirsfginsikgpkdrihseksnksvamdmlnevr cpdelftttsaekqsrfrriisdhnevlmkrssdrfvp1llqyidygklfdhirfhvnm klryllkadktcidgqtrvrvieqplngfgrleevetmrkqengtfgnsgirirdfenmk rddanpanyyivdythyilennkvemfisdeentp1lpvieddryvvtipscrmst leipamafhmflfgsekteklidvhdrykrflqamqkeevtaeniasfgiaesdlpqki mdlisgnahgkdvdafirltvddmltdterrikrfkddrksirsadnkmkgkrgfkqistg kladflakdivlfqpsvndngenkitglnyrimgsaiavydsqddyakqgfkmlfekarl igkgttephpflykvfvsipanavdferlylierkfyilglsneikkgnrvdvpfirrd qnkwktpamktlgriyessedlpvelprgmfdneikshlkslpqmegidfnanvtyliaey mkrvlnddfgtqfygwkrnyrymdmlrgeydrkgsqslqhcftsieereglwkerasrtery klasnkirsnrqmrnasseeietildkrlsnrneyqksekieriryrvqdallflakkt lteladfdgerfklkeimpdaekgilseimpmsftfekggkkytitsegmklknygdffv lasdkrignllevgsntvskedimeefkkydqcrpeissivfnlekwaftypelparv drkekvdvswildvlsnnkdinneqsyilrkirnafdhnnypdkgiveikalpeiainsik kafgeyaimk	20
プレボテラ属種 (<i>Prevotella</i> sp.) P4-76 (NZ_JXQI01000021.1) >WP_044072147.1	mnipalvenqkkyfgtysvmamlnaqtvlhdhigkvadiegeqnennenlwfhpvmshlyn akngydkqpektmfiierlqsyfplkimaengreysngkyqnrvevnnsndifevlkra fgvlkmyrdltnhyktyeeklndgcefltsteqplsgminnyytvalrnmnergygktd lafiqdkrfkfvkdaygkksqvtngfllslqdyngdtqkklhlsqvgiallicfldkq yiniflsrlpifssynaqseerriiirsfginsikgpkdrihseksnksvamdmlneikr cpnelfetlsaekqsrfrriisdhnevlmkrssdrfvp1llqyidygklfdhirfhvnm klryllkadktcidgqtrvrvieqplngfgrleevetmrkqengtfgnsgirirdfenmk rddanpanyyivdythyilennkvemfisdeetpap1lpvieddryvvtipscrmst leipamafhmflfgskkteklidvhnrykrflkamqkeevtaeniasfgiaesdlpqki idlisgnahgkdvdafirltvddmladterrikrfkddrksirsadnkmkgkrgfkqistg kladflakdivlfqpsvndngenkitglnyrimgsaiavydsqddyakqgfkmlfekarl igkgttephpflykvfvsipanavdferlylierkfyilglsneikkgnrvdvpfirrd qnkwktpamktlgriyessedlpvelprgmfdneikshlkslpqmegidfnanvtyliaey mkrvlnddfgtqfygwkrnyrymdmlrgeydrkgsqslqscftsveereglwkerasrtery klasnkirsnrqmrnasseeietildkrlsnrneyqksekvirryrvqdallflakkt lteladfdgerfklkeimpdaekgilseimpmsftfekggkkytitsegmklknygdffv lasdkrignllevgsdvtvskedimeefkkydqcrpeissivfnlekwaftypelsarv dreekvdfksilkillnnkninkeqsdilrkirnafdhnnypdkgvveiralpeiainsik kafgeyaimk	30
プレボテラ属種 (<i>Prevotella</i> sp.) P5-125 (NZ_JXQL01000055.1) >WP_044065294.1	mnipalvenqkkyfgtysvmamlnaqtvlhdhigkvadiegeqnennenlwfhpvmshlyn akngydkqpektmfiierlqsyfplkimaengreysngkyqnrvevnnsndifevlkra fgvlkmyrdltnhyktyeeklndgcefltsteqplsgminnyytvalrnmnergygktd lafiqdkrfkfvkdaygkksqvtngfllslqdyngdtqkklhlsqvgiallicfldkq yiniflsrlpifssynaqseerriiirsfginsikgpkdrihseksnksvamdmlnevr cpdelftttsaekqsrfrriisdhnevlmkrssdrfvp1llqyidygklfdhirfhvnm klryllkadktcidgqtrvrvieqplngfgrleeeatmrkqengtfgnsgirirdfenmk rddanpanyyivdythyilennkvemfindkedsap1lpvieddryvvtipscrmst leipamafhmflfgskkteklidvhnrykrflqamqkeevtaeniasfgiaesdlpqki ldlisgnahgkdvdafirltvddmltdterrikrfkddrksirsadnkmkgkrgfkqistg kladflakdivlfqpsvndngenkitglnyrimgsaiavydsqddyakqgfkmlfekarl igkgttephpflykvfarsipanavefyerylierkfyilglsneikkgnrvdvpfirrd qnkwktpamktlgriyessedlpvelprgmfdneikshlkslpqmegidfnanvtyliaey mkrvlnddfgtqfygwkrnyrymdmlrgeydrkgsqslqhcftsveereglwkerasrtery kqasnkirsnrqmrnasseeietildkrlsnrneyqksekvirryrvqdallflakkt lteladfdgerfklkeimpdaekgilseimpmsftfekggkkytitsegmklknygdffv lasdkrignllevgsdivvskedimeefnkkydqcrpeissivfnlekwaftypelsarv dreekvdfksilkillnnkninkeqsdilrkirnafdhnnypdkgvveikalpeiainsik kafgeyaimk	40

プレボテラ属種 (Prevotella sp.) P5-119 (NZ_JXQK01000043.1) >WP_042518169.1	mnipalvengkkyfgytysvmamlnaqtvldhiqkvadiegeqnennenlwfhpvmshlyn akngydkqpektmfieriqlsqsyfplkimaenqgreysngkykqnrvevnsndifevlkra fgvlkmyrdltnhyktyeeklidgcefltsteqplsgmiskyytvalrntkerygykted lafiqdnikkittkdaygkrksqvntgfflslqdyngdtqkklhlsgvgialliclflldkq yini flsr l pifssyna qseerrii r sfginsiklpkdrihseksnksvmdmlnevr cpdel ftt lsaekqsrfrriisddhnevlmkrstdrfvp lllqyidgklrfdhirfwhnm klryllkadktcidgqtrvrvieqplngfgrleeaetmrkqengtfgnsgirirdfenvk rddanpanypyivdythyilennkvemfisdkgssaplpllieddrvyvktipsrsmst leipamafhmflfsgskkteklivdvhnrykrlfqamqkeevtaeniasfgiaesdlpqki ldlisgnahgkdvdafirltvddmltdterrikrfkddrksirsadnkmgrkgfkgistg kladflakdivlfqpsvndgenkitglnyrimqsaiavydsqddyeakqqfklmfekarl igkgttephpflykvfarsipanavdfyerylierkfyltqlcneikgrnrvdvpfirrd qnkwkt pamt l g r i y s e d l p v e l p r q m f d n e i k s h l k s l p m q e g d i f n n a n v t l i a e y mkrvlnddfqtgyqwrnyhydmmlkgeydrkgsqhqfcsveeregkwkerastreryr klaskirsnrqmrnasseeietildkrlsnrcneyksekvirrvqdallflakkt lteladfdgerfklkeimpdaekgilseimpsftfegkgkkytitsegmklknygdffv lasdkrignl l e l v g s d i v s k e d i m e e f n k y d q r c p e i s s i v f n l e k w a f d n l k y s a r v dreekvdfksilkilnnkninkegsdilirkirnafdhnnypdkgiveikalpeiamsik kafgeyaimk	10
キャプノサイトファーガ ・カニモルサス (Capnocytophaga canimorsus) Cc5 (NC_015846.1) >WP_013997271.1	mknigrqlgknefsfpfkkedkfyfggflnannniedffkeiitrfgivitdenkkpket fgekilneifkdkdisivdyekwvni fadyfptkylslyleemqfknrvicfrdvmkell ktvealnrfythydhepikiedrvfyfldkvllldvsltvknkylktdkteflnqhigee lkelckqrkdylvgkgkridkeseiingiyynafkdfickrekqddkenhnsvekilcnk epqnkkqkssatvwelcsksssskyteksfpnrendkhclevpisqkgivflsfflnkge iyaltsnikgfkakitkeepvtydknsiry mathrmfslaykqlkrki rtseinyndeg qasstye ket l m l q m l d e l n k v p d v y q n l s e d v q k t f i e d w n e y l k e n n g d v g t m e e e q vihpvirkryedkfnyfairfldefaqfptlrfqvhlgnyldckrtkqicdtttterevkk kitvfgrl selenekkaiflnereiek gwefpnp sydfpkenisvnykdfpivgsildre kqpvsnkigirvkiadelgreidkaikkeklrnpknrkanqdekqkerlvneivstnsne qgepvvfigqptaylsmndihsvlyeflinkisgealetkivekietqikqiigkdattk ilkpytnansnsinrekllrdeleqeqgilkltlleeqqgrekdkdkkskrkshelypsek kvavwlandikrfmpkafkeqwgryhshllqkylayyeqskeelknllpkevfkhfpfkl kgyfqqylnqfytydyllkrslsyvne l l n i q n f k n d k d a l k a t e k e c f k f f r k q n y i i n piniqisilvypiflkrfgldkptmidrekfkenkdteadwfmyhkykednyqkfy ayplekveekfkrnkqinkqkndvytlmmveyiigkifgdkfveenplvlkgifqsk aerqqnthaattqernl ngilnqpkdikigkitvkgvklkdignfrkyeidqrvntfl dyepkrkewmaylpndwkekekgqqlppnnvidrgiskyetvrsklkldvgelekiisde ikeehrhdlkqgkyynfkyyilngllrqlknenvenykvfklntnpekvnitqlkqeatd leqkafvltiyirnkfhannlpkkefwdycekygkieeketyaeyfaevfkrekealik	20
フェオダクチリバクター ・キシアメネンシス (Phaeodactylibacter xiamenensis) (NZ_JPOS01000018.1) >WP_044218239.1	mtntpkrrtlhrhpsyfgaflniarhnafmimehlstkymedkntldaeqlpnaklfgc lkkrygkpdvtegvsrldrryfpflnyplflhlekqgnaeqaatyindpedieftlkqgff rllnqmrnnyshyisntdygkfdklpvqdiyaai frll drgkhtkrfdvfeskhtrhle snseyrpsrlansphentvafvtclflerkyafpflsrldcfrstndaaegdplirka shcetymfccrlpqpkllessdilldmvnelgrcpsalynllseedqarfhi kreieitgfe edpdeeleqeivlkrhsdrfpfyfalryfddteafqt l r f d v y l g r w r t k p v y k r i y g q e rdrvltqstirtftrlsrllpiyenvkhdavrqneedgklvnpdvtsqfhkswiqiesddr aflsdrie h f s p h n f g d q v i g l k f i n p d r y a a i q n v f p k l p q e e k k d k d a k l n e t a d a iistheirslf lyhyskkipisagder r f i q v d t e t f i k q y i d t i k l f f e d i k s g e l q p i adppnyqkneplpyvrgdkektqeeragyrerqkeikerrkelntllqnryglisqiypis rlreyllygkkyvpyekalqlakraqkevkkrikdiekmrtprvgeqatwlaedivfltp pkmhtperkttkhpgklndqfrimqsslayfsvnkkaikkffqketgkldglsnretshpf lyridvgrcrgildfytygylkykmdwlddaikkvdnrkhgkkaekykykylpssiqhkt l el d y t r l p v y l p r g l f k k a i v k a l a a h a d f q v e p e e d n v i f e l d q l l d g d t q d f y n w q r yyrsalteketdnqlvlahpyaeqilgtiktlegkqknnklgnkakqikdelidlkakr rllldre q y l r a v q a e d r a l w l m i q e r q k q a e h e e i a f d q l d l k n i t k i l t e s i d a r l r ipdtkvditdklplrrygdrrrvakdrllvnlasyyhvavglseipydlvkkeleeydr vaftehvyqfekevydryaaelrnenpkgesty fshweyavavkhsadthfnelfkekv mqlrnkfhnhpefyfdwllpevekasaalyadr v f d v a e g y y q k m r k l m r q	30
ポルフィロモナス・ジン ジバリス (Porphyromonas gingivalis) W83 (NC_002950.2) >WP_005873511.1	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrkfgkklneelskqsl cdhllsvdrwtkvgyhsrrylpflhyf d p d s q i e k d h d s k t g v p d s a g r l i r e l y s l l d flrndfshnrl d g t t f e h l e v s p d i s s f i t g t y s l a c g r a q s r f a d f f k p d d f l a k n r k eqlisvadgkecltvsgla f i c l f l d r e q a s g m l s r i r g f k r t d e n w a r a v h e t f d c l c irhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqfklpaldensmnns lneesrllwdgssdwaeealtkrirhqdrfpylmlrfieemdlkgirfvldgeiel d s y skkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasyprfslfapryaiydnk igychtsdpvypksktgekralsnpqsmgfisvhnrlkl llmellcegsfqrmsqsdflrk anrildetaegklqfalsfpmrhrfippqnpkskdrrekaettlekqfsgkrkdldkln sqllsafdmnqrqlpsrll dewmnirpashsvklrtvykqlnedcrlrlrkfrkdgdgka raiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrs laqyagennrrqfraiva lhll dpssghpflsatmetahrytedfykcylekkrewlaktfyrpeqdentkrrisvff vpdgearkllplllirrmkeqndldqwirnkqahpidlpshlfdskimellkvdkgkkw neafkdwwstkydpdgmfpfyglrrlnihgksvsiyipsdgkfkadcythlmevtvqdkkr elrtagkpvpdpdaadikrsfhravnerefmrlrvqeddrllmlmainkmmtdreedilpg lknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatiekskrkdwskskrkdwskyrydr rvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikf dwafalegaimsdrlkpylhesssr egksgehstlvkmlvekkgc l t p d e s q y l i l i r n k a a h n q f p c a a e m p l i y r d s a k v g s iegssakdlpegsslvds l w k k y e m i r k i l p i l d p e n r f f g k l l n n m s q p i n d l	40

ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i>) F0570 (NZ_KI259168.1) >WP_021665475.1	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneslkgsl1 cdhllsvdrwtkvgyhsrryrlpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpsaqrlirelyslld flrnfdfshnrlldgttfehlevspdisssfitgtyslacgraqsrfadffkpdffvlaknrk eqlisvadgkecltvsglaafficldfregasgmlsrirgfkrtnenwaravhetfcdlc irhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnnlsens lneesrllwdgssdwaeealtkrirhqdrfpylmlrfieemdlkgirfrvdlgeieldsy skkvgrngeydrtditdhalaafgklsdfqneeevsrmisgeasyprfslfapryaiydnk igychtsdpvypksktgekralsnpqsmgfsisvhdrlkl1llmellcegsfsmqsgflrk anrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettleykyqekrkdkl sqllsafdmnqrqlpsrllidewmnirpashsvklrtyvqqlnedcrlrlrkfrkdgdgka raiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrsraqyageenrrqfraivae lhllpssghpflsatmetahrytedfykylekkrewlaktfyrpeqdentkrrisvff vpdgearkl1p1l1rrrmkeqndlgdwirnkqahpidlpshlfdskimellkvkdgkww neafkdwwstkydpqmqpfyglrrlnihgksvsiyipsdgkfkfadcythlmeaktvqdkkr elrtagkpvpdpdaadikrsfhravnerefmrlrvqeddrllmlmainkmtdreedilpg lknidsildkenqfslavhakvlekegeggdnlslvpatieikskrkdwskyrirydr rvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalegaimsdrldkpylhesssr egksgehstlvkmlvekkgccltpdesqylilirnkaahngfpcaaempliydrvsakvgs iegssakdlpegsslvds1wkkkyemiirkilpildhenrffgkl1nnmsqpindl	10
ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i>) ATCC 33277 (NC_010729.1) >WP_012458151.1	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneslkgsl1 cdhllsvdrwtkvgyhsrryrlpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpsaqrlirelyslld flrnfdfshnrlldgttfehlevspdisssfitgtyslacgraqsrfavffkpdffvlaknrk eqlisvadgkecltvsglaafficldfregasgmlsrirgfkrtndenwaravhetfcdlc irhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnnlsens ldeesrllwdgssdwaeealtkrirhqdrfpylmlrfieemdlkgirfrvdlgeieldsy skkvgrngeydrtditdhalaafgklsdfqneeevsrmisgeasyprfslfapryaiydnk igychtsdpvypksktgekralsnpqsmgfsisvhdrlkl1llmellcegsfsmqsgflrk anrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettleykyqekrkdkl sqllsafdmnqrqlpsrllidewmnirpashsvklrtyvqqlnedcrlrlrkfrkdgdgka raiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrsraqyageenrrqfraivae lrllpssghpflsatmetahrytegykylekkrewlaktfyrpeqdentkrrisvff vpdgearkl1p1l1rrrmkeqndlgdwirnkqahpidlpshlfdskvmellkvkdgkww neafkdwwstkydpqmqpfyglrrlnihgksvsiyipsdgkfkfadcythlmeaktvrdkkr elrtagkpvpdpdaadikrsfhravnerefmrlrvqeddrllmlmainkmtdreedilpg lknidsildeeqfslavhakvlekegeggdnlslvpatieikskrkdwskyrirydr rvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalegaimsdrldkpylhesssr egksgehstlvkmlvekkgccltpdesqylilirnkaahngfpcaaempliydrvsakvgs iegssakdlpegsslvds1wkkkyemiirkilpildpenrffgkl1nnmsqpindl	20
ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i>) F0185 (AWVC01000122.1) >ERJ81987.1	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneslkgsl1 cdhllsvdrwtkvgyhsrryrlpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpsaqrlirelyslld flrnfdfshnrlldgttfehlevspdisssfitgtyslacgraqsrfadffkpdffvlaknrk eqlisvadgkecltvsglaafficldfregasgmlsrirgfkrtndenwaravhetfcdlc irhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnnlsens lneesrllwdgssdwaeealtkrirhqdrfpylmlrfieemdlkgirfrvdlgeieldsy skkvgrngeydrtditdhalaafgklsdfqneeevsrmisgeasyprfslfapryaiydnk igychtsdpvypksktgekralsnpqsmgfsisvhdrlkl1llmellcegsfsmqsgflrk anrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettleykyqekrkdkl sqllsafdmnqrqlpsrllidewmnirpashsvklrtyvqqlnedcrlrlrkfrkdgdgka raiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrsraqyageenrrqfraivae lhllpssghpflsatmetahrytedfykylekkrewlaktfyrpeqdentkrrisvff vpdgearkl1p1l1rrrmkeqndlgdwirnkqahpidlpshlfdskimellkvkdgkww neafkdwwstkydpqmqpfyglrrlnihgksvsiyipsdgkfkfadcythlmeaktvqdkkr elrtagkpvpdpdaadikrsfhravnerefmrlrvqeddrllmlmainkmtdreedilpg lknidsildeeqfslavhakvlekegeggdnlslvpatieikskrkdwskyrirydr rvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalegaimsdrldkpylhesssr egksgehstlvkmlvekkgccltpdesqylilirnkaahngfpcaaempliydrvsakvgs iegssakdlpegsslvds1wkkkyemiirkilpildhenrffgkl1nnmsqpindl	30
ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i>) F0185 (NZ_KI259960.1) >WP_021677657.1	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneslkgsl1 cdhllsvdrwtkvgyhsrryrlpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpsaqrlirelyslld flrnfdfshnrlldgttfehlevspdisssfitgtyslacgraqsrfadffkpdffvlaknrk eqlisvadgkecltvsglaafficldfregasgmlsrirgfkrtndenwaravhetfcdlc irhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnnlsens lneesrllwdgssdwaeealtkrirhqdrfpylmlrfieemdlkgirfrvdlgeieldsy skkvgrngeydrtditdhalaafgklsdfqneeevsrmisgeasyprfslfapryaiydnk igychtsdpvypksktgekralsnpqsmgfsisvhdrlkl1llmellcegsfsmqsgflrk anrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettleykyqekrkdkl sqllsafdmnqrqlpsrllidewmnirpashsvklrtyvqqlnedcrlrlrkfrkdgdgka raiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrsraqyageenrrqfraivae lhllpssghpflsatmetahrytedfykylekkrewlaktfyrpeqdentkrrisvff vpdgearkl1p1l1rrrmkeqndlgdwirnkqahpidlpshlfdskimellkvkdgkww neafkdwwstkydpqmqpfyglrrlnihgksvsiyipsdgkfkfadcythlmeaktvqdkkr elrtagkpvpdpdaadikrsfhravnerefmrlrvqeddrllmlmainkmtdreedilpg lknidsildeeqfslavhakvlekegeggdnlslvpatieikskrkdwskyrirydr rvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalegaimsdrldkpylhesssr egksgehstlvkmlvekkgccltpdesqylilirnkaahngfpcaaempliydrvsakvgs iegssakdlpegsslvds1wkkkyemiirkilpildhenrffgkl1nnmsqpindl	40

ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) SJD2 (NZ_KI629875.1) >WP_023846767.1	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrkifgkklneeskqsl1 cdhllsvdrwtkvgyhsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpsaqrlirelysll flrndfshnrldgttfehlevspdissfitgtyslacgraqsrfadffkpdffvlaknrk eqlisvadgkecltvsglaafficfldreqasgmlsrirgfkrtndenwaravhetfcdlc irhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnlsens lneesrllwdgssdwaeealtkrirhqdrfpylmlrfeemdlkgirfrvdlgeieldsy skkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasyprvrfslfapryaiydnk igychtsdpvypkstkgekralsnprsmgfsivhldrklillmellcegsfsmrqsdfllrk anrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekkykeikgrkdkln sqllsafdmnqrqlpsrllldewmnirpashsvklrtyvqqlnedcrlrlrkfrkdgdgka raiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrsraqyageenrrqfiraivae lhlldpssghpflsatmetahrytedfykcytlekkrewlaktfyrpeqdentkrrisvff vpdgearklplllirrmkeqndlgdwirnkqahpidlpshlfdskimellkvkdgkklk neafkdwstkydpqmqpfyglrrrelnihgksvsiyipsdgkfkadcythlmeaktvdkkr elrtagkpvpdpdaadikrsfhravnerefmrlrlvqeddrmlmainkmtreedilpg lknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieiekskrkdwskyirrydr rvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalegaidsrdlkyphlessr egksgehstlvkmlvekkgccltpdesqylilirnkaahnqfpcaaemplyrdsavkvg iegssakdlpegsslvdsllwkyemiirkilpildpenrffgkllnnmsqpindl	10
ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) F0568 (AWUU01000145.1) >ERJ65637.1	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrkifgkklneeskqsl1 cdhllsvdrwtkvgyhsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpsaqrlirelysll flrndfshnrldgttfehlevspdissfitgtyslacgraqsrfadffkpdffvlaknrk eqlisvadgkecltvsglaafficfldreqasgmlsrirgfkrtndenwaravhetfcdlc irhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnlsens lneesrllwdgssdwaeealtkrirhqdrfpylmlrfeemdlkgirfrvdlgeieldsy skkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasyprvrfslfapryaiydnk igychtsdpvypkstkgekralsnprsmgfsivhldrklillmellcegsfsmrqsdfllrk anrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekkykeikgrkdkln sqllsafdmnqrqlpsrllldewmnirpashsvklrtyvqqlnedcrlrlrkfrkdgdgka raiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrsraqyageenrrqfiraivae lhlldpssghpflsatmetahrytedfykcytlekkrewlaktfyrpeqdentkrrisvff vpdgearklplllirrmkeqndlgdwirnkqahpidlpshlfdskimellkvkdgkklk neafkdwstkydpqmqpfyglrrrelnihgksvsiyipsdgkfkadcythlmeaktvdkkr elrtagkpvpdpdaadikrsfhravnerefmrlrlvqeddrmlmainkmtreedilpg lknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieiekskrkdwskyirrydr rvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalegaidsrdlkyphlessr egksgehstlvkmlvekkgccltpdesqylilirnkaahnqfpcaaemplyrdsavkvg iegssakdlpegsslvdsllwkyemiirkilpildpenrffgkllnnmsqpindl	20
ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) W4087 (AWVE01000130.1) >ERJ87335.1	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrkifgkklneeskqsl1 cdhllsvdrwtkvgyhsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpsaqrlirelysll flrndfshnrldgttfehlevspdissfitgtyslacgraqsrfadffkpdffvlaknrk eqlisvadgkecltvsglaafficfldreqasgmlsrirgfkrtndenwaravhetfcdlc irhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnlsens lneesrllwdgssdwaeealtkrirhqdrfpylmlrfeemdlkgirfrvdlgeieldsy skkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasyprvrfslfapryaiydnk igychtsdpvypkstkgekralsnprsmgfsivhldrklillmellcegsfsmrqsdfllrk anrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekkykeikgrkdkln sqllsafdmnqrqlpsrllldewmnirpashsvklrtyvqqlnedcrlrlrkfrkdgdgka raiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrsraqyageenrrqfiraivae lhlldpssghpflsatmetahrytedfykcytlekkrewlaktfyrpeqdentkrrisvff vpdgearklplllirrmkeqndlgdwirnkqahpidlpshlfdskimellkvkdgkklk neafkdwstkydpqmqpfyglrrrelnihgksvsiyipsdgkfkadcythlmeaktvdkkr elrtagkpvpdpdaayikrsfhravnerefmrlrlvqeddrmlmainkmtreedilpg lknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieiekskrkdwskyirrydr rvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalegaidsrdlkyphlessr egksgehstlvkmlvekkgccltpdesqylilirnkaahnqfpcaaemplyrdsavkvg iegssakdlpegsslvdsllwkyemiirkilpildpenrffgkllnnmsqpindl	30
ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) W4087 (NZ_KI260263.1) >WP_021680012.1	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrkifgkklneeskqsl1 cdhllsvdrwtkvgyhsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvdpsaqrlirelysll flrndfshnrldgttfehlevspdissfitgtyslacgraqsrfadffkpdffvlaknrk eqlisvadgkecltvsglaafficfldreqasgmlsrirgfkrtndenwaravhetfcdlc irhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeeraqflpaldensmnlsens lneesrllwdgssdwaeealtkrirhqdrfpylmlrfeemdlkgirfrvdlgeieldsy skkvgrngeydrtitdhalafgklsdfqneeevsrmisgeasyprvrfslfapryaiydnk igychtsdpvypkstkgekralsnprsmgfsivhldrklillmellcegsfsmrqsdfllrk anrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekkykeikgrkdkln sqllsafdmnqrqlpsrllldewmnirpashsvklrtyvqqlnedcrlrlrkfrkdgdgka raiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrsraqyageenrrqfiraivae lhlldpssghpflsatmetahrytedfykcytlekkrewlaktfyrpeqdentkrrisvff vpdgearklplllirrmkeqndlgdwirnkqahpidlpshlfdskimellkvkdgkklk neafkdwstkydpqmqpfyglrrrelnihgksvsiyipsdgkfkadcythlmeaktvdkkr elrtagkpvpdpdaayikrsfhravnerefmrlrlvqeddrmlmainkmtreedilpg lknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnslslvpatieiekskrkdwskyirrydr rvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalegaidsrdlkyphlessr egksgehstlvkmlvekkgccltpdesqylilirnkaahnqfpcaaemplyrdsavkvg iegssakdlpegsslvdsllwkyemiirkilpildpenrffgkllnnmsqpindl	40

ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) F0568 (NZ_KI258981.1) >WP_021663197.1	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneslkqsll cdhllsvdrwtkvgyhsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvpdsaqrlirelysll flrndfshnrlldgttfehlevspdisfitgtyslacgraqsrfadffkpdffvlaknrk eqlisvadgkecltvsglaafficflfdreqasgmlsrirgfkrtndenwaravhetfcdlc irhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeraqflpaldensmnnlsens lneesrllwdgssdwaaltkrirhqdrfpylmlrfieemdlkgrifrvdlgeielydsy skkvgrngeydrtditdhalafgklsdfqneeevsmisgeasyprvrsfapryaiydnk igychtsdpvypksktgekralsnprsmgffisvhdrlrlllmellcegsfsmqsdflrk anrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekkykqeiagrkdln sqllsafmdqrqlpsrllldewmnirpashsvklrtyvklqnedcrlrlrkfrkdgdgka raiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrsraqyageenrhqfiraivae lrlldpssghpflsatmetahrytedfykcytlekkrewlaktfyrpeqdentkrrisvff vpdgearkllppllrmmkeqndldqwirnkqahpidlpshlfdskimellkvkdgkww neafkdwstkydpqgmppfyglrrrelnihgksvsiyipsdgkffadcythlmeaktvqdkkr elrtagkpvpdpdaadikrsfhravnerefmlrlvqeddrmlmainkmmtdreedilpg lknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnlslvpatieiekskrkdwskyirrydr rvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalegaimsdrrdkpilhesssr egksgehstlvkmlvekkgccltpdesqylilirnkaahngfpcaaeempliyrdvsakvgs iegssakdlpegsslvdsllwkyemiirkilpildpenrffgkllnnmsqindl	10
ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) (NZ_LOEL01000010.1) >WP_061156637.1	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneslkqsll cdhllsvdrwtkvgyhsrrylpflhyfdpdsqiekdhdsktgvpdsaqrlirelysll flrndfshnrlldgttfehlevspdisfitgtyslacgraqsrfadffkpdffvlaknrk eqlisvadgkecltvsglaafficflfdreqasgmlsrirgfkrtndenwaravhetfcdlc irhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeraqflpaldensmnnlsens lneesrllwdgssdwaaltkrirhqdrfpylmlrfieemdlkgrifrvdlgeielydsy skkvgrngeydrtditdhalafgklsdfqneeevsmisgeasyprvrsfapryaiydnk igychtsdpvypksktgekralsnprsmgffisvhdrlrlllmellcegsfsmqsdflrk anrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekkykqeiagrkdln sqllsafdmnqrqlpsrllldewmnirpashsvklrtyvklqnedcrlrlrkfrkdgdgka raiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrsraqyageenrhqfiraivae lhlldpssghpflsatmetahrytedfykcytlekkrewlaktfyrpeqdentkrrisvff vpdgearkllppllrmmkeqndldqwirnkqahpidlpshlfdskimellkvkdgkww neafkdwstkydpqgmppfyglrrrelnihgksvsiyipsdgkffadcythlmeaktvqdkkr elrtagkpvpdpdaadikrsfhravnerefmlrlvqeddrmlmainkmmtdreedilpg lknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnlslvpatieiekskrkdwskyirrydr rvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalegaimsdrrdkpilhesssr egksgehstlvkmlvekkgccltpdesqylilirnkaahngfpcaaeempliyrdvsakvgs iegssakdlpegsslvdsllwkyemiirkilpildpenrffgkllnnmsqindl	20
ポルフィロモナス・グラ エ(<i>Porphyromonas gulae</i>) (NZ_JRAQ01000019.1) >WP_039445055.1	mntvpasenkgqsrtveddpqyfglylnlarenlieveshvrikfgkkklneslkqsll cdhllsidrwtkvgyhsrrylpflhcfdpdsqiekdhdsktgvpdsaqrlirelysll flrndfshnrlldgttfehlevspdisfitgaytfaceraqsrfadffkpdffllaknrk eqlisvadgkecltvsglaafficflfdreqasgmlsrirgfkrtndenwaravhetfcdlc irhphdrlessntkeallldmlnelnrcprilydmlpeeraqflpaldensmnnlsens lneesrllwdgssdwaaltkrirhqdrfpylmlrfieemdlkgrifrvdlgeielydsy skkvgrngeydrtditdhalafgklsdfqneeevsmisgeasyprvrsfapryaiydnk igychtsdpvypksktgekralsnprsmgffisvhdrlrlllmellcegsfsmqsdflrk anrildetaegklqfsalfpemrhrfippqnpkskdrrekaettlekkykqeiagrkdln sqllsafdmnqrqlpsrllldewmnirpashsvklrtyvklqnedcrlrlrkfrkdgdgka raiplvgematflsqdivrmiiseetkklitsayynemqrsraqyageenrhqfiraivae lhlldpssghpflsatmetahrytedfykcytlekkrewlaktfyrpeqdentkrrisvff vpdgearkllppllrmmkeqndldqwirnkqahpidlpshlfdskimellkvkdgkww neafkdwstkydpqgmppfyglrrrelnihgksvsiyipsdgkffadcythlmeaktvrdkkr elrtagkpvpdpdaayikrsfhravnerefmlrlvqeddrmlmainkmmtdreedilpg lknidsildeenqfslavhakvlekegeggdnlslvpatieiekskrkdwskyirrydr rvpglmshfpehkatldevktllgeydrcrikifdwafalegaimsdrrdkpilhesssr egksgehstlvkmlvekkgccltpdesqylilirnkaahngfpcaaeempliyrdvsakvgs iegssakdlpegsslvdsllwkyemiirkilpildhenrffgkllnnmsqindl	30
バクテロイデス・ピオゲ ネス(<i>Bacteroides pyogenes</i>) F0041 (KE993153.1) >ERI81700.1	mesiknsqkstgkltqkdpqyfglylnmallnvrkvenhirkwlgdvallepksqghsll ttndlssakwttrfyyskrkflpflflemfddsksyenrrettedcltdirkqissllkeyv gklqdirnafshyiddqsvkhtaliissehrfienaysfalqktrarfgtgvfvetdfl qaeekgdnkfffaiagnegiklkdnalifliclfdreeafkflsratgfkstkekgfla vretfcalccrqphehlslsvnprealldmlnelnrcpdilfemldekdgksflpilgee eqahilenslndkceaidpfeiaslskrvryknrfpylmlryieeknlplfirfrid lgclelasypkmggeennysvtdhamafgrltdfhnedavlgqitkgitdevrfsly pryaiynnkgifvrtggskisfptlkkkggeghevaytlqntksfgfisiydlrkilll sflkdakaknivsglleqcekhwdlslenlfdairtelqgefvpplirylprskggklv sskladkqekyeseferreklteilsekdfldsqiprrmidewlnlvpstsekkkgyv etlkldcrrlrvfekrekeghpvprrigematdldakdiirmvldggyvkgqritsaysei qrclaqyagddnrrhldsiirelrlkdtknghpflgkvlrpglghteklyqryfeekkw leatfypaaspkrvprfvnpptgkqkelpliirnlmkerpewrdwqkrknshpidpsq feneicrllkdkigkepsgklkwnemfklywdkefngmqrfrckrrvevfdkvveyey seeggnkykyaalidevvrqkissseksklqvedltlsvrrvfkrainekvyqlrlc eddrllfmavrdlydweaqldldkidnmlgepvsvsqvileggqpavikaeklkdv sklmrycydgrvkgllmpyfanheatqevemelrhayedhrrrvfnwvfaleksvlknekl rrfyeesqggcehrrcidalrkaslvseeeyeflvhirnksahngfpdleiqlppnvt gfceciwskykaiicriipfidperrffgkllleqk	40

バクテロイデス・ピオゲ ネス(Bacteroides pyogenes) JCM 10003 (NZ_BAIU01000001.1) >WP_034542281.1	mesiknsqkstgkltqkdpypfgylnmallnvrkvenhirkwlgdvallepksqgfhsl1 ttdnlssakwtrfyyksrkflpflemfssdkksyenrretaecldtidrgklissllkevy gklqdirnafshyhiddqsvkhtaliissemhrfienaysfalqktrarftgvfvetdfl qaeekgdnkfkffaiaggneqiklkdnalifliclfdreeafkflsratgfkstkeqgfla vretfcalccrqpheerllsvnprealmdmlnelnrcpdilfemldekdqksflpllgce eqahilenslndelceaidpffemiaslskrvryknrfpylmlyreeknllpfrid lgclelasypkkmgeennysvtdhamafrltdfhnedavlqqitkgitdevrfslya pryaiynnkgifvrtsgsdksifptlkkkgggeghevaytlqntksfgfisiydlrkilll sflkdakknivsgllqcekhkwkdlsefldairtelqkefpvplirytprskggklv sskladkgekyeseferrrkeklteilesekdfldsqiprrmidewlnvlpstrekklkgyv etlkldcrrerlrvfekregheplprigematdlakdiirmvidqgvkqritsasysei qrclaqyagddnrrhldsiirelrlkdtknghpflgkvlrpglghteklyqryfeekew leatfypaaspkrvprfvnpptgkqkelpliirnlmkerpewrdwqgrknsdpidpsql feneicrllkdkigkepsgklkwnemfklywdkefngmqrfyrckrrvevfdkvveyey seeggnykkyealidevvrqkissseksklqvedltlsvrrvfkrainekeyqlrlc eddrllfmavrdlydwkeaqldldkidnmlgepvsvsqviqlegggqpavikaekklkv sklmrycydgrvklmpyfanheatqeqvemelrhyledhrrrvfwfaleksvlnkekl rrfyeesqgggcehrrcidalrkaslvseeeyflvhirnsahnqfpdleigklppnvt gfceciwskykaiicriipfidperrffgklleqk	10
アリスティペス属種 (Alistipes sp.) ZOR0009 (NZ_JTLD01000029.1) >WP_047447901.1	msneigafrehqfayapgnekqeeatfatyfnlalsnvegmfmgevesnppdkieksldtl ppailrqiasfiwlskedhpdkaysteekvviatdlvrrlcfyrnyfshcfltdtqfys delvdttaigeklpynfhfhitnrlfryslopeitlfrwnegerkyeirlrdgliffccfl krqqaerflnelrffkrtdeegrikrtiftkyctreshkhigieeqdflifqdiigdlr vpkvcgdgvvldskenerikyknretsnedenkaryrllirekdkfpyyalmryivdvgvlp citfkqndystkqgrgqfhyqdaavaqeercynfvvrngnvysypqmqnrvfiselqg tisveelnrmvyasingkdvnksveqylyhlhlyekiltisggtikegrvdedyrp11 dklllrpasngeelrrelrklpkrvcdllsnrfdcsegvsavekrkailrlheqllls qnpalhidkiksvidylylffsddekfrqgqtekahrglkdeefqmhyhylvdydshpla lwkeleasgrlkipemrktsatslhglymlclkgvtewcrkqlmsigkgtaekveaiadr gklydklkeytpeqlerevklvmhgyaaaatpkpkaqaaiapskltelrfysflgkrem sfaafirgdkkaqklwlrnfyteniktqkrqaaadaackklynlvgeevervhtndkv vlvagryrerllnvgskcavtldnperqgkladvvevqnaulsirfddldflthvln lrkaynliprkhilafkeyldnrkvqklceecrnvrkedlctccsprysnltswlkenh sessiereaatmmldverklslflderrkaiieygfkipfsalvkecrladaglcgir ndvlhdnvisyadaigklsayfpkeaseaveyirrtkevreqrreelmanssq	20
フラボバクテリウム・ブ ランキオフィルム (Flavobacterium branchiophilum) FL-15 (NC_016001.1) >WP_014084666.1	menlnkildkenelciskifntkgiaapitekaldnikskqkndlnkearlhyfshsf kqidtkkvfdyvlleelkdekplkfitlqkdfftkfsiklqklinsirnnhynhnfn dinlnkidsnvfhflkesfelaiiekykvnkkypldneiylfklfikdentallnyf tnlskdeaieyiltftitenkiwinnehnlniekgykyltfeamlflitifykneanh llpklydfknkskqelftffskkftsqdidaeehlikfrdmqylnhyptawnndkl esenknkimttklidsiiefelnynpsfatdiqfkeakafllasnkrnqtsfnsksy neeirhnphikqydeiasaltpisfnvkedkfkifvkkhveeypnsigyekfleynd ftekededfglkllysnpntknlieridnhklvksghrnqdrfmdfsmrflaennyfgkda ffkcykfydtqeqdeqlsnnenddvkfhkgkvtyikyeehlknysywdcnpfveennsm svkisigseekilkiqrnlmiyflenalynvenvenqyklvnnyyrelkkdveesiasld liknspdfkskykklipkrllhnyapakqdkapenafetllkkadfreegykllkkaeh eknkedfvkrnkqkqfklhfrkacqmmyfkekyntlkegnaafekdkpviekrnkehe fghhknlnitreefndyckwmfafngndsykkyldfsekhffdnqeykklfessvnle afyaktkelkfkkiwetnkpntnenrytlenyknlllqkqvfinvyhfskyldknl1nse nnvigiyslenveylisdfyfsklsidqyktcgklfnklksnkledcllyeaiaynidk knvhkidqkiltskiltindantpykispfnklerytemiaiknqnllkarflidlp lylsknkikkgkdsagyeiikndleiedintinnkiindsvkftevlmelekyfilkdk cilsknyidnseipslkqfskvwikeneneinyrniachfhlplletfdnlllnveqkf ikeelqnvstindlskpqeylillfikfkhnnfylnlnfnknesktikndekvknrvlqk finqvilkkk	30
プレボテラ属種 (Prevotella sp.) MA2016 (NZ_JHUW01000010.1) >WP_036929175.1	mskeckkqrqekkrllqkanfsislqkhvfqayfnmartnfvktinyilpiagvrnys enqinkmlhalfligagrneeltteeqkqwekkrlrlnpeqqtkfqlklfkfvpvlpgmmad vadhkaylnkkkstvtqtedetfamkkgvsladclidielmadtlttecrnfythkdpykn sgladqylhgemiaakklkvvasrrilkdreglsvnevefltgidhlhgevlkdefgna kvkdgkvmtkfveyddfyfiskgrlvngyvtvttkdkpvnvntmlpalsdfglyfcvl flskpyaklfidevrlfeyspfdkenmimsemisiyirirprlhkiddshdskatlami fgelrrcpmelynlldknagqpfhdevkhpnshtpdvskrlryddrfptlalryidete lfkrirfqqlqgsfrykfydkencidgrvrvrriqkeingygrmqevadkrmdkwgdlq kreersvkleheelyinldqfledtadstpyvtdrrpaynihanriglywedsqnpkqyk vfdengmyipelvtedkkapikmpaprcalsvydlpamlfyeylreqqdnefspaey ieyeddyrkffkavaegklkpfkrpkefrdflkkeypklrmdipkklqlfclshgclcy nkpetyerldrltlghleerelhiqnrlhyqkdrdmignkdnqygkksfdrvhgala rylagsmmewqptklkdkkghdktgllynvltaylatyghpqvpeegftprtlegvli nahliggsnphpfinkvvalgnrnieelyhyleeelkhirsriqlssnpsdkalsalp fihhormryhertseemallaaryyttiqlpdglftpyileilqkhytensdlqnsqdv pvklnptcnaayliltfyqtvkdnagpfylsdktytrnkdkgeaesfsfkrayelfsvl nnnkddtffemiplfltsdeigerlsaklldgdgnpvpevgekpatdsqgntiwr iysevddyaeklttdrmdkisfkgeweklprwkqdkikiirrdetrrgmrdellqrmpryir dikdnertlrryktqdmvlllaekmftniiseqssefnwqkmrlskvncneafrlqtltf rvpvtvgettiiveqenmslknygefyrfltdrlmsllnnivetlknengdlvirhtd lmselaaydqyrstifmliqsienliitnavlddpdadgfwvredlprknnfaslleli nqlnnveltdderkllvairnafshnsynidfslikdvkhlpevakgilqhlqsmglve tk	40

ミロイデス・オドラティ ミマス(Myroides odoratimimus) CCUG 10230 (AGEC02000017.1) >EHO06562.1	mkdilttdttekqnrfsyshiadkyffggyfnlasnniyevfeevnkrtfngklakrdng nlknyiihvfkdelsisdfekrvaifasyfpiletvdkksikernrtidltlsqriqqr emlisltavdqrlrnfthyhhsdivienkvldfllnssfvstalhvkdkylktddtkkefl ketiaaeldilieaykkkqiekkntfrkankredilnaiyneaafwsfindkdkdkketv vakgadayfeknhhksndpdfalnisekgivyllsffltnkemdslkanltgfgkgvdr sgnsikymatqriysfhtyrglkqkirtseegvketllmqmidelskvpnvvyghlstdtq qnsfiedwneyykyedddetdlsrvihpvirkryedrfnyfairfldeffdfptlrfq vhlgdvhdrrtkqlgkvesdriiekevtvfarlkdinsakasyfhsleeqdkeeldnkwtl tlfnpnsydfpkehtlqhggqeknagkigiyvklrdtqykekaaleearkslnpkersat kaskydiitqiieandnvkseklvftgqpiaylsmdihsmflsltdnaelkktpeev eaklidqigkqineilskdtdtkilkykndlketdtdkitrdlardkeeieklileqk qraddynytssstkfnidksrkrkhllfnaekgkigvwlndikrfmfkeskskwgyqht elqklfayfdtsksdledililsmvmvkdypielidlvksrtlvdfnlkylearleyien vitrvknsigtppqfktvrkecftflkksnytvvslkdqverilsmplfiergfmddkptm legksyqghkedfadwfvhykensnyqnfydteveyeittedkrekaqvtkkikqqqkndv ftlmmvnymlleevklssndrlslnelqytkerivnkqvaktqernknywnkvvdqlc lcdglvhdnvlkdignfrkyendsrvkefltyqsdvwsaylsnevdsnklyvierql dnyesirskellkeveiecsvynqvankeslkqsgnenfkqyvlqgllpigmdivremli lstdvkfkkeeiqlgqageveqdllysiyirnkfahnlqpikeffdfcennyrsisdne yayeymeifrsikekya	10
ミロイデス・オドラティ ミマス(Myroides odoratimimus) CCUG 3837 (AGZK01000016.1) >EKB06014.1	mkdilttdttekqnrfsyshiadkyffggyfnlasnniyevfeevnkrtfngklakrdng nlknyiihvfkdelsisdfekrvaifasyfpiletvdkksikernrtidltlsqriqqr emlisltavdqrlrnfthyhhsdivienkvldfllnsslvstalhvkdkylktddtkkefl ketiaaeldilieaykkkqiekkntfrkankredilnaiyneaafwsfindkdkdkketvva kgadayfeknhhksndpdfalnisekgivyllsffltnkemdslkanltgfgkgvdr sgnsikymatqriysfhtyrglkqkirtseegvketllmqmidelskvpnvvyghlstdtq qnsfiedwneyykyedddetdlsrvihpvirkryedrfnyfairfldeffdfptlrfq vhlgdvhdrrtkqlgkvesdriiekevtvfarlkdinsakasyfhsleeqdkeeldnkwtl tlfnpnsydfpkehtlqhggqeknagkigiyvklrdtqykekaaleearkslnpkersatka skydiitqiieandnvkseklvftgqpiaylsmdihsmflsltdnaelkktpeev eaklidqigkqineilskdtdtkilkykndlketdtdkitrdlardkeeieklileqkqr addynytssstkfnidksrkrkhllfnaekgkigvwlndikrfmfkeskskwgyqhtel qklfayfdtsksdledililsmvmvkdypielidlvksrtlvdfnlkylearleyien vitrvknsigtppqfktvrkecfaflkesnytvvasldkqierilsmplfiergfmddkptm legksyqghkedfadwfvhykensnyqnfydteveyeittedkrekaqvtkkikqqqkndvft lmmvnymlleevklpsndrlslnelqytkerivnkqvaktqernknywnkvvdqlc eglvridkvklkdignfrkyendsrvkefltyqsdvwsaylsnevdsnklyvierql dnyesirskellkeveiecsvynqvankeslkqsgnenfkqyvlqgllprgtdvremli lstdvkfkkeeiqlgqageveqdllysiyirnkfahnlqpikeffdfcennyrpisidneyy ayeymeifrsikekya	20
ミロイデス・オドラティ ミマス(Myroides odoratimimus) CCUG 3837 (NZ_JH815535.1) >WP_006265509.1	mkdilttdttekqnrfsyshiadkyffggyfnlasnniyevfeevnkrtfngklakrdng nlknyiihvfkdelsisdfekrvaifasyfpiletvdkksikernrtidltlsqriqqr emlisltavdqrlrnfthyhhsdivienkvldfllnsslvstalhvkdkylktddtkkefl ketiaaeldilieaykkkqiekkntfrkankredilnaiyneaafwsfindkdkdkketvva kgadayfeknhhksndpdfalnisekgivyllsffltnkemdslkanltgfgkgvdr sgnsikymatqriysfhtyrglkqkirtseegvketllmqmidelskvpnvvyghlstdtq qnsfiedwneyykyedddetdlsrvihpvirkryedrfnyfairfldeffdfptlrfq vhlgdvhdrrtkqlgkvesdriiekevtvfarlkdinsakasyfhsleeqdkeeldnkwtl tlfnpnsydfpkehtlqhggqeknagkigiyvklrdtqykekaaleearkslnpkersatka skydiitqiieandnvkseklvftgqpiaylsmdihsmflsltdnaelkktpeev eaklidqigkqineilskdtdtkilkykndlketdtdkitrdlardkeeieklileqkqr addynytssstkfnidksrkrkhllfnaekgkigvwlndikrfmfkeskskwgyqhtel qklfayfdtsksdledililsmvmvkdypielidlvksrtlvdfnlkylearleyien vitrvknsigtppqfktvrkecfaflkesnytvvasldkqierilsmplfiergfmddkptm legksyqghkedfadwfvhykensnyqnfydteveyeittedkrekaqvtkkikqqqkndvft lmmvnymlleevklpsndrlslnelqytkerivnkqvaktqernknywnkvvdqlc eglvridkvklkdignfrkyendsrvkefltyqsdvwsaylsnevdsnklyvierql dnyesirskellkeveiecsvynqvankeslkqsgnenfkqyvlqgllprgtdvremli lstdvkfkkeeiqlgqageveqdllysiyirnkfahnlqpikeffdfcennyrpisidneyy ayeymeifrsikekya	30
ミロイデス・オドラティ ミマス(Myroides odoratimimus) CCUG 12901 (NZ_JH590834.1) >WP_006261414.1	mkdilttdttekqnrfsyshiadkyffggyfnlasnniyevfeevnkrtfngklakrdng nlknyiihvfkdelsisdfekrvaifasyfpiletvdkksikernrtidltlsqriqqr emlisltavdqrlrnfthyhhsdivienkvldfllnsslvstalhvkdkylktddtkkefl ketiaaeldilieaykkkqiekkntfrkankredilnaiyneaafwsfindkdkdkketvva kgadayfeknhhksndpdfalnisekgivyllsffltnkemdslkanltgfgkgvdr sgnsikymatqriysfhtyrglkqkirtseegvketllmqmidelskvpnvvyghlstdtq qnsfiedwneyykyedddetdlsrvihpvirkryedrfnyfairfldeffdfptlrfq vhlgdvhdrrtkqlgkvesdriiekevtvfarlkdinsakasyfhsleeqdkeeldnkwtl tlfnpnsydfpkehtlqhggqeknagkigiyvklrdtqykekaaleearkslnpkersatka skydiitqiieandnvkseklvftgqpiaylsmdihsmflsltdnaelkktpeev eaklidqigkqineilskdtdtkilkykndlketdtdkitrdlardkeeieklileqkqr addynytssstkfnidksrkrkhllfnaekgkigvwlndikrfmfteefkskwgyqhtel qklfayfdtsksdledililsmvmvkdypielialvksrtlvdfnlkylearleyien vitrvknsigtppqfktvrkecftflkksnytvvslkdqverilsmplfiergfmddkptm legksyqghkedfadwfvhykensnyqnfydteveyeittedkrekaqvtkkikqqqkndvft lmmvnymlleevklssndrlslnelqytkerivnkqvaktqernknywnkvvdqlc eglvridkvklkdignfrkyendsrvkefltyqsdvwsaylsnevdsnklyvierql dnyesirskellkeveiecsvynqvankeslkqsgnenfkqyvlqgllpigmdivremli lstdvkfkkeeiqlgqageveqdllysiyirnkfahnlqpikeffdfcennyrsisidneyy ayeymeifrsikekys	40

ミロイデス・オドラティ ミマス(Myroides odoratimimus) CCUG 12901 (AGED01000033.1) >EHO08761.1	mkdilttdttekqnrfsyshiadkyffggynlasnniyevfeevnkrntfgklakrdng nlknyiihvfkdelsisdfekrvafasyfpiletvdkksikernrtidltlsqirirgfr emlisltvavdqlrnfthyhhsieivienkvldflnsslvstalhvkdkylktddktkefl ketiaaeldilieaykkkqiekkntrfkankredilnaiyneaafwsfindkdkdketvva kgadayfeknhhksndpfdalnisekgivylsffltnkemdsikanltgfgkgvdrresg nsikymatqriysfhtyrglkqkirtseegvketllmqmidelskvpnvvyqhlsttqgn sfiedwneyykdyeddvetddlsrvihpvirkryedrnfyrfairfldeffdfptlrfqvh lgdyvhdrtrtkqlgkvesdriikekvtvfarlkdinsakanyfhsleeqgkeeldnkwlt fpnpsydfpkehtlqhggqeqnagkigiyvklrtdtqykekaaleeearkslnpkersatka skydiitqiieandnvkseklvftgqpiaylsmdihsmfslitdnaelkktpeev klidqigkqineilskdttdtkilkykdndlketdtdkitrdlardkeeieklilegkqr addynytstskfnidksrkrkhllfnaekgkigvlandikrfmteefkskwkgqyhtel qklfayydtksdldlilsdmvmvkdypielialvkkssrtlvdflnkylearlgymenvi trvksnigtppqfktvrkecftflkksnytvvsldkqverilsmplfiergfmddkptmle gksyqqhkekfadwfvhykensnyqnfydteveyeittedkrekaakvtkkikqqgkndvft lmmvnymlleevklssndrslslnelyqtkeerivnkqvaktqernknyiwnkvvdqlc eglvridkvklkdignfrkyendsrvkefltyqsdivwsaylsnevdsnklyvierqln yesirskellkevqeiecsvynqvankeslkqsgnenfkqyvlqglpigmdivremils tdvfkieeiqlgqageveqdllysiyirnkfahnqlpikeffdfcennyrssidneyy aeyymeifrsikekyts	10
ミロイデス・オドラティ ミマス(Myroides odoratimimus) (NZ_CP013690.1) >WP_058700060.1	mkdilttdttekqnrfsyshiadkyffggynlasnniyevfeevnkrntfgklakrdng nlknyiihvfkdelsisdfekrvafasyfpiletvdkksikernrtidltlsqirirgfr emlisltvavdqlrnfthyhhsdivienkvldflnssfvstalhvkdkylktddktkefl ketiaaeldilieaykkkqiekkntrfkankredilnaiyneaafwsfindkdkdketvva kgadayfeknhhksndpfdalnisekgivylsffltnkemdsikanltgfgkgkndvdr sgnsikymatqriysfhtyrglkqkirtseegvketllmqmidelskvpnvvyqhlsttq qnsfiedwneyykdyeddvetddlsrvthpvirkryedrnfyrfairfldeffdfptlrfq vhlgdvvhdrtrtkqlgkvesdriikekvtvfarlkdinsakasyfhsleeqgkeeldnkw tlfpnpsydfpkehtlqhggqeqnagkigiyvklrtdtqykekaaleeearkslnpkersat kaskydiitqiieandnvkseklvftgqpiaylsmdihsmfslitdnaelkktpeev eaklidqigkqineilskdttdtkilkykdndlketdtdkitrdlardkeeieklilegkqr graddynytstskfnidksrkrkhllfnaekgkigvlandikrfmteskkskwkgqyhi elqklfayfdtsksdldlilsnmvmvkdypielidlvkksrtlvdflnkylearleyien vitrvksnigtppqfktvrkecftflkksnytvvsldkqverilsmplfiergfmddkptm legksyqhkekfadwfvhykensnyqnfydteveyeittedkrekaakvtkkikqqgkndv ftlmmvnymlleevklssndrslslnelyqtkeerivnkqvaktqernknyiwnkvvdqlc lcdqlvhlidnvklkdignfrkyendsrvkefltyqsdivwsaylsnevdsnklyvierql dnyesirskellkevqeiecsvynqvankeslkqsgnenfkqyvlqglpigmdivremli lstdvfkkeeiqlgqageveqdllysiyirnkfahnqlpikeffdfcennyrssidne yyaeyymeifrsikekyan	20
バージエラ・ズーヘル カム(Bergeyella zoohelcum) ATCC 43767 (AGYA01000037.1) >EKB54193.1	menktslgnniyynpfkpdqksyfyagynaamentdsvfrelgkrlkgkeytsenffdai fkenislveyeryvklldsyfpmarlldkkevpikerkenfknfkgiikavrdlnrnyf hkehgeveitdeifgvldemlktstvlvkkkkvktddktkeilkksiekqldilcqkkley lrdtarkieekrrnqrgerkelvafpkysdkrddliaaiyndafdvdydkkksdkess kakyntksdpqgeegdlkipiskngvvflslfltkgeihafkskiagfkatvideatvs eatvshgknsicfmatheifshlaykklkrkvrtaeinyseaenaeglsiyaketlmmqmdels ldelskvpdvvyqnlsevdvqktfiedwneylkenngdvgtmeeeqviphvirkyedkfn yfairfldefaqfptlrfqvhlgnylhdsrpkenlisdrrikekitvfglrselehkkal fikntetnedrehyweifpnpydfpkenisvndkdfpiagsildrekqpvagkigikvk llnqqyvvsevdkaavkahqlkqrkaskpsiqniieeivpinesnpkeaiivfggqptaylsm ndihsilyeffdkwekkkekkekkelrkeigkelekkivgkiqaiqqiiddkdnak ilkpyqdgntaidkelklipiskngvvflslfltkgeihafkskiagfkatvideatvs drnhkqylkdnldkrkypeaparkvlyyregkvavvlandikrfmptdfknewkgeqhs llqkslayyeqckeelknllpekvhqhlpfklggyfqqkylqfytycldrleisglv qqaenfksenkfvkvenecfkflkqnythkeldarvqsilgypiflergfmdekptii kgktfkgnealfadwfryykeyqnfqtfydtenyplvelekkqadrkrtkiyqqkndv ftllmakhifksvfkqdsidqfslidlyqsreerlgnqerartgerntnyiwntvdlk lcdgkitvenvklknvgdfikyeydqrvaflkyeeniewqaflikeskeeenypyvver ieeqykevrvreellkevhlieeyilekvdkelkkqdnqnfkyiylngllkqkndved sykvfnlntepedvnnlqkqeatdlegkafvltiyirnkfahnqlpkkefwdyccqkygk ieeketyaeyfaevfkkekealik	30
キャプノサイトファーガ ・シノデグミ (Capnocytophaga cynodegmi) (NZ_CDOD01000002.1) >WP_041989581.1	menktslgnniyynpfkpdqksyfyagynaamentdsvfrelgkrlkgkeytsenffdai fkenislveyeryvklldsyfpmarlldkkevpikerkenfknfkgiikavrdlnrnyf hkehgeveitdeifgvldemlktstvlvkkkkiktddktkeilkksiekqldilcqkkley lkdarkieekrrnqrgerkelvprfeydsrrddliaaiyndafdvdydkkksdkess ktkyntesypqgeegdlkipiskngvvflslflskqevhafkskiagfkatvideatvs hrknsicfmatheifshlaykklkrkvrtaeinyseaenaeglsiyaketlmmqmdels kvpdvvyqnlsevdvqktfiedwneylkenngdvgtmeeeqviphvirkyedkfnfair fldefaqfptlrfqvhlgnylhdsrpkenlisdrrikekitvfglrselehkkalfiknt etnedrkhywevfnpnydfpkenisvndkdfpiagsildrekqptagkigikvnlngk yisevdkavkahqlkqrnnkpsiqniieeivpingsnpkeaiivfggqptaylsmndihsi lyeffdkwekkkekkekkelrkeigkeleekivgkiqtqiqqiiddkinakilpyq dddstaidekelikldlkqekilqlklnegtarekeyqeciaygeesrkkirsdkrsrqy lrnqlkrkypevptrkeilyyqekgvavvlandikrfmptdfknewkgeqhsllqksla yyeqckeelknllpqkvfkhlpfelggfqqkylqfytryldkrlehisglvqqaenf knenkvfkvenecfkflkqnythkgldaqasvlgypiflergfmdekptiikgkftk gneslftdwfryykeyqnfqtfydtenyplvelekkqadrkretkiyqqkndvftllma khifksvfkqdsidrfslidlyqsreerlenqekakqtgerntnyiwntvdlncdgkv tvenvklknvgdfikyeydqrvaflkyeenikwqaflikeskeeenypyivereieqy kvrreellkevhlieeyilekvdkelkkqdnqnfkyiylngllkqkndvesykvfn lntkpedvnnlqkqeatdlegkafvltiyirnkfahnqlpkkefwdyccqkykiekekt yaeyfaevfkkekealmk	40

バージイエラ・ズーヘル カム(Bergeyella zoohelcum) ATCC 43767 (NZ_JH932293.1) >WP_002664492.1	menktslgnniynpfpkqdkysyafgyfnaamentdsvfrelgkrlkgkeytsenffdaif fkenislveyeryvklldsyfpmarllldkkevpikerkenfknfkgiikavrdlnrfyt hkehgeveitdeifgvldemlktstvlrvkvvkvtddtkeilkksiekqldilcqqkkley lrdtarkieekrrnrgelgelvapfkysdkrddliaaiyndafadvdyidkkkdslkess kakyntksdpqqeqgdlkipiskngvflslfltkqeihaafksiaqgkatvideatvs eatvshgknsicfmatheifshlaykklkrkvrtaeinygeaenaqlsvyakletlmmqm ldelskvpdvvyqnlstedvqktfiedwneylkenngdvgtmeeeqvihpvrkryedkfn yfairfldefaqfptlrfqvhlgnylhdsrpenlisdrrikekitvfglrlselehkklal fikntetnedrehyweifpnpnydfpkenisvndkdfpiagsildrekqpvagigikvk llnqqyvsevdkaqahqkqrkaskpsiqniieevpinesnpkeaiivfggqptaylsm ndihsilyeffdkwekkkkekkekgekelrkeigkelekkivgkigaqigqiidkdnak ilkpyqdgndstaidkeklikldkqeqnilqklkdeqtvrekeyndfiayqdknreinavr drnhkqylkdnllkrkypeaparkvlyyrekqkvavwlandikrfmptdfknewkgeqhs llqkslayyeqckeelknllpekvfqlhlpfkllggyfqqkyllyqfytcyldkrleyisglv qqaenfksenkvvfkkenecfkflkkqnythkeldarvqsilgypiflergfmdekptii kgktfkqnealfadwfryykeyqnfqtfydenyplvelekkqadrkrktkiyqqkndv ftllmakhifksvfkqdsidqfsledlygsreerlgnqerarqrgerntnyiwkntvdlk lcdgkitvenvklknvgdfikyeydqrvgaflykeeniewqafilkeskeeneypyvver eieqykevrrreellkevhlieeyilekvdkkeilkkgdnqnfkyiylngllkqlknedve sykvfnlntepedvniqlkqeatdleqafvltiyirnkfahnlqpkfkwfwdyqcykgyk ieektyaeyfaevfkkekealik	10
フラボバクテリウム属種 (Flavobacterium sp.) 316 (NZ_JYGZ01000003.1) >WP_045968377.1	mdnnitvektelgqitynhdkvedkhyfggffnlaqnnidlvagefkkrlilggkdsin ifanyfsdqcsitnlergikilaeyfpvvsyidldekknksksirehlillletinnlrny ythyyhkkiiidgslfppliditillkvvlleikkklkledkktqllkkgiekemtilfmlnk aeqkekkikgwnidenikgavlnrafshllyndelsdyrkskyntedetlkdltidstegil fllsfllnkkeqeqkkanikgykqkiasipdeeitlknnslnrmathwtyshtlytkgdkh riktdeketllvnmvdyllskvpheiyqnlseqnkslfledineymrdneenhssear vihpvirkryenkfayfairfldefaeftplrfmrvnvgnyihdnrkdkdigfslitnrti kqginvfgnlteihkkkndyfekeenektlewelfpnpsyhfqkenipfidlekset ndlakeyakekkkifgssrkkqgntakknretiinlvfdkyktsdrktvtfeqptallsf nelnsflyafllvenktgkelekiiekieianqyqilknksstvdktndipksikkivntt tdsfyfegkkidieklekdiieieketneketikeneesaqnykrnerntqkrklyrky vfftneigieatwitndilrflndkenwkgyqhselqkfisqydnkykkaalgleswnl esdaffggnlkrmfqsnsstfetfkykylndrkntletylsaienlktmtdvprpvlkkkw telrfrfddkiiyllstietkinelitkpinlsrgifeekptfingknppknkennghlfanw fiyakktlilqdfynlpieqpkaitnlkhhkyklersinnlkiediykqmvdflyqklf eqsfigslqdltskerekiekgkakneqtpdesfiwkkqveinthngriiaktkikdig kfknlltdnkiahlisyddriwdfslndgditkkllysinteleseytirreklkqkqg feqfllegeteysaerhpekfekdcnnpfkkyiiegvlknkiipnreieieilkskedv fkinfdsililnndnikkgyllimirnknfahnlidknlfnfslqlysknenenfseyn kvcqniieqfekklk	20
サイクロフレクサス・ト ークイス(Psychroflexus torquis) ATCC 700755 (NC_018721.1) >WP_015024765.1	mesiiglglslfnpkytadkhyfgsflnlvennlavfaefkerisykakdenissliekh fidnmsivdyekkisilngylpiidflddelennlntrvknfknfiilaeeleklrddy thfyhdpitfednkepllelldevllktildvkkkylktddtkeilkdsireemdlvir ktdelrekktntpkiqhtdssqiknsifndafqgllyedkggnkktqvshraktrlnpkd ihkqeerdfeiplstsglvflmslflskkeiedfksnikgfgkqvvdkenhnslykmath rvysilafkglykriktddtsketlmmgmideliskvpdcvqynlsetkqkdfiedwneyf kdneentenlensrvvhpvirkryedkfnyfairfldefanftklkfvgfmggyiindhzt ktigttnittertvkekinvfglkskmdnlkhhffsqslddentdewffpnpnyfnltqa dnspannipyilelnqgiiekdaikaevnqtgnrnpnkpskrdllnkilktyedfhgg dptailslnleipallhlflvlpknktgqgqienirikiiekqfkainhpsknnkgipkslf adtnrvrnaiklkkdlaealdmlnkhhiafkengkassnydkllkehqftpknkrpelrk yvfyksekggeatwlandikrfmpkdfktkwkgcqhshelqrklafydrhtkqidkellsg cefdhslldinayfgkdnfeddfskystenrietlegvlkklhdfkneptplkgvfkncfk flkrqnyvtespeiikkrlakptflprgvfderptmkgknplkdknefaewfveylen kdyqkfynaeeyrmradfkknavikkqklkdfytlqmynyllkevfgkdemnlqslself qtrqerlklqgiakknketgdssentrngtyiwnkdvpvsffngkvpidkvlknigk ykryerdervktfigyevdekwmmylphnwkdrysvkpinvidlqigeyeeirshellke iqnleqyiydhttdknillqdggnpnmkmyvlnlligikqvnipdfivlkqntnfdkidf tgiascselekktiiliairnkfahnlqpnkmiydianeeflkieknetanyanylklvklkm isdla	30
フラボバクテリウム・コ ルムナレ (Flavobacterium columnare) ATCC 49512 (NC_016510.2) >WP_014165541.1	mssknesynkqktfnhykqedkyffggflnnaddnlrgvgkefktrinfhnnnelasvf kdyfnkeksvakrehalnlsnyfpvlriqkhtnfnfeqtreifellldtikklrddy hhyhkpitinpkidydflddtlldvilitikkkkvkndtsrellkeklrpektqlknqkree likkgkklleenlenavfnhclrpfleentddkqnktvslrkyrkskpneetsitltqs glvflmsfflhrkefqvftsglegfkakvntikeeeislnknivymithwsysyynfkq lkhriktdqgvstleqnntthslntntkealltqivdylskvpneyietlsekqqkfe edineymrenpenedstfssivshkvirkryenkfnfamrfldeyaelptlrfmrvnfgd yikdrqkkilesiqfdseriikkeihlfeklslyteyknvylketsnidlsrflpfpnp syvmannnipfyidrsnnldeylnqkkaqsqnknrntfeykneqskdaiamlqke igvkdlqqrstiglscnelpsmlyevivkdikgaelenkiaqkireqygsirddtldsp qkdnipttlikintdssvtfenqpidiprlknaiqkeltltqekllnvkeheievdyn rnkntyfkknqpknvddklqrkyvfyryneirgeanwlasdlhfmknkslwkgyhmne lgsflaffedkknkdialletvfnlkedciltkglknlflkhgnfidfykeylkkedfl ntestflengliglppkilkkelksrkfyifivfqkrqfiikeleekknlyadainlsr gifdekptmipfkpnpdefaswfvasygynnyqsfyeltpdiverdkkkkylnlraink vkiqdyylklmvdltlyqdlfnqpldkslsdfyvskaerekikadakykgrndsslnwkv ihlslnqnritanpklldigkykralqdekiatltyddrtwtalqpekeneendykkel hytalnmelqeyekvrskellkqvqelekqileeytdflstqihpadferegnpnmfkyl ahsilenedldklpekveamreldeitnpiikkaivliiirnkmaahnyppkfyidla nrfvpkkeeeyfatyfnrvfetitkelwenkekdkdtqv	40

フラボバクテリウム・コ ルムナレ (<i>Flavobacterium columnare</i>) (NZ_CP013992.1) >WP_060381855.1	mssknesynkqktfnhykqedkyffggflnnaddnlrqvgkefkttrinfnhnnnelasvf kdyfnkeksvakrehalnllsnypvleriqkhtnnhfeqtrefellldtiklrdyyt hhyhkpitinpkvydflddtllldvitikkkvkndtsrellkekfpelqtqknqkree likkgkklleenlenavfnhclrpflenktddkqkntvsrlkyrkskpneetsitltqs glvflmsffllhrkefqvftsglegfkakvntikeeeislnknnivymithwsysyynfkq lkhriktdqgvstlegqntthsltnntntkealltqivdylskvpneiyetlsekgqkefe edineymrenpenedstfssivshkvirkryenkfnymamrfldeyaelptlrfmvmfgd yikdrqkkilesiqfdseriikkeihlfeklglvteyknvylketsnidlsrpfplfsp syvmannnipfyidsrsnnldeylnqkkkagsqnkrnltfekynkeqskdaiamlqke igvkdllqqrstiglscnelpsmlyevivkdikgaelenkiaqkireqyqsirdftldsp qkdnipttlltktistdtsvtfenqpidiprlknalqkelaltqekllnvkqheievndyn rnkntykfkngqpkdkvddnklqrkyvfyrneigqeanwlasdlhfkmknslwkgyymhne lqsflaffedkknndcialletvfnlkedciltkdklnflkhgnfidfykeylklkedfl ntestflengfiglppkilkkelskrlnyifivfqkrqfiikeleeknnlyadainlsr gifdekptmipfkkpnpdefaswfvasyqynnyqsfyeltpdkienkkkyknlraink vkiqdyylklmvdltlyqdlfnqpldkslsdfyvsktdekikadakyqkrndsfllwnkv ihlsqnnritanpklkdigkykralqdekiatltyddrtwtyalqkpekenendykel hytalmelqeyekvrskllkqvgelekqildkfydfsnnathpedleiedkkgkrhpn fklyitkallkneseiinlenidieilikyydynteklekekiknmdekekakivntkeny nkitnvlikkalvliiirnmahngyppkfiydlatrfrvpkkeeyfacyfnrvfetitt elwenkkakeiv
フラボバクテリウム・コ ルムナレ (<i>Flavobacterium columnare</i>) (NZ_CP015107.1) >WP_063744070.1	mssknesynkqktfnhykqedkyffggflnnaddnlrqvgkefkttrinfnhnnnelasvf kdyfnkeksvakrehalnllsnypvleriqkhtnnhfeqtrefellldtiklrdyyt hhyhkpitinpkvydflddtllldvitikkkvkndtsrellkekfpelqtqknqkree likkgkklleenlenavfnhclrpflenktddkqkntvsrlkyrkskpneetsitltqs glvflmsffllhrkefqvftsglegfkakvntikeeeislnknnivymithwsysyynfkq lkhriktdqgvstlegqntthsltnntntkealltqivdylskvpneiyetlsekgqkefe edineymrenpenedstfssivshkvirkryenkfnymamrfldeyaelptlrfmvmfgd yikdrqkkilesiqfdseriikkeihlfeklglvteyknvylketsnidlsrpfplfsp syvmannnipfyidsrsnnldeylnqkkkagsqnkrnltfekynkeqskdaiamlqke igvkdllqqrstiglscnelpsmlyevivkdikgaelenkiaqkireqyqsirdftldsp qkdnipttlltktistdtsvtfenqpidiprlknalqkelaltqekllnvkqheievndyn rnkntykfkngqpkdkvddnklqrkyvfyrneigqeanwlasdlhfkmknslwkgyymhne lqsflaffedkknndcialletvfnlkedciltkdklnflkhgnfidfykeylklkedfl ntestflengfiglppkilkkelskrlnyifivfqkrqfiikeleeknnlyadainlsr gifdekptmipfkkpnpdefaswfvasyqynnyqsfyeltpdkienkkkyknlraink vkiqdyylklmvdltlyqdlfnqpldkslsdfyvsktdekikadakyqkrndsfllwnkv ihlsqnnritanpklkdigkykralqdekiatltyddrtwtyalqkpekenendykel hytalmelqeyekvrskllkqvgelekqildkfydfsnnathpedleiedkkgkrhpn fklyitkallkneseiinlenidieilikyydynteklekekiknmdekekakivntkeny nkitnvlikkalvliiirnmahngyppkfiydlatrfrvpkkeeyfacyfnrvfetitt elwenkkakeiv
フラボバクテリウム・コ ルムナレ (<i>Flavobacterium columnare</i>) (NZ_CP016277.1) >WP_065213424.1	mssknesynkqktfnhykqedkyffggflnnaddnlrqvgkefkttrinfnhnnnelasvf kdyfnkeksvakrehalnllsnypvleriqkhtnnhfeqtrefellldtiklrdyyt hhyhkpitinpkvydflddtllldvitikkkvkndtsrellkekfpelqtqknqkree likkgkklleenlenavfnhclrpflenktddkqkntvsrlkyrkskpneetsitltqs glvflmsffllhrkefqvftsglerfkakvntikeeeislnknnivymithwsysyynfkq lkhriktdqgvstlegqntthsltnntntkealltqivdylskvpneiyetlsekgqkefe edineymrenpenedstfssivshkvirkryenkfnymamrfldeyaelptlrfmvmfgd yikdrqkkilesiqfdseriikkeihlfeklslvteyknvylketsnidlsrpfplfsp syvmannnipfyidsrsnnldeylnqkkkagsqnkrnltfekynkeqskdaiamlqke igvkdllqqrstiglscnelpsmlyevivkdikgaelenkiaqkireqyqsirdftldsp qkdnipttlltktintdssvtfenqpidiprlknalqkelaltqekllnvkqheievndyn rnkntykfkngqpkdkvddnklqrkyvfyrneigqeanwlasdlhfkmknslwkgyymhne lqsflaffedkknndcialletvfnlkedciltkdklnflkhgnfidfykeylklkedfl stestflengfiglppkilkkelskrlnyifivfqkrqfiikeleeknnlyadainlsr gifdekptmipfkkpnpdefaswfvasyqynnyqsfyeltpdiverdkkyknlraink vkiqdyylklmvdltlyqdlfnqpldkslsdfyvskaerekekikadakyqkrndsfllwnkv ihlsqnnritanpklkdigkykralqdekiatltyddrtwtyalqkpekenendykel hytalmelqeyekvrskllkqvgelekqildkfydfsnnathpedleiedkkgkrhpn fklyitkallkneseiinlenidieilikyydynteklekekiknmdekekakivntkeny nkitnvlikkalvliiirnmahngyppkfiydlanfrvpkkeeyfacyfnrvfetitt elwenkekdkktqv
クリセオバクテリウム属 種(<i>Chryseobacterium sp.</i>) YR477 (NZ_KN549099.1) >WP_047431796.1	metqtiqhgiaydhskiqdkhffggflnlaennikavlkafseknvgnvdkqfadvs kdnlpdndfqkrvslfkmypvvdinipnrrakfrsdltdtlfksvdqlrnfthyhykp ldfdasllfillddifartakevrdqkmddktrqllslsleelqgyelqlerlkelnr lgkknihdqlgikngvlnnafnhliykdgdesfktklyssaltsfsesaengieisqsgl lflslmflkrkeiedlknrnkgfkakvvidedgkvnglkfmathwvfyylcfkglkskls tefheetlliqiideliskvpdelycafdketrdkfiedineyvkeghqdfsledakvihp virkryenkfnymairfldefvfkpslrfqvhvgnvyvhdrriknidgttfetervvkdri kvfgrlseissykaqlssvsdkhdetgweifpnpsyvfinnipihisvdsfkkkeiad fklrraqvpdelkirgaekkrkfeitqmigsksvlnqeeipiallsneipallyeilin gkepaerierikdklnerqdviknypenwlpasqisrrlrsnngerintdkllqlvtk ellvteqklkiiisdnrealqkqkegkyirkfiftnselgreailwaddikrfmpadrke wkgyqhsqqlqslafynsrpkealaillesswnlkdekiwnnewilksftqnkffdafyne ylkgrkkyfafllsehivqytsnaknlqkfikqgmpkdlfekrhyiiedlqteknkilskp fifprgfidkkptfikgvkvedspesfanwygyqyqkdhqfkydwrdsdvflhlg kpfinnqdrrtlqmeelkeriikqdlkikkikqdlflrliaenlfqkvfyksaklpls dfyltqeermekenmaalqnvreegdkspniiikdnfiwskmipykkqqqienavklldig klnvlslddkvqtllsyddakpwsikialenefsigensyevirrekflfkeiqgfeseilf rsgwdginhpqlednrrnpfkmyivngilrksaglysggediweyfnadfnlnldadvle tkselvqlaflvtairnkfahnqlpakefyfyrakgyfadepsvalvynlftkyainef kkvmi

10

20

30

40

リエメラ・アナティペ ステイファー(Riemerella anatipestifer) ATCC 11845 = DSM 15868 (NC_014738.1) >WP_004919755.1	mekpllpnvvtlkhkffwgaflniarhnafitichineqlglktpsnddkivdvvcetwn nilnndhdllkksqtltelilkhfpfltamcyhppkkgkkgkghqegqkeseaqsqae alnpskliealeilvnqhlslrnyyhykhkpkdaekdifkhlykafdaslrvmkedyka hftvnltrdfahlrnrkgknkqdnpdfnrfrfekdgfftesgllfftnlfldkrdaywmlk kvsgfkashkqrekmttevfcrsrillpkrlresrydhngmllldmlselsrcpklllyekl seenkhhfqveadgfldeieeqnpfkdtlirhqdrfpyfalryldlnesfksirfqvdl gtyhyciydkkigdeqekrhlttrtllsfgrlqdfteinrpgewkaltkdldyketsnqpf iskttphyhitdnkigfrlgtkskelypsleikdganriakypynsgfvahafisvshellp lmfyqhltgksedllketvrhiqriykdfeeerintiedlekanqgrlplgafpkqmlgl lqnkqpdlsekakikieklaetkllshrlntklksspklgkrreklikgtvldwlvkd fmrfgpvaydaqnqpksskanstefwfirmalalyggeknrlegyfktnligntnph flnkfnwkacrnldvfyqqylegrekfleaiknqpwepyyqyclllkipkenrknlvkgwe qggislprglfteairetlesdmlskpirkeikkhgrvgfisiraitlyfkekyqdkhqs fynlsykleakapllkreehyeywqgnkpsptesqrlelhtsdrwkdylllykrwghlek klrlyrnqdvmlwmltletknhfkelnlnyqlklenlavnvqeadaklnplnqtlpmv lpvkvyypatafgevqyhetpirtvyireehtkalkmgnfkalkvdrnlglfsfikeend tqkhpisqlrlrreleiyqslrvdafketlsleekllnkhtslsslenefralleewkke yaassmvtdehifiasvrnafchnqypfykealhaplftvaqptteekdglgiaeal lkvlreyceivksqi	10
リエメラ・アナティペ ステイファー(Riemerella anatipestifer) RA-CH-2 (NC_020125.1) >WP_015345620.1	mffsfhnaqrviikhlykafdaslrvmkedykahftvnltrdfahlrnrkgknkqdnpdfn ryrfekdgfftesgllfftnlfldkrdaywmlkkvsgfkashkqrekmttevfcrsrill pkrlresrydhngmllldmlselsrcpklllyeklseenkhhfqveadgfldeieeqnpfk dtlirhqdrfpyfalryldlnesfksirfqvdlgtyhyciydkkigdeqekrhlttrtlls fgrlqdfteinrpgewkaltkdldyketsnqpfiskttphyhitdnkigfrlgtkskelyp sleikdganriakypynsgfvahafisvshellplmfyqhltgksedllketvrhiqriy kdfeeerintiedlekanqgrlplgafpkqmlgllqnkqpdlsekakikieklaetklls hrlntklksspklgkrreklikgtvldwlvkd fmrfgpvaydaqnqpksskanstefw firmalalyggeknrlegyfktnligntnphflnkfnwkacrnldvfyqqylegrekf leaikhqpwepyyqyclllkvpkenrknlvkgwegggislprglfteairetleskdltlsk pirkeikkhgrvgfisiraitlyfkekyqdkhqs fynlsykleakapllkreehyeywqgn kpsptesqrlelhtsdrwkdylllykrwghlekklrlyrnqdimlwmltletknhfk elnlnyqlklenlavnvqeadaklnplnqtlpmvlpvkvyypatafgevqyhetpirtvyir eeqtalkmgnfkalkvdrnlglfsfikeendtqkhpisqlrlrreleiyqslrvdafk etlsleekllnkhtslsslenefrtllleewkkyaassmvtdehifiasvrnafchnqy pfyketlhapillftvaqptteekdglgiaeallkvlreyceivksqi	20
リエメラ・アナティペ ステイファー(Riemerella anatipestifer) (NZ_CP007504.1) >WP_049354263.1	mffsfhnaqrviikhlykafdaslrvmkedykahftvnltrdfahlrnrkgknkqdnpdfn ryrfekdgfftesgllfftnlfldkrdaywmlkkvsgfkashkqrekmttevfcrsrill pkrlresrydhngmllldmlselsrcpklllyeklseenkhhfqveadgfldeieeqnpfk dtlirhqdrfpyfalryldlnesfksirfqvdlgtyhyciydkkigdeqekrhlttrtlls fgrlqdfteinrpgewkaltkdldyketsnqpfiskttphyhitdnkigfrlgtkskelyp sleikdganriakypynsgfvahafisvshellplmfyqhltgksedllketvrhiqriy kdfeeerintiedlekanqgrlplgafpkqmlgllqnkqpdlsekakikieklaetklls hrlntklksspklgkrreklikgtvldwlvkd fmrfgpvaydaqnqpksskanstefw firmalalyggeknrlegyfktnligntnphflnkfnwkacrnldvfyqqylegrekf leaikhqpwepyyqyclllkipkenrknlvkgwegggislprglfteairetlesdmlsk pirkeikkhgrvgfisiraitlyfkekyqdkhqs fynlsykleakapllkreehyeywqgn kpsptesqrlelhtsdrwkdylllykrwghlekklrlyrnqdimlwmltletknhfk elnlnyqlklenlavnvqeadaklnplnqtlpmvlpvkvyypatafgevqyhetpirtvyir eehtkalkmgnfkalkvdrnlglfsfikeendtqkhpisqlrlrreleiyqslrvdafk etlsleekllnkhtslsslenefralleewkkyaassmvtdehifiasvrnafchnqy pfykealhaplftvaqptteekdglgiaeallkvlreyceivksqi	30
リエメラ・アナティペ ステイファー(Riemerella anatipestifer) (NZ_LUDU01000012.1) >WP_061710138.1	mffsfhnaqrviikhlykafdaslrvmkedykahftvnltrdfahlrnrkgknkqdnpdfn ryrfekdgfftesgllfftnlfldkrdaywmlkkvsgfkashkqsekmttevfcrsrill pkrlresrydhngmllldmlselsrcpklllyeklsekdckcfqveadgfldeieeqnpfk dtlirhqdrfpyfalryldlnesfksirfqvdlgtyhyciydkkigdeqekrhlttrtlln fgrlqdfteinrpgewkaltkdldynetsnqpfiskttphyhitdnkigfrlrtskelyp slevkdganriakypynsdfvahafisisvshellplmfyqhltgksedllketvrhiqri ykdfeeerintiedlekanqgrlplgafpkqmlgllqnkqpdlsekakikieklaetklls lshrlntklksspklgkrreklikgtvldwlvkd fmrfgpvaydaqnqpksskanste srlirralalyggeknrlegyfktnligntnphflnkfnwkacrnldvfyqqylegre kfleaikhqpwepyyqyclllkvpkenrknlvkgwegggislprglfteairetleskdltl skpirkeikkhgrvgfisiraitlyfkekyqdkhqs fynlsykleakapllkreehyeywq gnkpsptesqrlelhtsdrwkdylllykrwghlekklrlyrnqdimlwmltletknhfk elnlnyqlklenlavnvqeadaklnplnqtlpmvlpvkvyypatafgevqyhetpirtvy ireeqtalkmgnfkalkvdrnlglfsfikeendtqkhpisqlrlrreleiyqslrvda fketlsleekllnkhtslsslenefrtllleewkkyaassmvtdehifiasvrnafchn qypfyketlhapillftvaqptteekdglgiaeallrvlreyceivksqi	40

リエメラ・アナティペ ステイファ(<i>Riemerella</i> <i>anatipestifer</i>) (NZ_LUDI01000010.1) >WP_064970887.1	mekplppnvtytlkhhffwgaflniarhnafitichineqlglittpnddkiadvvctwn nilnndhdllkksqtltelilkhfpflaamcyhpkpegkkgssqkeqqekeneasqae alnpselikvltklvqlrtlrnyysshshkpkdaekdifkhlykafdaslmvkedyka hftvnltdqdfahlnrkgnkqndpfdryrfekdgfftesglfftnlfdkrdaywmkl kvsqfakashkqsekmttevfcrsrlllpklrlesrydhngmllmdslsrypkllyekl seedkkrfqveadgfldeieeqnpfkdtlirhqdrfpyfalryldnesfksirfqvdl gtyhyiciydkkigdegekrhltrtllsfgrlqdfteirpgewkaltkdldyketskqpf iskttphyhitdnkigfrlgtkskelypslevkdganriagypynsdvafahafisvhellp lmfyqhltgksedllketvzhiqriykdfeeerintiedlekanqgrlplgafpkqmlgl lqnkqpdlsekakikieklaetkllshrlntklksspklgkrrekliktgvladwlvkd fmrffqpvydaqnqpiesskanstefqliqralalyggeknrllegfykqtnligntnphp flnkfnwkacrnldfyqqylegrekfleaiknqpwepyqyclllkipkenrknlvkgwe gggislprglfteairetiskdltlskpirkeikkhgrvgfisraityfkyrekyqddhqs fydlpykleakasplpkkehyyewqqnkpqsptelqrlelhtsdrwkdyllkyrwqhle klrlrynqdvmlwmltletlknhfkelnllyhqlklenlavnvgeadaklnplnqtlpmv lpvkvyatafgevyqetpirtvyireeqtkalkmgnfkavkdrrlrlnglfsfikeend tqkhpisqlrlrreleyqslrvdafketlnleekllkhtslssvenkfllleewkke yaassmvtdehifiasvrnafchnqypfyeealhapiplftvaqqtteekdglgiaeal lrvlreyceivksqi	10
プレボテラ・サッカロリ ティカ(<i>Prevotella</i> <i>saccharolytica</i>) F0055 (AMEP01000091.1) >EKY00089.1	mmekenvqgshiyeyptdkcfwaafynlarhnahtiahinsfvnskkginnndkvldii ddwskfdndllmgarlnkllkhfpflkaplyqlakrktrkqggkeqqdyekkgdedev igeaianafkmanvrktlhaflkqledlrnhfshynynspakkmevfkddgfcnklyyvf daalqmvkddnrmpeinmqtdfehlvrlgrnrkipntfkyntfnsdgtinnngllffvs lflekrdaiwmqkikgfkkggtenymrmtnevfcrnrmpiklrltedydhqldfmdln elvrclpslykrlkqedqdkfrvpiefldeedeadnpyqenansdenptetdplkntlv rhqhrfpyfvlryfdlnevfqklrfqinlgyhfsiydktigertekrhltrtlfgfdr qnfsvklqpehwnmvkhldeessdkpysdamphyqienekigihflktdeketv psleveevssnrnkkykseknltaadafsthellpmmfyyqllsseektraaagdkvqgvl qsyrrkifdiyddfangtinsmqklderlakdnllrgnmpqqmlailehqepdmeqkake kldrlitetkkrigkledqfkgkvrigradlpkvgsiadwlvndmmrfqpakrnadnt gvpdskansteyrllqealafysaykdrlepyfrqvnliggtntnphfhlrvdwkknhl sfyhdyleakeqyishlspadwqkhqhflllkvrkdigneekdkkdlvagwknngflpr glftesiktwfstdadkvqitdtklfenrvgliaikliplydykvndkppfyqypfnin drykpedtrkrftaassklwnckmlyknaqpdssdkieyqpyldflswkklerelmlr nqdmvmlmckdlfaqtvegvefadlklslqlevdvvnqdnlnvlnnvssmilpslvyps daqgnvlrnsklphtvyvqenntklkqgnfksllkdrnlnglfsfiaaegedlqghplt knrleyelsiyqtmrisvfeqtlglekailtrnktlcnngnfnllnswsehrtdkktlqp didfliavrnafshnqypmstntvmqgiekfniqtpleekdglgiasqlakktkdaasr lqniinggt	20
プレボテラ・サッカロリ ティカ(<i>Prevotella</i> <i>saccharolytica</i>) JCM 17484 (NZ_BAKN01000001.1) >WP_051522484.1	medkpfwaafnlarhnyvltvnhinkllldleklydegkhkeiferedifnisddvmdnda nsngkkrkldikkiwdldltdltryqlrelilkhfpfiqpaigagtktertidkdkrs tstnsdsktqtegdindlslsnvksmfrrllqileqlrnyyshvkhksatmpnfed llnmwryifidsvnkkykdeyssnsvidpntsfshlykdegkikpcrpyfkskdgsina fgllffvsflflekqdsiwqkkipgfkkaasenykmntnevfcrnrhillpkirletvydkd wmllmdlnevrclpslykrltpaaqnfkfkvpkssdnanrqeddnpsrirlvrhqrnf yfvlrffdlnevftrtlrfqinlgyhfaickkqigdkkevhlrltygfsrlnqntqnt rpeewntlvkttepsngndqktvqgvpplpyisytiphyqienekigikfdgdtavtdi wpsvstekqlnkpktylttpgfkadvflsvhellpmmfyyqlllcegmktkdagnavekv lidtrnaifnlydafvqekintitdlenylqdkpilighlpkqmidllkghqrdmlkave gkkamlikdterrlklldkqlkqetdvaakntgtllkngqiadwlvndmmrfqpvkrdke gnpncskansteqymqlqraafayadtdscrlsryftqlhlhlsdnslfswfdeqkpn liafyaaylkakleflnelqpqnwasdnyflllrapkndrqklaegwkngfnlprglfte kiktwfnehktivdisdcdifknrvqgvarlipvffdkkfkdhspfyrydfnvgvskp teanylskqkreelfksyqnfknnpaektkeyreyknfslwkkferelrlknqdili wlmcknlfdelikpkkdilpriasvysikldslqtnstagslnlakvvpmlaihdids pkpdkgkagannekenkeftvyikeegtkllkwgnfktlladrrikglfsyiehdidlkqh pltkrrvdeldldyqtcridifqgtlgleaqlldkysdlntdnfqymligwrkckegiprn ikedtdfldvrnafshnqypdskkiafrirrkfnpkelileeeeglgiatqmykevekv vnrikrielld	30
プレボテラ・ブッカエ (<i>Prevotella buccae</i>) ATCC 33574 (AEPD01000005.1) >EFU31981.1	mqkqdklfdvrkknaifafpkyitimenekpepiyyeltkdhfwaafnlarhnyvtti nhinrrleiaelkddgymgikgswnegakklldkklvrlrdlimkhfpflaayemtnsk spnnkeqrekeqsealslnlnknlvlfiflekqlvlnryyshykyseespkpifetsllkn mykvfdanvrlvrkrdymhhenidmqrdfthlnrkkqvgtrtkniidsnfnhyhfadkeqnm tiagllffvsflldkddaiwmqkklkgfkdggnlreqmtnevfcrsrslpklklenvt kdwmlqldmlnelvrclpslyerlrekdresfkvpfdifsdnyneeeepfntlvrhqdrp pyfvlyrfdlneifeqlrfqidlgyhfsiynkrigdedevrhlthlygfdqfapq nqpeewrkvlkdldhfetsqepysiktaphyhlenekigikfcsahnllfslqtdktcn grskfnlgtqftaaflsvhellpmmfyyllltdkysrkesadkvegiirkeisniyaiy dafanneinsiadlrrlqntnilqghlpkqmisilkgqrkdmgkeakernkigemiddtqr rldllckqtnqkirigkrnagllksgkiadwlvndmmrfqpvqkdqnnipinnskaste yrmlqralalfgsenfrlkayfnqnnlvgnndnphpflaetqwehqtlnlsfyrnyleark kylqqlkpqpwkqyqhflilkvqktnrntlvgtwksfnlprgftqpiwefekhnnsk riydgilsfdrvgfvakaiplyfaeeykdnvqpfydyfignrlkpkkrqfldkerve lwqknkelfknpsekktdlayldflswkkferelrlknqdvtwlmfkelvfnmatve glkigeihlrdidntaneesnnlnrmpmklpvktyetdnkgnilkerplatfyieet etkvlkqgnfkavkdrrlrlnglfsfaettdlnleehpisklsvdlelikyqttrisifem tlglekklidkystlptdsfrnmrlerwlqcanrpelknyvnsliavrnafshnqypmyd atlfavkktflfsvdtkkielniaqgllleivgkaieieksenkn	40

プレボテラ・ブッカエ (Prevotella buccae) ATCC 33574 (NZ_GL586311.1) >WP_004343973.1	mqqkqdklfvdrkknafafpkpyitimenekpepiyyeltdkhfwaafnlarhnvytti nhinrrleiaelkddgymmgikgswneqakklkdkvrlrdlimkhfpfleaayemtnsk spnnkegrekeqsealslnnlknvlfifileklqvlrnyyshykyseespkipifetsllkn mykvfdanvrlvkrdymhhenidmqrdftlhrkkqvgtrkniidspnfhfhadkegnm tiagllffvslfldkddaiwmqkklkgfkdggrnlreqmtnevfcrsrlspklklenvgt kdwmlqdmnlvrcpkslyerlrrekdrsfkvpfdifsdyydaeeepfkntlvrhqdrf pyfvlryfdlneifeqlrfqidlgttyhfsiynkrigdedevrhlthlygfariqdfapq nqpeewrklvkldldhfetsqepysiktaphyhlenekigikfcsahnnlfpslqtdkctn grskfnlgtqftaaefslvshellpmmfyylttdkysrkesadkvegiirkeisniyaiy dafanneinsiadltrrlqntnilqghlpkqmisilkgqrqkdmgkearkigemiddtqr rldllckqtnqkirigkrnagllksgkiadwlvndmmrfqpvqkdqnnipinnskanste yrmlqralalfgsenfrlkayfngmnlvgndnphflaetqwehqtntilsfynyleark kylkgkqpqnwkqyqhflilkvqktnrntltvgwksfnlprgftqpiwefekhnnsk riydqilsfdrvgfvakaiplyfaeeykdnvqpfydyppnignrlkpkkrqfldkerve lwqknkelfknyipsekkktdlayldflswkkferelrlknqdivtwlmfkelnmatve glkigeihlrdidntaneesnnilnrmpmklpvktyetdnkgnilkerplatfyieet etkvlkqgnfkakldrrlqngllfsaettdlnleehpisklsvdheliqyqtrrisifem tlglekklidkystlptdsfrnmrlwqlqcanrpelknyvnsliavrnafshnqypmyd atlfavkkftlfpvdtkkielniaqqlleivgkaikeieksenkn	10
プレボテラ・ブッカエ (Prevotella buccae) D17 (NZ_GG739967.1) >WP_004343581.1	mqqkqdklfvdrkknafafpkpyitimenekpepiyyeltdkhfwaafnlarhnvytti nhinrrleiaelkddgymmgikgswneqakklkdkvrlrdlimkhfpfleaayemtnsk spnnkegrekeqsealslnnlknvlfifileklqvlrnyyshykyseespkipifetsllkn mykvfdanvrlvkrdymhhenidmqrdftlhrkkqvgtrkniidspnfhfhadkegnm tiagllffvslfldkddaiwmqkklkgfkdggrnlreqmtnevfcrsrlspklklenvgt kdwmlqdmnlvrcpkslyerlrrekdrsfkvpfdifsdyydaeeepfkntlvrhqdrf pyfvlryfdlneifeqlrfqidlgttyhfsiynkrigdedevrhlthlygfariqdfapq nqpeewrklvkldldyfeaseqepypiktaphyhlenekigikfcsahnnlfpslktekctn grskfnlgtqftaaefslvshellpmmfyylttdkysrkesadkvegiirkeisniyaiy dafangeinsiadltrrlqktnilqghlpkqmisilegrqkdmekearkigemiddtqr rldllckqtnqkirigkrnagllksgkiadwlvndmmrfqpvqkdqnnipinnskanste yrmlqralalfgsenfrlkayfngmnlvgndnphflaetqwehqtntilsfynyleark kylkgkqpqnwkqyqhflilkvqktnrntltvgwksfnlprgftqpiwefekhnnsk riydqilsfdrvgfvakaiplyfaeeykdnvqpfydyppnignrlkpkkrqfldkerve lwqknkelfknyipsekkktdlayldflswkkferelrlknqdivtwlmfkelnmatve glkigeihlrdidntaneesnnilnrmpmklpvktyetdnkgnilkerplatfyieet etkvlkqgnfkakldrrlqngllfsaettdidleknpitklsvdheliqyqtrrisifem tlglekklidkystlptdsfrnmrlwqlqcanrpelknyvnsliavrnafshnqypmyd atlfavkkftlfpvdtkkielniaqqlleivgkaikeieksenkn	20
プレボテラ属種 (Prevotella sp.) MSX73 (NZ_ALJQ01000043.1) >WP_007412163.1	mqqkqdklfvdrkknafafpkpyitimenekpepiyyeltdkhfwaafnlarhnvytti nhinrrleiaelkddgymmgikgswneqakklkdkvrlrdlimkhfpfleaayemtnsk spnnkegrekeqsealslnnlknvlfifileklqvlrnyyshykyseespkipifetsllkn mykvfdanvrlvkrdymhhenidmqrdftlhrkkqvgtrkniidspnfhfhadkegnm tiagllffvslfldkddaiwmqkklkgfkdggrnlreqmtnevfcrsrlspklklenvgt kdwmlqdmnlvrcpkslyerlrrekdrsfkvpfdifsdyydaeeepfkntlvrhqdrf pyfvlryfdlneifeqlrfqidlgttyhfsiynkrigdedevrhlthlygfariqdfapq nqpeewrklvkldldhfetsqepysiktaphyhlenekigikfcsahnnlfpslqtdkctn grskfnlgtqftaaefslvshellpmmfyylttdkysrkesadkvegiirkeisniyaiy dafanneinsiadltrrlqktnilqghlpkqmisilegrqkdmekearkigemiddtqr rldllckqtnqkirigkrnagllksgkiadwlvndmmrfqpvqkdqnnipinnskanste yrmlqhalalfgsessrlkayfngmnlvgndnphflaetqwehqtntilsfynyleark kylkgkqpqnwkqyqhflilkvqktnrntltvgwksfnlprgftqpiwefekhnnsk riydqilsfdrvgfvakaiplyfaeeykdnvqpfydyppnignrlkpkkrqfldkerve lwqknkelfknyipsekkktdlayldflswkkferelrlknqdivtwlmfkelnmatve glkigeihlrdidntaneesnnilnrmpmklpvktyetdnkgnilkerplatfyieet etkvlkqgnfkakldrrlqngllfsaettdidleknpitklsvdheliqyqtrrisifem tlglekklidkystlptdsfrnmrlwqlqcanrpelknyvnsliavrnafshnqypmyd atlfavkkftlfpvdtkkielniaqqlleivgkaikeieksenkn	30
プレボテラ・パレンス (Prevotella pallens) ATCC 700821 (AFPY01000052.1) >EGQ18444.1	mkeeeekgktpvstynkddkhfwaafnlarhnvyitvnhinkilgeeginrdgyentle kswneikdinkkdrslskliikhfpflevtyqrnsadttkqkeekqaeasleslksff vfiyklrdlrrnyshykhkslerpkfeedlqekmynifdasiqvlvedykhtndiktee dfkhldrkqgqkysfadnegnitesgllffvslflekddaiwvqkklegfkcsnesyqkm tnevfcrsrmlpkrlrlqstqtqdwilddmlnelircpkslyerlrreedrkkfrvpieia dedydaeqepfknlvrhqdfrfpyfalryfyneiftnlrfqidlgttyhfsiyykkqigy keshhlthklygferiqeftkqnrpdewrkfvktfnfsfetskepyipettphyhlenqki girfrndndkiwpslktseknkskyklkdsfqaeafslvshellpmmfyyltktentd ndneietkknkndkqekhkkeieienkiteiyalydafangkinsidkleyeckgkdi eighlpkqmiailksehkdmateakrkqeemladvqkslesldnqineeienverknssl ksgeiaswlvndmmrfqpvqkdnegnplnnskansteqymlqrsalalyneekxptryrq vnliessnphplnttewekcnnilsfyrsyleakknfleslkpedweknqyflntleekp tncetlvqgwknqgnlprgitepirkwfmehrknitvaelkrvglvakvipffseeyk dsvqpfynylfnvgninkpdeknlncceerellrkkkdefkmtdkkeenpsylefqs wnkferelrlvrnqdivtwllcmelfnkkkikelnvekiylknintnttkkeensteekng eekiikeknnilnrmpmrlpikvyggnfsknkkkirkrrntfttvyieekgtklkqgn fkalerdrllgglfsfvkthskaesksntisksrveyelgeyqkarieikdmlaleetl idkynsltdnfnhmltgwlklkdepdkasfqndvdliavrnafshnqypmnrriafan inpfslssantseekglgianqlkdkthktiekieieiekiepietke	40

プレボテラ・パレンス (Prevotella pallens) ATCC 700821 (NZ_GL982513.1) >WP_006044833.1	mkeeeekgktpvstynkddkhfwaafnlarnhvityitvnhinkilgegeinrdgyentle kswneikdinkdrslskliikhfpflevtttyqrnsadttkqkeekqaeagsleslksff vfiiyklrdlrnhshykhkskslerpkfeedlqekmynifdasiglvkedykhtndiktee dfkhldrkrkgkfysfadnegnitesgllffvsvlflekkdaiwvqklegfkcsnesyqkm tnevfcrsrmllpkrlrlqstgtqdwilldmlnelircpkslyerlreedrkkfrvpieia dedydaegepfkntlvrhqdrfpyfalryfydyneiftnlrfqidlgtyhfsiykkqigdy keshhlthklygferiqefttkqnrpdewrkfvktfnsfetskepyipettphyhlnqki girfrndndkiwpslktseknkskyklksfqaeafsvhellpmmfyyllktentd ndneietkkkenkndkqekkhkieeiiienkiteiyalydafangkinsidkleeyckgkdi eighlpkqmiailksehkdmateakrkqgeemladvqkslesldnqineeienvknssl ksgeiaswlvndmmrfqpvqkdnegnplnnskansteyqmlqrsalynkeekptryfrq vnliessnphplnttewekcnnilsfyrsyleakknfleslkpedweknqyflmlkep tncetlvqgwknqfnlprgfttepirkwfmehrknitvaeikrvglvakviplffseeyk dsvqpfynylfngvgninkpdeknflnceerrellrkkkdefkmtdekeenpsylefqs wnkferelrlvrnqdivtwillcmelfnkkkikelnvekiylknintntttkkekteekng eekiikeknnilnrmpmlrpikvygrenfsknkkkkirntfftvieekgtklkqgn fkalerdrllgglfsfvkthksaesksntiskrsveyelgeyqkarieikdmlaleetl idkynsltdtnfhnmltgwklkdepdkasfqndvdliavrnafshnqypmrnriafan inpfslssantseekglgianqlkdkthktiekieieiekiepietke	10
プレボテラ・インターメ ディア(Prevotella intermedia) ATCC 25611 = DSM 20706 (NZ_JAEZ01000017.1) >WP_036860899.1	meddkktttsiryelkdkhfwaafnlarnhvityitvnhinkileegeinrdgyettlkn wneikdinkdrslskliikhfpfleaatyrlnptdttkqkeekqaeagsleslksffvf iyklrdlrnhshykhkskslerpkfeegllekmynifnasirlvkedyqynkndinpedf khldrteeeefnyyfttkdnegnitesgllffvsvlflekkdaiwvqkklrgfkdrenkkkm tnevfcrsrmllpkrlrlqstgtqdwilldmlnelircpkslyerlreedrkkfrvpieia dedydaegepfkntlvrhqdrfpyfalryfydyneiftnlrfqidlgtyhfsiykkqigdy keshhlthklygferiqefttkqnrpdewrkfvktfnsfetskepyipettphyhlnqki girfrndndkiwpslktseknkskyklksfqaeafsvhellpmmfyyllktentd ndneietkkkenkndkqekkhkieeiiienkiteiyalydtfangeiksideleeyckgkdi eighlpkqmiailkdehkvmateaerkqgeemlvdvqkslesldnqineeienvknssl ksgkiaswlvndmmrfqpvqkdnegnplnnskansteyqllqrtlaffgseherlapyfk qtcliessnphplkdtewekcnnilsfyrsyleakknfleslkpedweknqyflklkep ktpkptlvqgwknqfnlprgfttepirkwfmkhrnitvaeikrvglvakviplffseey kdsqpfynylfngvgninkpdeknflnceerrellrkkkdefkmtdekeenpsylefqs swnkferelrlvrnqdivtwillcmelfnkkkikelnvekiylknintntttkkekteekn geeknikeknnilnrmpmlrpikvygrenfsknkkkkirntfftvieekgtklkqgn nfkalerdrllgglfsfvktpksaesksntiskrlveyelgeyqkarieikdmlaleetl lidkynsltdtnfhnmltdwlelkgepdkasfqndvdliavrnafshnqypmrnriafa ninpfslssantseekglgianqlkdkthktiekieieiekiepietke	20
プレボテラ・インターメ ディア(Prevotella intermedia) (NZ_LBGT01000010.1) >WP_061868553.1	meddkktttsiryelkdkhfwaafnlarnhvityitvnhinkileedeinrdgyentlens wneikdinkdrslskliikhfpfleaatyrlnptdttkqkeekqaeagsleslksffvf iyklrdlrnhshykhkskslerpkfeedlqnkmynifdvsiqfvkedykhtndinpkkd khldrkrkgkfysfadnegnitesgllffvsvlflekkdaiwvqklegfkcsnksyqkm tnevfcrsrmllpkrlrllestgtqdwilldmlnelircpkslyerlqgvnrkkfyvsfpa dedydaegepfkntlvrhqdrfpyfalryfydyneiftnlrfqidlgtyhfsiykkliggy kedrhlthklygferiqefttkqnrpdewkaivkdsdtfkkkeekkeekpyisettpyhyl enkkigiafknhniwpslqteltnnkrkkyngltsikaeafsvhellpmmfyyllkte ntkndnkvggketkkggkhkieaiesikikdiyalafangeinsedelkeylkgkdi kivhlpkqmiailknehkdmaekaeakqekmklatenrlktldkqlkgkiqngkrynsap ksgeiaswlvndmmrfqpvqkdngeslennskansteyqllqrtlaffgseherlapyfk qtcliessnphplndtewekcnnilsfyrsylkarknfleslkpedweknqyflmlkep ktnretlvqgwknqfnlprgfttepirkwfmehwksikvddlkrvglvakviplffseey kdsqpfynylfngvgninkpdeedflhreerielwdkkdkfkgyakkkfkemtdkeke ehrsylefqswnkferelrlvrnqdivtwillctelidklkidelnkelklrlkdintd takkeknnilnrmpmlpvtvykvnggyiiknplhtiyikeaetklkqgnfkalkv drllnglfsfvktpseasesnpsiskrlveyelgkyqnarlidiedmlaleekklidkyns ldtdnfhnmltgwlelkgeakkarfqndvklitavrnafshnqypmydenlfgnierfsl ssniieskgldiaaklkeevskaakkineednkkeket	30
プレボテラ・インターメ ディア(Prevotella intermedia) 17 (CP003502.1) >AFJ07523.1	mkmeddkkttkestnmlndkhfwaafnlarnhvityitvnhinkvlelknkdkdidiidnq dilaikthwekvngdlnkterlrelmtkhfpfletaiytknkedkeevkqekqakagsfd slkhclflfleklqearnyyshykysestkepmlekelkkmynifdndniqlvikdyqhn kndinpedfkhldrteeeefnyyfttnkgnitasgllffvsvlflekkdaiwvqkklrgfk dnreskkkmthevfcrsrmllpkrlrllestgtqdwilldmlnelircpkslyerlqgeyrk kfnvpfadsadedydaegepfkntlvrhqdrfpyfalryfydyneiftnlrfqidlgtyhfs iykkliggqkedrhlthklygferiqefakqnrtdewkaivkdsdtfkkkeekkeekpyiset hyhlnqkigirfrndndeiwpslktngennekrkyklkqyqaeafsvhellpmmfy lllkkeepnndkknasivegfikreirdiyklydafangeinniddlekycedkgipkrh lpkqmvailydehkdmaeeakrkqkemvdktklllatlektqgeiedgggnrllksge iarwlvndmmrfqpvqkdnegnplnnskansteyqmlqrsalynkeekptryfrqvnli nssnphplkwtkwecnnilsfyrsyltkkieflnklkpedweknqyflklkepknre tlvqgwknqfnlprgfttepirewfkhrqndseeyketldrvglvtkvipffkeds kdkeeylkkdaqkeinncvqpfygyfpyngvnihpdekdfpseerklkgdkkykfgky kakvkskkltdkeeyrsylefqswnkferelrlvrnqdivtwillctelidklkvegl veelklrlkdiddtdakqeknnilnrmpmlpvtvyeidshnivkdrplhtvyieet ktklkqgnfkalkvdrllnglfsfvdtsssetelksnpskslveyelgeyqnarietik dmlleetliekyktlptdnfsmldngwlegkdeakkarfqndvklitavrnafshnqyp mrnriafaninpfslssadtseekklldianqlkdkthkiikrieiekiepietke	40

プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) (NZ_AP014926.1) >WP_050955369.1	meddkkktkestnmlndknkhfwaafnlarnhvyitvnhinkvlelknkkdqdiidndqdilaikthwekvngdlnkterlrelmtkhfpfletaiytknkedkeevkqekqakagsfslkhclflflekqlqearnyyshykysestkepmlekelkkmyinfddniqlvikdyqhnkndinpdedfkhldrtedefnyfyttnkgnitasgllffvslflekddaiwmqqklrgfkdreskkkmthefvforrrmlpkrlrestqtqdwilldmlnelircpksslyerlqgeyrkffnvpfdsadedydaeqepfkntlvrhqdrfpyfalryfydyneiftnlrfqidlgtfhyfsiykkliggqkedrhlthklygferiqefakqnrtdewkaivkdldtyetseepiysetaphyhlenqkigirfrndndeiwpslktngennekrkykldkqyqaaeflsvhellpmmfyyl1lkkeepnndkknasivegfikreirdiyklydafangeinniddlekycedkgipkrhlpkqmvaailydehkdmaeeakrkqkemvkdtklllatlekqtqgeiedggnrnl1ksgeiarwlvndmmrfqpvqkdnegnplnnskansteyqmlqrsalalynkeekptryfrqvnlinssnphpfllkwtkweecnnilsfyrsyltkkieflnklkpedweknqyflklkepknretlvqgwknqfnlprgfittepirewfkrhqndseeyekvetldrvglvtkviplffkkedsdkkeyylkkdaqkeinnncvqpfyfpynvgnihkpkdekdfpseerkklwgdkkkykfkyka kvkskkltdkekeeyrsylefqswnkferelrlvrnqdivtwllctelidklkveglnev elkkrlrldidtdtakqeknnilnrvmpmqplvtvyeiddshnivkdrplhtvyieetktklkqgnfkalkvdrrlglfsfvdtsssetelksnpiskslveyelgeyqnarietikedmllleetliekyknlptdnfsmngwlegkdeadkarfqndvkl1lavrnafshnqypmrnriafaninpflssadtseekkldianqlkdktthkiikriieiekpietke	10
プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) (AP014598.1) BAU18623.1	meddkkkttdsisyelkdkhfwaafnlarnhvyitvnhinkvlelknkkdqdiidndqdilaikthwekvngdlnkterlrelmtkhfpfletaiysknkedkeevkqekqakagsfslkhclflflekqlqearnyyshykysestkepmlekelkkmyinfddniqlvikdyqhnkdinpdedfkhldrtedefnyfyttnkgnitasgllffvslflekddaiwmqqklrgfkd nreskkkmthefvforrrmlpkrlrestqtqdwilldmlnelircpksslyerlqgedrekfkvpfdpatedydaeqepfkntlvrhqdrfpyfalryfydyneiftnlrfqidlgtfhyfsiykkliggqkedrhlthklygferiqefakqnrpdewkaivkdldtyetseepiysetaphyhlenqkigirfrndndeiwpslktngennekskykldkqyqaaeflsvhellpmmfyyl1lkkeepnndkknasivegfikreirdmyklydafangeinniddlekycedkgipkrhlpkqmvaailydehkdmvkeakrkqkemvkdtekl1aalekqtqektgedggnrnl1ksgeiarwlvndmmrfqpvqkdnegnplnnskansteyqmlqrsalalynkeekptryfrqvnlinssnphpfllkwtkweecnnilsfyrsyltkkieflnklkpedweknqyflklkepknretlvqgwknqfnlprgfittepirewfkrhqndskeyekvealdrvgltkviplffkkedsdkdeedlkkdaqkeinnncvqpfysfpyvgnihkpkdekdfhreeirielwdkkdkfkgyk akvkskkltdkekeeyrsylefqswnkferelrlvrnqdivtwllctelidklkveglnev eelkkrlrldidtdtakqeknnilnrvmpmqplvtvyeiddshnivkdrplhtvyieetktklkqgnfkalkvdrrlglfsfvdtssaeelksnpiskslveyelgeyqnarietikedmllleetliekyknlptdnfsmngwlegkdeadkarfqndvkl1lavrnafshnqypmrnriafaninpflssadtseekkldianqlkdktthkiikriieiekpietke	20
プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia) ZT (ATMK01000017.1) >KJJ86756.1	mkmeddkkkttestnmlndknkhfwaafnlarnhvyitvnhinkvlelknkkdqdiidndqdilaikthwekvngdlnkterlrelmtkhfpfletaiytknkedkeevkqekqaaagsleslkdcclflflekqlqearnyyshykysestkepmleegllekmyinfddniqlvikdyqhnkdinpdedfkhldrkqgfkysfadnegnitesgllffvslflekddaiwmqqklngfkd nreskkkmthefvforrrmlpkrlrestqtqdwilldmlnelircpksslyerlqgeyrkffnvpfdsadedydaeqepfkntlvrhqdrfpyfalryfydyneiftnlrfqidlgtfhyfsiykkliggqkedrhlthklygferiqefakqnrpdewkaivkdldtyetsneryisetaphyhlenqkigirfrngnkeiwpslktngennekskykldkpyqaaeflsvhellpmmfyyl1lkkeepnndkknasivegfikreirdmyklydafangeinniddlekycedkgipkrhlpkqmvaailydepkdmvkeakrkqkemvkdtklllatlekqtqeeiedggnrnl1ksgeiarwlvndmmrfqpvqkdnegnplnnskansteyqmlqrsalalynkeekptryfrqvnlinssnphpfllkwtkweecnnilsfyrnyltkkieflnklkpedweknqyflklkepknretlvqgwknqfnlprgfittepirewfkrhqndskeyekvealkrvglvtkviplffkeeyfke daqkeinnncvqpfysfpyvgnihkpkdekdfpseerkklwgdkkdkfkgykakvkskkltdkekeeyrsylefqswnkferelrlvrnqdivtwllctelidkmkveglnev elqklrldidtdtakqeknnilnrvmpmqplvtvyeiddshnivkdrplhtvyieetktklkqgnfkalkvdrrlglfsfvdtsskaelkdkpisksvveyelgeyqnarietikedmllleetliekyknlptdnfsmngwlegkdesdkarfqndvkl1lavrnafshnqypmrnriafaninpflssadiseekkldianqlkdktthkiikriieiekpietke	30
プレボテラ・アウランティアカ(Prevotella aurantiaca) JCM 15754 (NZ_BAKF01000019.1) >WP_025000926.1	meddkkktgtsisyelkdkhfwaafnlarnhvyitvnhinklleireidndekvldikt1wqgknkdlngkarlrelmtkhfpfletaiytknkedkkevqkqekqaaagsleslkdcclflfldklqearnyyshykysefskepefeegllekmyinfgnniqlvindyqhnkndinpdedfkhldrkqgfkysfadnegnitesgllffvslflekddaiwmqqklngfkd nlenkkkmthefvforrrmlpkrlrestqtqdwilldmlnelircpksslyerlqgddrekfkvpfdpad edynaeeqepfkntlvrhqdrfpyfalryfydyneiftnlrfqidlgtfhyfsiykkliggqkedrhlthklygferiqefakqnrpdewkaivkdldtyetsnkryisettphyhlenqkigirfrngnkeiwpslktndennekskykldkqyqaaeflsvhellpmmfyyl1lkkeepnndeinasivegfikreirnifklydafangeinniddlekycadkgipkrhlpkqmvaailydehkdmvkeakrkqkemvkdtklllatlekqtqekeddggnrnl1ksgeiarwlvndmmrfqpvqkdnegkplnnskansteyqmlqrsalalynneekptryfrqvnliesnphpfllkwtkweecnniltfyysyltkkieflnklkpedwknqyflklkepknretlvqgwknqfnlprgfittepirewfkrhqnskeyekvealdrvgltkviplffkeeyfkdkdeenfkdtqkeindcvqpfyfnfpyvgnihkpkdekdfhreeirielwdkkdkfkgykekikskkltdkekeefrsylefqswnkferelrlvrnqdivtwllckelidklkidelnieelkkrlrlnidtdtakkeknlnrvmpmelptvyeiddshnivkdkplhtiyyikeaetklkqgnfkalkvdrrlglfsfvktntseaeskrnpisklrveyelgeyqearieiiqdm1aleekli nkykdlptnkfsemlnswlegkdeadkarfqndvdfliavrnafshnqypmhnkiefanikpfslytannseekglgianqlkdktkettdkikkiekiepietke	40

プレボテラ・プリューリ ティディス(Prevotella pleuritidis) F0068 (NZ_AWET01000045.1) >WP_021584635.1	mendkrleesacytlnldkhfwaafnlrlarhnvyitvnhinktlelknknqeiidndqg ilaikthwakvngdlnktldrlreilmkhfpleaaiysnnkedkeevkeekgakaqsfs lkdclflflekqlqearnyyshykyssessekepefeegllekmyntfdasirlvkedyqynk didpekdfkhlerkedfnylftdkdnkgkitkngllffvslflekkdaiwmqqkgrgfk nrgnkekmthefrcsrmlpkirlestqtqdwilldmlnelircpkslryerlqgayrek fkvpfdisidedydaeqepfrntlvrhqdrfpyfalryfydyneifknrlfqidlgtyhfsi ykkliggkdedrhlthklygferiqeftkqnrpdkwqaiikdldtyetsneryisettph yhlenqkigirfrndndiwpslktngnekskynldkpyqaeafslvshellpmmfyyl llkmentdndkednevgtkkknknkqekhkkeieienkikdiyalvdaftngeinsid elaegregkdieighlpkqlivilknkskdmaekanrkqkemikdtkrlatldkqvkg iedggrnirllksgeiarwlvndmmrfqpvqkdnegkplnnskansteyqmlqrsalyn keekptryfrqvnlikssnphpfledtkweecynilsfyrnylkakikflnkpkpedwkk ngyflmlkepktnrktlvqgwknfplprgitepeikewfkrhqdndseeykkvealdrv lvakviplffkeeyfkedaqkeinnvcvqpfysfpynvgnihkpeeknflhceerrklwdk kkdkfkgykakekskmtdekeehrsylefqswnkferelrlvrnqdieltwlctklid klkidelnieelqklrlkdiddtakkeknnilnrvmpmrlpvtvyeidksfnivkdkpl htvyieetgtklkqgnfkalvkdrrlglfsfvktsseaeskskplrvveyelgayq karidiikdmlalektlidndenlptnkfsdmlkswlkgkgeankarlqndvdlvavr afshnqypmynevfkqgmklslssdipekeglgiakqlkdikketierieieiekeirn	10
プレボテラ・プリューリ ティディス(Prevotella pleuritidis) JCM 14110 (NZ_BAJN01000005.1) >WP_036931485.1	mendkrleestcytlnldkhfwaafnlrlarhnvyitvnhinklleirqidndekvldikal wqkvdkdingkarlreilmkhfpleaaiysnnkedkeevkeekgakaqsfskldclfl flekqlqearnyyshykyssessekepefeegllekmyntfgvsirlvkedyqynkdidpek fkhlkerkedfnylftdkdnkgkitkngllffvslflekkdaiwmqqkgrgfkdnrgnek mthefrcsrmlpkirlestqtqdwilldmlnelircpkslryerlqgayrekfkvpfdis idedydaeqepfrntlvrhqdrfpyfalryfydyneifknrlfqidlgtyhfsiykklidg nkedrhlthklygferiqefakqkrpnewqalvkdldiyetsneqylsettphylhngk igirfknkdkkiwpsletngkeneksynldksfqaeafslhellpmmfydlilkkeep nndeknaivegfikkeikrmyalydafaneeinskegleeycknkgyfqrhlpkqmiail ltnksknmaekakrkkkemikdtkrlatldkqvkgiedggrnirllksgeiarwlvnd mmrfqsvqkdkegkplnnskansteyqmlqrsalynkeqktpyvfqgnlikssnphpf leetkweecnnilsfyrnsyleaknflskpedwkkngyflmlkepktnrktlvqgwkn gfnlprgitepeikewfkrhqdndseeykkvealdrvglvakviplffkeeyfkedaqkei nnvcvqpfysfpynvgnihkpeeknflhceerrklwdkkdkfkgykakekskmtdeke ehrsylefqswnkferelrlvrnqdieltwlctelidklkidelnieelqklrlkdiddt takkeknnilnrimpmqlpvtvyeidksfnivkdkplhtiyieetgtklkqgnfkalv drrlglfsfvktsseaeskskplsklrveyelgayqkaridiikdmlalektlidnden lptnkfsdmlkswlkgkgeankarlqndvdlvairnafshnqypmynevfkqgmklsl ssdipekeglgiakqlkdikketierieieiekeirn	20
プレボテラ・ファルセニ イ(Prevotella falsenii) DSM 22864 = JCM 15124 (NZ_BAJY01000004.1) >WP_036884929.1	mkndnnstkstydltgdkhfwaafnlrlarhnvyitvnhinkvlelknkddqeiidndqg ilaiktlwgkvtdinkkdrleilmkhfpleaaytqssstntkqeeeqakaqsfs lkdclflflekqlrearnyysyhykshksleepkleekllenmynidftnvqlvdkyehnk dinpeedfkhlgraegefnyyfttrnkknitesgllffvslflekkdaiwaqtkikgfk nrenkqkmthefrcsrmlpkirlestqtqdwilldmlnelircpkslryerlqgayrek frvpfpdpadedydaeqepfkntlvrhqdrfpyfalryfydyneiftnrlfqidlgtyhfsi ykkqigdkkedrhlthklygferiqefakenrpdewkalvkdldtfeesnepysietph yhlenqkigirfnknkdkkkkiwpsletktvnerskynlgsfkfaeafslvshellpmmfy ylllnkeepnngkinaskvegieekkirdiyklygafaneeinneelkeycegdiair hlpkqmiailkneykdmakkaedqkkmikdtkrlaalqkvkgevedggrnikplksq riaswlvndmmrfqpvqdrdgyplnnskansteyqllqrtalifgsrerlapyfrqm ligkdnphpfldkdkwehnnilsfyrnsyleaknflsglskpedwkkngyflmlkepktn retlvqgwknfplprgitepeirewfirhqneseeeykkvkdfrigrilvakviplffked yqkeiedyvpfygypfnvgnihnsqegtflnkereelwqgnktkfkyktkeknkekt nkdkfkktdeekesfryldfqswwkferelrlvrnqdieltwlcmelidklkideln eelqklrlkdiddtakkeknnilnrimpmelpvtvyeiddsnniikdkplhtiyikeae tkllkqgnfkalvkdrrlglfsfvetsseaelkskplsklsveylgeyqqrarveiid mlrleetligndeklptnkfrqmdkwlehkktedtdtkndvklleevrnafshnqypm rdriafanikpfsfssantsneeglgiaakklkdktketidrieieieeqtatkr	30
ポルフィロモナス・グラ エ(Porphyrmonas gulae) (NZ_JRAT01000012.1) >WP_039418912.1	mtqeserpyngtytledkhfwaafnlrlarhnayitlthidrqlayskaditndqdvlsf kalwknldndlerksrslrlsilkhfsflegaygkklfesksngnkskkneltkkee lqanalldnlksilfdflqklkdfnryyshyrhsgsselpfdggnmlqrlvndvsvq rvkrdehndkvdprrhfnhlvrkgkdkdryghndnpsfkhhfvdsegmvt eagllffvsl flekrdaiwmqkirkirgfggtetyqgmtnevfcrsrslpkklleslrmdwmlldmlne lvrcpkplydrldreddracfrvpvdlpdeddtgggedpfnktlvrhqdrfpyfalryf dlkkvftslrfhidlgtyhfaikykmigepedrhltrnlygfgriqdfaeehrpeewkr lvrdldyfetgdkpyisqtsphyhiekgkigrfmppegqhlwpsvegttrtgrskyaqd krltaeafslvshellpmmfyflrekysseevsaekvggrikrviedvryaiydaardei ntlkeladcladkgirrhgplkqmiailsqehknmeekvrklqemiadtthrlmdldrq tdrkirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdasgkplnnskansteyrmlqral alfggekertlpyfrqmnltdggnphpfldtrweshtnlsfyrnsylrarkaflerigr sdrmenrpllllkepktdrqtlvagwksefhlprgiteavrdcliemgydevgsrevg fmakavplyferacedrvqpfydsfpfnvgnslkpkkgfrflskeeraeewergkerfrdle awshsaarriedafagieyaspgnkkkieqlldlslweafesklkvradkinlaklke ileaqehpyhdfkswqkferelrlvrnqdieltwmmordlmeenkvegltdgtlylkdi nvqeggslnvlnhvkpmrlpvvyradrghvhkeaplatvryieerdtkllkqgnfkf vkdrrlglfsfvdtggameqypisklrveyelakyqtarvcafeqtleeleslltryp hlpdknfrkmleswsdpllakwpelhgkvrlliaavrnfshnqypmydeavfssirkydp sspdaieermglniahrlseevkqaketveriia	40

ポルフィロモナス属種 (<i>Porphyromonas</i> sp.) COT-052 OH4946 (NZ_JQZY01000014.1) >WP_039428968.1	mteqserpyngtyytleckhfwaaflnlarhnayitlthidrqlayskadietndqdvlsf kalwknfdndlerksrlslilkhfsflegaaygkklfesksngkssknkelttkkeee lqanalsldnlksilfdflqklkdfnrnyshyrhsesselpfdggnmlqrlnvnfdvsvq rvkrdehndkvdphrhfnhlvrkgkddryghndnpsfkhhfvdsegmvt eagllffvsl flekrdaismqkkgirgfggtetyqgmtnevfcrsrlslpkklleslrdtdwmlldmlne lvrcpkplydrlreddracfrvpvdlpdeddtgggedpfkntlvrhqdrfpyfalryf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykkmigeqpedrhltlnlygfgriqdfaeerpeewkr lvrdldyfetgdkpyisqttphyhiekgkigrlrfvpegqhlwpspevgtttrgrskyad krltaeafslsvhelmpnmfyfllrekyssevsaeqvgrkrviedvyaiafdafardei ntlkeladcladkgirrgghlpkqmigilsqerkdmeekvrklqemiadtthrlmdlrdq tdrkiirgrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskansteyrmlqral alfggekrltpyfrqmnlgtggnnphplfhetrweshtnlsfyrslrarkafleirgr sdrvenpcflillkepktdrqtllvagwkgefhlprgiteavrdcliemgydevgsyrevg fmakavplyferacedrvqpfydsfpnvgnslkpkkgfllskedraeewergerfrdle awshsaarrikdafagieyaspgnkkkieqllrdslweafesklkvradinlaklke ileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenkevgldtglylkdiirp nvqeggslnvlnrvkpmrlpvvvyradsgvhvkeaplatvyieerdtkllkqgnfksf vkdrnlnglfsfvdttglameqypisklrveyelakyqtarvcvfeltlrleeslltryp hlpdesfremleswsdpillakwpelhgkvrlliaavrnaafshnqypmydeavfssirkydp sspdaiiermglniahrlseevkqaketveriiqa	10
ポルフィロモナス・グラ エ(<i>Porphyromonas</i> <i>gulae</i>) (NZ_JRFD01000046.1) >WP_039442171.1	mteqserpyngtyytleckhfwaaflnlarhnayitlthidrqlayskadietndqdvlsf kalwknfdndlerksrlslilkhfsflegaaygkklfesksngkssknkelttkkeee lqanalsldnlksilfdflqklkdfnrnyshyrhsesselpfdggnmlqrlnvnfdvsvq rvkrdehndkvdphrhfnhlvrkgkddryghndnpsfkhhfvdsegmvt eagllffvsl flekrdaismqkkgirgfggtetyqgmtnevfcrsrlslpkklleslrdtdwmlldmlne lvrcpkplydrlreddracfrvpvdlpdeddtgggedpfkntlvrhqdrfpyfalryf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykkmigeqpedrhltlnlygfgriqdfaeerpeewkr lvrdldyfletgdkpyisqttphyhiekgkigrlrfvpegqhlwpspevgtttrgrskyad krltaeafslsvhelmpnmfyfllrekyssevsaeqvgrkrviedvyaiafdafardei ntlkeladcladkgirrgghlpkqmigilsqerkdmeekvrklqemiadtthrlmdlrdq tdrkiirgrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskansteyrmlqral alfggekrltpyfrqmnlgtggnnphplfhetrweshtnlsfyrslrarkafleirgr sdrvenpcflillkepktdrqtllvagwkdefhlprgiteavrdcliemgydevgsyrevg fmakavplyferacedrvqpfydsfpnvgnslkpkkgfllskedraeewergerfrdle awshsaarrikdafagieyaspgnkkkieqllrdslweafesklkvradinlaklke ileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenkevgldtglylkdiirp nvqeggslnvlnrvkpmrlpvvvyradsgvhvkeaplatvyieerdtkllkqgnfksf vkdrnlnglfsfvdttglameqypisklrveyelakyqtarvcvfeltlrleeslltryp lpdesfremleswsdpillakwpelhgkvrlliaavrnaafshnqypmydeavfssirkydp sspdaiiermglniahrlseevkqaketveriiqa	20
ポルフィロモナス・グラ エ(<i>Porphyromonas</i> <i>gulae</i>) (NZ_JRAJ01000010.1) >WP_039431778.1	mteqserpyngtyytleckhfwaaflnlarhnayitlthidrqlayskadietndqdvlsf kalwknfdndlerksrlslilkhfsflegaaygkklfesksngkssknkelttkkeee lqanalsldnlksilfdflqklkdfnrnyshyrhsesselpfdggnmlqrlnvnfdvsvq rvkrdehndkvdphrhfnhlvrkgkddryghndnpsfkhhfvdsegmvt eagllffvsl flekrdaismqkkgirgfggtetyqgmtnevfcrsrlslpkklleslrdtdwmlldmlne lvrcpkplydrlreddracfrvpvdlpdeddtgggedpfkntlvrhqdrfpyfalryf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykkmigeqpedrhltlnlygfgriqdfaeerpeewkr lvrdldyfletgdkpyisqtsphyhiekgkigrlrfmpeggqhlwpspevgtttrgrskyad krltaeafslsvhelmpnmfyfllrekyssevsaeqvgrkrviedvyaiafdafardei ntlkeladcladkgirrgghlpkqmiaillsqehkdmeekirkklqemiadtthrlmdlrdq tdrkiirgrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskansteyrmlqral alfggekrltpyfrqmnlgtggnnphplfhetrweshtnlsfyrslrarkafleirgr sdrmenrpfllllkepktdrqtllvagwksefhlprgiteavrdcliemgydevgsyrevg fmakavplyferacedrvqpfydsfpnvgnslkpkkgfllskeeraeewergerfrdle awshsaarriedafagieyaspgnkkkieqllrdslweafesklkvradinlaklke ileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenkevgldtglylkdiirp nvqeggslnvlnrvkpmrlpvvvyradsgvhvkeaplatvyieerdtkllkqgnfksf vkdrnlnglfsfvdttglameqypisklrveyelakyqtarvcvfeltlrleeslltryp hlpdesfrkmlswsdpllakwpelhgkvrlliaavrnaafshnqypmydeavfssirkydp sspdaiiermglniahrlseevkqaketveriiqv	30
ポルフィロモナス・グラ エ(<i>Porphyromonas</i> <i>gulae</i>) (NZ_KQ040500.1) >WP_046201018.1	mteqserpyngtyytleckhfwaaflnlarhnayitlthidrqlayskadietndqdvlsf kalwknfdndlerksrlslilkhfsflegaaygkklfesksngkssknkelttkkeee lqanalsldnlksilfdflqklkdfnrnyshyrhsesselpfdggnmlqrlnvnfdvsvq rvkrdehndkvdphrhfnhlvrkgkddryghndnpsfkhhfvdsegmvt eagllffvsl flekrdaismqkkgirgfggtetyqgmtnevfcrsrlslpkklleslrdtdwmlldmlne lvrcpkplydrlrekdrarfrvpvdlpdeddtgggedpfkntlvrhqdrfpyfalryf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykkmigeqpedrhltlnlygfgriqdfaeerpeewkr lvrdldyfletgdkpyisqttphyhiekgkigrlrfmpeggqhlwpspevgtttrgrskyad krltaeafslsvhelmpnmfyfllrekyssevsaeqvgrkrviedvyaiafdafardei ntlkeladcladkgirrgghlpkqmiaillsqehkdmeekirkklqemiadtthrlmdlrdq tdrkiirgrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskansteyrmlqral alfggekrltpyfrqmnlgtggnnphplfhetrweshtnlsfyrslrarkafleirgr sdrmenrpfllllkepktdrqtllvagwksefhlprgiteavrdcliemgydevgsyrevg fmakavplyferacedrvqpfydsfpnvgnslkpkkgfllskeeraeewergerfrdle awshsaarriedafagieyaspgnkkkieqllrdslweafesklkvradinlaklke ileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenkevgldtglylkdiirp nvqeggslnvlnrvkpmrlpvvvyradsgvhvkeaplatvyieerdtkllkqgnfksf vkdrnlnglfsfvdttglameqypisklrveyelakyqtarvcvfeltlrleeslltryp hlpdesfrkmlswsdpllakwpelhgkvrlliaavrnaafshnqypmydeavfssirkydp sspdaiiermglniahrlseevkqaketveriiqv	40

ポルフィロモナス・グラ エ(Porphyromonas gulae) (NZ_JRAL01000022.1) >WP_039434803.1	mteqserpyngtytledkhfwaafnlarnhayitlthidrqlayskadiitndqdvlsf kalwknfdndlerksrslrslilkhfsflegaaaygkklfesksngkssknkeltkkee lqanalsldnlksilfdflqklkdfnnyshyrhsgsselpfldgngmlqrllynvfdsvq rvkidhehndevdphfyfhnhlvrkgkkdryghndnpsfkhhfvdgegmvt eagllffvsl flekrdaiwmmqkkgirgfkgtetyqgmtnevfcrsrlslpkklkleslrmddwmlldmlne lvrcpkplydrilreddracfrvpvdlpdedddtdgggedpfkntlvzhqdrfpyfalyrf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykkmigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeehrpeewkr lvrdldyfetygdkpyisqtsphyhiekgkigrlfrmpgqhlwpspevgtttrtgrskyagd krltaeafslsvhelmpmmfyfyllrekysseevsaervvggrikrviedvyayidafardei ntrdeldacladkigirrhgplprgmiaailsqehkdmeekirkklqemmadtdhrlldmlrdq tdrkiirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdasgkplnnskansteyrmlqral alfggekerltpyfrqmnlgtggnphpfllhetrweshtnlsfyrslrarkaflerigr sdrvenrpflllkepktdrqtvlvagwkgefhlprgigteavrdcliemghdevasykevq fmakavplyferacedrvqpfydsfpfnvgnslkpkkgfrflskeeraeewergkerfrlak awsysaarriedafagieyaspgnkkkieqlrldslweafesklkvradrinlaklke ileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenkevegltdgtlylkdi nvqeggslnvlnrvkpmrlpvvvyradrsghvhkeaplatvyieerdtkllkqgnfksf vkdrrlmgllfsfvdttgglameqypisklrveyelakyqtarvcvfeltlrleeslltryp hlpdesfremleswsdpllakwpelhgkvrlliavrnafshnqypmydeavfssirkyp sspdaiieermglniahrlseevkqaketveriia	10
ポルフィロモナス・グラ エ(Porphyromonas gulae) (NZ_JRAI01000002.1) >WP_039419792.1	mteqserpyngtytledkhfwaafnlarnhayitlthidrqlayskadiitndqdvlsf kalwknfdndlerksrslrslilkhfsflegaaaygkklfesksngkssknkeltkkee lqanalsldnlksilfdflqklkdfnnyshyrhsgsselpfldgngmlqrllynvfdsvq rvkrdehndkvdphrhnhlvrkgkkdryghndnpsfkhhfvdgegmvt eagllffvsl flekrdaiwmmqkkgirgfkgtetyqgmtnevfcrsrlslpkklkleslrmddwmlldmlne lvrcpkplydrilrekdracfrvpvdlpdedddtdgggedpfkntlvzhqdrfpyfalyrf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykvigepedrhltrnlygfgriqdfaeehrpeewkr lvrdldyfetygdkpyisqttphyhiekgkigrlfrvpegqhlwpspevgtttrtgrskyagd krltaeafslsvhelmpmmfyfyllrekysseevsaekvggrikrviedvyayidafardei ntrdeldacladkigirrhgplpkmgilsgqehknmeekvrklqemiadtdhrlldmlrdq tdrkiirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskansteyrmlqral alfggekerltpyfrqmnlgtggnphpfldetrweshtnlsfyrslrarkaflerigr sdrvenrpflllkepktdrqtvlvagwksefhlprgigteavrdcliemgydevgsykevq fmakavplyferackdrvpqpfydsfpfnvgnslkpkkgfrflskekraeewesgkerfrlak lkeileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenkevegltdgtlylk dirpvnvqeggslnvlnrvkpmrlpvvvyradrsghvhkeaplatvyieerdtkllkqgn fksfvkdrrlmgllfsfvdttgglameqypisklrveyelakyqtarvcvfeltlrleesll sryphlpdesfremleswsdpllakwpelhgkvrlliavrnafshnqypmydeavfssir kydpsspdaiieermglniahrlseevkqaketveriia	20
ポルフィロモナス・グラ エ(Porphyromonas gulae) (NZ_JRAK01000129.1) >WP_039426176.1	mteqserpyngtytledkhfwaafnlarnhayitlthidrqlayskadiitndqdvlsf kalwknfdndlerksrslrslilkhfsflegaaaygkklfesksngkssknkeltkkee lqanalsldnlksilfdflqklkdfnnyshyrhsgsselpfldgngmlqrllynvfdsvq rvkrdehndkvdphfyfhnhlvrkgkkdryghndnpsfkhhfvdsegmvt eagllffvsl flekrdaiwmmqkkgirgfkgtgpyeqgmtnevfcrsrlslpkklkleslrmddwmlldmlne lvrcpkplydrilrekdracfrvpvdlpdedddtdgggedpfkntlvzhqdrfpyfalyrf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykkmigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeehrpeewkr lvrdldyfetygdkpyisqttphyhiekgkigrlfrmpgqhlwpspevgtttrtgrskyagd krltaeafslsvhelmpmmfyfyllrekysseevsaekvggrikrvikdvayidafardei ntlkeldacsadkigirrhgplpkmgilsgqehknmeekvrklqemiadtdhrlldmlrdq tdrkiirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskansteyrmlqral alfggekerltpyfrqmnlgtggnphpfldetrweshtnlsfyrslrarkaflerigr sdrvenrpflllkepkndrqtvlvagwksefhlprgigteavrdcliemgydevgsykevq fmakavplyferackdrvpqpfydsfpfnvgnslkpkkgfrflskekraeewesgkerfrlak lkeileakehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenkevegltdgtlylk dirtdvheggslnvlnrvkpmrlpvvvyradrsghvhkeaplatvyieerdtkllkqgn fksfvkdrrlmgllfsfvdttgglameqypisklrveyelakyqtarvcvafteqtleesll tryphlpdenfremleswsdpllgkwpdlhgkvrlliavrnafshnqypmydeavfssir kydpsspdaiieermglniahrlseevkqaketveriia	30
ポルフィロモナス・グラ エ(Porphyromonas gulae) (NZ_KN294104.1) >WP_039437199.1	mteqserpyngtytledkhfwaafnlarnhayitlthidrqlayskadiitndedilff kgqwknlndndlerksrslrslilkhfsflegaaaygkklfesksngkssknkeltkkee lqanalsldnlksilfdflqklkdfnnyshyrhsgsselpfldgngmlqrllynvfdsvq rvkrdehndevdphfyfhnhlvrkgkkdryghndnpsfkhhfvdgegmvt eagllffvsl flekrdaiwmmqkkgirgfkgtetyqgmtnevfcrsrlslpkklkleslrmddwmlldmlne lvrcpkplydrilrekdracfrvpvdlpdedddtdgggedpfkntlvzhqdrfpyfalyrf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykkmigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeehrpeewkr lvrdldyfetygdkpyisqttphyhiekgkigrlfrvpegqhlwpspevgtttrtgrskyagd krltaeafslsvhelmpmmfyfyllrekysseevsaekvggrikrviedvyayidafardei ntlkeldacladkigirrhgplpkmgilsgqekdmeekvrklqemiadtdhrlldmlrdq tdrkiirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskansteyrmlqral alfggekerltpyfrqmnlgtggnphpfllhetrweshtnlsfyrslrarkaflerigr sdrvenrpflllkepktdrqtvlvagwkgefhlprgigteavrdcliemgydevgsyrevq fmakavplyferacedrvqpfydsfpfnvgnslkpkkgfrflskekraeewesgkerfrlak lkeileaqehpyhdfkswqkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeenkevegltdgtlylk dirpvnvqeggslnvlnrvkpmrlpvvvyradrsghvhkeaplatvyieerdtkllkqgn fksfvkdrrlmgllfsfvdttgalameqypisklrveyelakyqtarvcvafteqtleesll tryphlpdesfremleswsdpilltkwpelhgkvrlliavrnafshnqypmydeavfssiw kydpsspdaiieermglniahrlseevkqaketieriia	40

ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) TDC60 (NC_015571.1) >WP_013816155.1	mteqnekpyngtytledkhfwaaaffnlarhnayitlahidrqlayskadiitndedilfff kgqwnldndlerkarlrsliikhfsflegaaaygkklfesqssgnksskkeltkkekee lqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhpesselpfldgnmlqrllynvfdvsq rvkrdehndkvdphrhfnhlvrkgkkdrygnndnpffkhhfvdregvtteagllffvsl flekrdaiwmgkkgirgfgkgtetyqqmtnevfrcsrslpklkleslrrtdddwmlldmlne lvrcpkslydrleedrarfrvpvdlilsdedtdgaaedpfkntlvrhqdrfpyfalryf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykknigeqpdrhltrnlygfgriqdfaeehrpeewkr lvrdldyfetgdkpyitqtthpyhiekgkiglrffvpegghlwpsspevgatrtrgrskyaqd krftaeafslsahelpmmpmfyifllrekysesaervvggrikrviedvyavydafardei ntrdeldacladkgirrhgllprqmigilsqehkdmeekvrkklqemmadtdhrlmdlrdq tdrkiirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskansteyrmlqral alfggekerltpyfrqmnttggnnpfhlhetrweshtnlsfyrskylkarkafllqsigr sdrvenhrflllkepktdrqtlvagwkgefhlpgrgiteavrdcliemgldevgsykevg fmakavplyferackdrvpqfydypfnvgnslkpkkgfrlskekraeewesgkerfrlak lkkeileakehpyldfkswgkferelrlvknqdiitwmicrdlmeenkevgldtgtlylk dirtvdqeggslnvlnrvkpmrlpvvvyradrghvhkeqaplatvyieerdtkllkqgn fksfvkdrllnglfsfvdtdgalameqypisklrveyelakyqtarvcafeqtleleesll trcphlpdknfrkmleswsdpdlldkwpdlhrkvrliavrnafshnqypmydeavfssir kydpsfpdaieermglniahrlseevkqaketveriiga	10
ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) ATCC 33277 (NC_010729.1) >WP_012458414.1	mteqnerpyngtytledkhfwaaaffnlarhnayitlahidrqlayskadiitndedilfff kgqwnldndlerkarlrsliikhfsflegaaaygkklfesqssgnksskkeltkkekee lqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhpesselpfldgnmlqrllynvfdvsq rvkrdehndkvdphrhfnhlvrkgkkdrygnndnpffkhhfvdreekvtteagllffvsl flekrdaiwmgkkgirgfgkgtetyqqmtnevfrcsrslpklkleslrrtdddwmlldmlne lvrcpkslydrleedrarfrvpvdlilsdedtdgaaedpfkntlvrhqdrfpyfalryf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykknigeqpdrhltrnlygfgriqdfaeehrpeewkr lvrdldyfetgdkpyitqtthpyhiekgkiglrffvpegghlwpsspevgatrtrgrskyaqd krltaeafslsvhclpmpmfyifllrekysesaervvggrikrviedvyavydafargei ntrdeldacladkgirrhgllprqmigilsqehkdmeekvrkklqemivtdhrlmdlrdq tdrkiirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskansteyrmlqral alfggekerltpyfrqmnttggnnpfhlhetrweshtnlsfyrskylkarkafllqsigr sdrvenhrflllkepktdrqtlvagwkgefhlpgrgiteavrdcliemgldevgsykevg fmakavplyferackdrvpqfydypfnvgnslkpkkgfrlskekraeewesgkerfrlak lkkeileakehpyldfkswgkferelrlvknqdiitwmicrdlmeenkevgldtgtlylk dirtvdqeggslnvlnrvkpmrlpvvvyradrghvhkeqaplatvyieerdtkllkqgn fksfvkdrllnglfsfvdtdgalameqypisklrveyelakyqtarvcafeqtleleesll tryphlpdknfrkmleswsdpdlldkwpdlhgnvrliavrnafshnqypmydeavfssir kydpsspdaiieermglniahrlseevkqakemaeriiga	20
ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) A7A1-28 (NZ_CP013131.1) >WP_058019250.1	mteqnekpyngtytledkhfwaaaffnlarhnayitlthidrqlayskadiitndedilfff kgqwnldndlerkarlrsliikhfsflegaaaygkklfesqssgnksskkeltkkekee lqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhpesselpmfdgnmlqrllynvfdvsq rvkrdehndkvdphrhfnhlvrkgkkdrygnndnpffkhhfvdregkvtteagllffvsl flekrdaiwmgkkgirgfgkgtetyqqmtnevfrcsrslpklkleslrrtdddwmlldmlne lvrcpkslydrleedracfrvpvdlilsdedtdgaaedpfkntlvrhqdrfpyfalryf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykknigeqpdrhltrnlygfgriqdfaeehrpeewkr lvrdldcfetgdkpyitqtthpyhiekgkiglrffvpegghlwpsspevgatrtrgrskyaqd krftaeafslsvhclpmpmfyifllrekysesaervvggrikrviedvyavydafardei ntrdeldacladkgirrhgllprqmiaillsqkhdmeekvrkklqemiadttdhrlmdlrdq tdrkiirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskansteyrmlqral alfggekerltpyfrqmnttggnnpfhlhetrweshtnlsfyrskylkarkafllqsigr sdrvenhrflllkepktdrqtlvagwkgefhlpgrgiteavrdcliemgldevgsykevg fmakavplyferackdrvpqfydypfnvgnslkpkkgfrlskekraeewesgkerfrldle awshsaarriedafagienasrenkkieqlldslwetfesklkvadkkiniaiklke ileakehpyldfkswgkferelrlvknqdiitwmicrdlmeenkevgldtgtlylk dirtvdqeggslnvlnrvkpmrlpvvvyradrghvhkeqaplatvyieerdtkllkqgnfksf vkdrllnglfsfvdtdgalameqypisklrveyelakyqtarvcafeqtleleeslltryp hlpdenfrkmleswsdpdlldkwpdlhrkvrliavrnafshnqypmydeavfssirkydp sspdaieermglniahrlseevkqakemaeriiga	30
ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) JCVI SC001 (APMB01000175.1) >EOA10535.1	mteqnekpyngtytledkhfwaaaffnlarhnayitlthidrqlayskadiitndedilfff kgqwnldndlerkarlrsliikhfsflegaaaygkklfesqssgnksskkeltkkekee lqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyyshyrhpesselpfldgnmlqrllynvfdvsq rvkrdehndkvdphrhfnhlvrkgkkdrygnndnpffkhhfvdreekvtteagllffvsl flekrdaiwmgkkgirgfgkgtetyqqmtnevfrcsrslpklkleslrrtdddwmlldmlne lvrcpkslydrleedrarfrvpvdlilsdedtdgaaedpfkntlvrhqdrfpyfalryf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykknigeqpdrhltrnlygfgriqdfaeehrpeewkr lvrdldyfetgdkpyitqtthpyhiekgkiglrffvpegghlwpsspevgatrtrgrskyaqd krftaeafslsvhclpmpmfyifllrekysesaervvggrikrviedvyavydafargei dtldldacladkgirrhgllprqmiaillsqehkdmeekvrkklqemadttdhrlmdlrdq tdrkiirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsgkplnnskansteyrmlqral alfggekerltpyfrqmnttggnnpfhlhetrweshtnlsfyrskylkarkafllqsigr sdrvenhrflllkepktdrqtlvagwkgefhlpgrgiteavrdcliemgldevgsykevg fmakavplyferackdrvpqfydypfnvgnslkpkkgfrlskekraeewesgkerfrldle awshsaarriedafagienasrenkkieqlldslwetfesklkvadkkiniaiklke ileakehpyldfkswgkferelrlvknqdiitwmicrdlmeenkevgldtgtlylk dirtvdqeggslnvlnrvkpmrlpvvvyradrghvhkeqaplatvyieerdtkllkqgnfksf vkdrllnglfsfvdtdgalameqypisklrveyelakyqtarvcafeqtleleeslltryp hlpdknfrkmleswsdpdlldkwpdlhgnvrliavrnafshnqypmydetlffssirkydp sspdaieermglniahrlseevkqakemveriiga	40

ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) W50 (NZ_AJZS01000051.1) >WP_005874195.1	mteqnekpyngtyytleddkhfwaaffnlarnhayitlahidrqlayskadiitndedilfff kgqwknlndndlerkarlrsllilkhfsflegaaaygkklfesqssgnksskkeltkkee lqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyshyrhpesselpfldgnmlqrlynvfdvsq rvkrdehndkvdprrhfnhlvrkgkdkygnndnpffkhhfvdreekvteagllffvsl flekrdaismgkkgirgfgkgteayqgmtnnevfcrrislpklkleslrtddwmlldmlne lvrcpkslydrleedrarfrvpvdlilsdedddtgteedpfkntlvrhqdrfpyfalryf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykknigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeehrpeewkr lvrdldyfetgdkpyitqtthpyhiekgkiglrfrvpeggllwpspevgatrtrgskyaqd krftaeafslshelmpmmfyfllrekysaeasakvqgrikrviedvyavydafardei ntrdeldacladkigirrhgllprgmiaailsqehkdmeekvrkkqlqemiadtdhrldmlrdq tdrkiirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsqgkplnnskansteyrmlqral alfggekertltpyfrqmnttgggnnpflhetrweshntnlsfyrskylkarkafllqsigr sdreenhrflllkepktdrqtllvagwksefhlprgifteavrdcliemgydevgsykev fmakavplyferackdrvpfydyppfnvgnslkpkkgfrlskekraeewesgkerfrdle awshsaarriedafvgyeyaswenkkkieqllqdlslwetfesklkvkadkiniaklkke ileakehpyhdfkswgkferelrlvknqdiitwmncrdlmeenkevgldtgtlylkdir dvqeggslnvlnhvkpmrlpvvvyradrghvhkeaplatvyieerdtkllkqgnfksf vkdrnlnglfsfvdgtalameqypisklrveyelakyqtarvcafeqtleeeslltryp hlpdesfremleswsdp1ldkwpdlqrevrlliavrnafshnqypmydetifssirkyp ssldaieermglniahrlseevklakemveriiga	10
ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) (NZ_CP011995.1) >WP_052912312.1	mteqnekpyngtyytleddkhfwaaffnlarnhayitlahidrqlayskadiitndedilfff kgqwknlndndlerkarlrsllilkhfsflegaaaygkklfesqssgnksskkeltkkee lqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyshyrhpesselpfldgnmlqrlynvfdvsq rvkrdehndkvdprrhfnhlvrkgkdkygnndnpffkhhfvdreekvteagllffvsl flekrdaismgkkgirgfgkgteayqgmtnnevfcrrislpklkleslrtddwmlldmlne lvrcpkslydrleedrarfrvpvdlilsdedddtgteedpfkntlvrhqdrfpyfalryf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykknigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeehrpeewkr lvrdldyfetgdkpyitqtthpyhiekgkiglrfrvpeggllwpspevgatrtrgskyaqd krftaeafslshelmpmmfyfllrekysaeasakvqgrikrviedvyavydafardei ntrdeldacladkigirrhgllprgmiaailsqehkdmeekvrkkqlqemiadtdhrldmlrdq tdrkiirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsqgkplnnskansteyrmlqral alfggekertltpyfrqmnttgggnnpflhetrweshntnlsfyrskylkarkafllqsigr sdreenhrflllkepktdrqtllvagwksefhlprgifteavrdcliemgydevgsykev fmakavplyferackdrvpfydyppfnvgnslkpkkgfrlskekraeewesgkerfrdle awshsaarriedafvgyeyaswenkkkieqllqdlslwetfesklkvkadkiniaklkke ileakehpyhdfkswgkferelrlvknqdiitwmncrdlmeenkevgldtgtlylkdir dvqeggslnvlnhvkpmrlpvvvyradrghvhkeaplatvyieerdtkllkqgnfksf vkdrnlnglfsfvdgtalameqypisklrveyelakyqtarvcafeqtleeeslltryp hlpdesfremleswsdp1ldkwpdlqrevrlliavrnafshnqypmydetifssirkyp ssldaieermglniahrlseevklakemveriiga	20
ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) AJW4 (NZ_CP011996.1) >WP_053444417.1	mteqnekpyngtyytleddkhfwaaffnlarnhayitlahidrqlayskadiitndedilfff kgqwknlndndlerkarlrsllilkhfsflegaaaygkklfesqssgnksskkelskkee lqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyshyrhpesselpfldgnmlqrlynvfdvsq rvkrdehndkvdprrhfnhlvrkgkdkygnndnpffkhhfvdregvtteagllffvsl flekrdaismgkkgirgfgkgteayqgmtnnevfcrrislpklkleslrtddwmlldmlne lvrcpkslydrleedrarfrvpvdlilsdedddtgteedpfkntlvrhqdrfpyfalryf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykknigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeehrpeewkr lvrdldyfetgdkpyitqtthpyhiekgkiglrfrvpegghlwpsevgatrtrgskyaqd krltaeafslshelmpmmfyfllrekysaeasakvqgrikrviedvyavydafardei ntrdeldacladkigirrhgllprgmiaailsqehkdmeekvrkkqlqemiadtdhrldmlrdq tdrkiirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsqgkplnnskansteyrmlqral alfggekertltpyfrqmnttgggnnpflhetrweshntnlsfyrskylkarkafllqsigr sdreenhrflllkepktdrqtllvagwksefhlprgifteavrdcliemgydevgsykev fmakavplyferaskdrvpfydyppfnvgnslkpkkgfrlskekraeewesgkerfrlak lkkeileakehpyhdfkswgkferelrlvknqdiitwmncrdlmeenkevgldtgtlylk dirtdvqeggslnvlnrvkpmrlpvvvyradrghvhkeaplatvyieerdtkllkqgn fksfvkdrnlnglfsfvdgtalameqypisklrveyelakyqtarvcafeqtleeesll tryphlpdknfrkmleswsdp1ldkwpdlhgnvrliavrnafshnqypmydetlssir kydpssdaieermglniahrlseevkqakemveriiga	30
ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) (NZ_CP007756.1) >WP_039417390.1	mteqnerpyngtyytleddkhfwaaffnlarnhayitlahidrqlayskadiitndedilfff kgqwknlndndlerkarlrsllilkhfsflegaaaygkklfesqssgnksskkeltkkee lqanalsldnlksilfdflqklkdfrnyshyrhpesselpfldgnmlqrlynvfdvsq rvkrdehndkvdprrhfnhlvrkgkdkygnndnpffkhhfvdregvtteagllffvsl flekrdaismgkkgirgfgkgteayqgmtnnevfcrrislpklkleslrtddwmlldmlne lvrcpkslydrleedrarfrvpvdlilsdedddtgteedpfkntlvrhqdrfpyfalryf dlkkvftslrfhidlgttyhfaiykknigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeehrpeewkr lvrdldyfetgdkpyitqtthpyhiekgkiglrfrvpegghlwpsevgatrtrgskyaqd krltaeafslshelmpmmfyfllrekysaeasakvqgrikrviedvyavydafargei dtldrldacladkigirrhgllprgmiaailsqehkdmeekvrkkqlqemiadtdhrldmlrdq tdrkiirigrknaglpksgviadwlvrdmmrfqpvakdtsqgkplnnskansteyrmlqral alfggekertltpyfrqmnttgggnnpflhetrweshntnlsfyrskylkarkafllqsigr sdreenhrflllkepktdrqtllvagwksefhlprgifteavrdcliemgydevgsykev fmakavplyferackdrvpfydyppfnvgnslkpkkgfrlskekraeewesgkerfrlak lkkeileakehpyldfkswgkferelrlvknqdiitwmncrdlmeenkevgldtgtlylk dirtdvqeggslnvlnrvkpmrlpvvvyradrghvhkeaplatvyieerdtkllkqgn fksfvkdrnlnglfsfvdgtalameqypisklrveyelakyqtarvcafeqtleeesll tryphlpdknfrkmleswsdp1ldkwpdlhrkvrliavrnafshnqypmydeavfssir kydpssdaieermglniahrlseevkqakemaeriiv	40

ポルフィロモナス・ジン ジバリス (<i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i>) (NZ_LOEL01000001.1) >WP_061156470.1	mteqnerpyngtytledkhfwaaffnlarhnayitlthidrqlayskadi tndedilff kgqwknlndndlerkarlrslilkhfsflegaa ygkklfenkssgnksskkeltkkee lqanalsldnlksilfdflqklkdfnnyshyrhpesselp lfdgnmlqrl ynvfdvsvq rvkrdehndkvdphrhfnhlvrkgkkdrcgnndnpffkhhfvdregkvteagllffvsl flekrdaiwmqkkirgfkkggteayqqmtnevfcrsrslpklkleslrtd dwmllldmlne lvrcpkslydr lreedrarfrvpvdl sdedtdg teedpfkntlv rhqdrfpyfalryf dlkkvftslrfhidlgtyhfaiykknigeqpedrhltrnlygfgriqdfaeehrpeewkr lvrdldyfetgdkpyitqttphyhiekgkiglr fvpegqhlwpspevgatr tgrskyagd krltaeafslsvhelmpmmfyfllrekyseevsaekvggrikrviedvyavydafargei dtldrldacladkgirrghlprqmiailsqehkdmeekvrkk lqemiadt dhrldmldrq tdrkirigrknaglpksgviadwlvr dmmrfqpvakdtsgkplnnskansteyrmlqral alfggkerltpyfrqmnl tggnnphpf lhetrweshtnilsfyrsylkarkaf lqsigr sdreenhrflllkepktdrqt lvagwksefhlprg ifteavrdcliemgydevgsykevg fmakavplyferackdrvpfydy pfnvgnslkpkkg rflskekraeewesgkerfrlak lккеileakehpyldfkswgkferelrlvknqdiitwmmcrdlmeen kvegldtgtlylk dirtevqeqgslnvlrvkpmrlpvvvyrad srghvhkeqaplatvyieerdtkllkqgn fksfvkdr rlnglfsfvdtgg lamegy pisklrveyelakyqtarvcafeqt leelesll trcphlpdknfrkmlswsdplldkwpdlqrevwll iavrnafshnqypmydeavfssir kydpsspdai eermgl niahrlseevkqakemaeri iqa

【表 18】

表 14

バクテロイデス門細菌 (Bacteroidetes bacterium) GWA2_31_9 (仮想タンパク質 A2033_10205) >OFX18020	menqtqkgkgyiyytknedkhyfgsflnlanneieqiieefrirlslkdekniieiinn yftddksytdwerginiilekeylpvidyldldaitdkefekidlkqketakrkyfrtnfsl idtiidlrnfthyfhyfhpisinpvdvakfldknllnvclldikkqkmktddtkqalkdglkd elkklielkkaelkekktitwnitenvegavyndafnmvymknnagvtilkdyhksilpd dkidseklknfslisglvflmsflskkeieqfksnlegfkgkvigengeyeiskfnnsik ymathwifysyltfkgkqkrvntfdketllmgmidelnkvphvevyqtlseqqnefledi neyvqdgneenkksmensivvhpvirkryddkfnyfairfldefanftlkkfvtvagnfwh dkrekqigqsmlltsdrmikeyinvfgklteiakyksdyfsnentletsewelfpnpssyll ignniphvidlihteeakqcciaidrikcttnpakkrnrkskeeiikiiyqknkniky gdptallssnelpaliyellvnkkskeleniivekivngyktagfekgqnlslslitk klkxsepnedkinaekiilainreleitenklniiknnraefrtgarkrhifyskelgqe atwiydlkrfmpasrkewgfhhselqkflafydrnkndakallnmfnwfnndqqlign dlnsafrefhfdkyekylikrdeilegfkfksfnfkddepklkkqikdiyrvfdkryy ikstnaqkeqllskpiclprgfidnkptyiegvkvesnsalfadwyqytsdkhefysf dmprdykeqfekfelnniksiknknlnksdkfiyfrykqdlkikqiksqdlfiklmvde lfnvvfknlnielnlklygtstderfknqliadvqknrekgtstsdnkmnenfwmntipis lncgqieepkvklldigkfrkletddkviqlleydkskvwkkleiedelenmpsyerir reklkkgiqefehfllekekfdginhpkhfeqdlpnfnktyvingvlrknksklnyteidk lldlehisikdietsakeihlayflihvnrnkfgnhqlpkleafeimkkykknneetyae yfhkvssqivnefknslekhs	10
クリセオバクテリウム・ジ エジュエンス (Chryseobacterium jejuense) (仮想タンパク質 SAMN05421542_0666) >SDI27289.1	mektgtglgiyydhtklgdkyffggffnlaqnnidnvikaifiikffperdkdinaqfl dicfkndadsdfqkknkflrihfpvigfltsdndkagfkkkfalllktiselrnfthy yhksiefpsellfddifvktseikkklkddktqqlnknlnseeydiryqgqierik elkagqkrvsltdetairngvfnafnhiyrdgenvkpsrlyqssyepdpaaengisls qnsilfllsmflerketedlksrvkgfkakikqgeeqisglkfmathwvfyfclfgkik qklstefheetllliqiideliskvpdevysafdsktkekflinedineymkegnadlsledsk vihpvirkryenkfnnyfairfldeylsstslkfghvghnyvhdrrkvinghtgfqteriv kdrikvfglrslsnislkadyikeqlpndsnqweifpnpssyfidnnvpihlvadeatk kgielfdkdkrrkeqpeelqkrkgkiskynivsmiyeakgkdklrideplallslneipa llyqilekgatpkdieliiknlterfekiknydpetpapasqiskrlrntttakgqeal naekislliereientetklssieekrlkakkeqrntpprsifnsdlgriaawladdi krfmpaeqrknwkyqhsqqlqslayfekrpqeaflllkegwtdsdgssywnnwmsfl ennhfebfkynylmkrvkyfseलग्निकqhtntkflrkfkqgmpadlfpkrhyilkdl eteknkvlskplvlsrglfdnnptfikgvkvtenpelfaewysygyktehvfqhfgygwr dynellldselqkgsnfaknsiynresqldliklkdlikkikikqdlfklriaeklfen vfnypttllsdefyltqeeraekerialaaslrreegdnspniikddfiwsktiafrskqi yepaiklkdigkfnrflvlddeeskaskllsydknkiwnkeqelerelsigensyevirrek lfkeiqnlelqilslnswdginhpremedqkntnrhpnfkmylvngilrkniinlykede dfwleslkendfktlpsvletksemvqlflvilirngfahnqlpeiqlfyfirknype ignntvaelylnliklavqklkdn	20
クリセオバクテリウム・カ ルニプロラム (Chryseobacterium carnipullorum) (仮想タンパク質 SAMN05444360_11366) >SHM52812.1	mnrvtgmgvysydhktkdekdhffggflnlaqnditavikafcikfdknpmssvqfaescf tdkdsdtdfqnkvryvrthlvpigylngygdrrntfrqklstllkavdslnrfythyhsp lalstelfelltdtfasvavevqghkmkddktrqllskslaeeldirykqqlerikelke qgknidlrdeagirngvlnaafnhiykegeiakptlsyssfyggadsaengitisqsgl lflslmflgkkeeiedksrirkfakivrdgeenisglkfmathwvfyfclfgkikqqlrsl tdfheetllliqiideliskvpdevyhdftatrekfvedineyiregndefslgdstiinh virkryenkfnnyfavrflddefikfplsrfgvhlgnfvhddrikdihgtgfqtervvkdri kvfgklseisslkteyiekeldldsdgtweifpnpssyfidnnpiyistnktfkngsse fiklrrkekpeemkmrgedkkekrdiasmignagslnsktplamslsnempallyeilvk kttpeelieliikeklldshfeniknydepklpasqiskrlrnttdkgkvinpeklhl inkeidataekfallaknrkelkekfrgkplrqtfifsnmelgreatewladikrfmpdil rknwkyqhnqlqqlsaffnsrpkeafatilqdgwdfadgssfwngwiinsfvknrsfeyf yeayfegrkeyfsslaenikqhtsnhrnlrrfidgqmpkglfenrhyllenleteknkil skplvfprglfdtkptfikgikvdeqpelfaewygygystehvfqnfygwerdyndlles elekdndfksnshysrstsleliklkdlikkikikqdlfklkiahgihfenikfyasf sldelyltqeerlnkeqaeliqsrkegdhsdniikdnfigsktvtysesqisepnvklk digkfnrfllddkvktllsyndekvwknldldlelsigensyevirrekfkkkqnfelq tldwpgngtdhpeefgttdnkgvnhpnfkmyvvnigilrkhtdwfkegednwnlenlth fknlsfgeletksksiqtafliimirngfahnqlpavqffefiqkxypeiqgsttselyl nfinlavvellellek	30
クリセオバクテリウム・ウ レイリチカム (Chryseobacterium ureilyticum) (仮想タンパク質 SAMN05421786_1011119) >SIS70481.1	metqilngisydhktkdekdhffggflntaqnnidlikayiskfessprklnsvqfpdv cfkknssdadfghklqfirkhlvpigylkyggnrevlkekfrlllqavdslnrfythyh kpiqlpneilltldtifgeignevrqnmkddktrhlkknlnseeldfryqeqlerlrkl kseggkvdldrdeairngvlnaafnhiykegeiakptlsyssfyggadsaengitisqsgl gllfllsmflgrrremedlksrvrgfkariikheeqhvsqglkfmathwvsefcfgkiktr lnadyheetllliqiideliskvpdelysrfdvatrerfiedineyirdgkedkslieskiv hpvirkryeskfnnyfairfldefvntftrfvgvagnyvhddriksiegtgfktelrvkd rikvfgklstissikaelyakavnitddtgwellphpsyvfidnnpihltdvpsfknvg keyqekrklqkpeemknrggdkmhkpaisskigkskdninpespallsmneipallyei lvkkaspeeveakirqlktavferirdydpkvpplpasqsvskrlrnttdtlysynkeklvel ankeveqterklalitknrrrekvkgkfrqkvfknaelgteatwlandikrfmpqeq kknwkyqhnqlqqlsaffnsrpgearsllqagwdfsdgssfwngwmsfardntdfdg yesylngmrmyflrladniaqqsstnklnisfikqgmplkldrrlymlelateknkil skplifprgiffddkptfkkgvqvseepafadwysygydvkhkfgefayawdrdyeellre elekdtaftknsihysresqieallakkqdlkvkvrqldlylklmaelflenvfghelal pldqfylvteerlkqeqeaiqvqrpkqddspnivkenfiwsktipfksgrvfepnvklk digkfnrfllddkvktllsyndekvillsynnteigkqvieneliigagsyefirreqlfkeiqgmkrsl lrsrvrgmgvpirlnlk	40

シノミクロビウム・オセア ニ(Sinomicrobium oceani) >WP_072319476.1	mesttttghlkyqhdldfedkhyfgggvnlavqnieisfqaafaerygiqnpkrkngvpai nnifhdnisisnykeylklflkqylpvvgfleksneinifefredfeilinaiyklrhfyt hyhspikledrfytclnelfvavaiqvkkhkmksdktrqllnknlhqilqqllieqkrek lkdkkaegekvsldtksienavlnadafvhlldkdenirlnyssrlsediitkngitlsis gllflslsflqrkaedlrsriegfkgkgnelrfmathwvvsylnvkrikhrlntdfqke tlliadiadelskyldevyktldhenrskfledineyiregnedaslneestvvhgvirkry enkfhylvlryldefvdfpslrfqvhlgnyihdrdrkvidgtntftrvikepikvfgkl shvsklksdymeslsrehkngwdvfpnpsynfvghnpiifinlrsasskgkelyrdlmki ksekkksreegipmerrdkgptkieisnqidrnknidnnfkdiypgeplamlslnelpal lfellrrpsitpqdiedrmevkllyerfqiiirdykpgdglstskiskklrkadnstrldgk kllraiqteternareklhtleenkalqknrkrtrvyttreggreaswlaqdlkrfmpias rkewrgyhsqllqilafydnqpkqplelleqfwdlkedtyvwnswihkslsqhgfvpm yegylkgrlgyykklesdiigfleehkvkryytqqhlnvifererlyfiktqkkllell arplvfprgiffddkptfvqdkkvvdhpelfadwyvysykddhsfqefyhykrdyneifet elswddidfkdnkrqlnpseqmdlfrmkwdlkkkkikiqdiflkivaediyklkifghkipl slsdfyisrqrerltldeqavaqsmrlpgdtsenqikesnlwqttvpyekeqirepkiklk digkkyflqqqkvlnllykdpqhvwtkaeleelyigkhsyevvrrelmlqkchqlekh ileqfrfdgsnhpreleggnhpnfkmvinyngiltkrgeleieaenwlelgnsknsldkv evelltmktipeqkafllilrnkfahnqlpadnyfhyasnlmnlkksdtyslfwftvad tivqefmsl
レイケンバキエラ・アガリ ペルフォランス (Reichenbachiella agariperforans) >WP_073124441.1	mktnpliassgekpnykkfntesdksfkkifqnkgsiapiakacknfeiksskspvnrdr rlhyfsvghafknidsknvfyeldesqmdmkptqflalqkeffdfqgalngllkhirnv nshyvhtfekleiqsinqklitflieafelavihsylneeelsyeaykddpqsgqklvqf lckdfypnkeheveerktilaknkrqalehlfieltsdidwklfekhkvtisngkyls fhacflflslflykxanqliskikgfrnddnqyrskrqgiftffskkftsqdvnseeqh lvkfrdviqylnhypsawnkhlelksqypqmdtklmryiveaeyrsfpdgtndhrllflf aireffgqscldtwtgntpinfsnqeqkgfsyeintsaeikdietklkalvlgplnfke kkeqnrlekdldrrekeqptnrveklltrighnmlyvsygrnqdrfmdfaarflaetdy fgdakfkmyqfytsdeqrdhlkeqkkelpkkefeklkyhqsclvdyftyaeqqarypdw dtpfvvennaiqikvtlfnqakkivsvqrnlmlylledalysekrengagkglisgyfvhh qkelkdqldileketeisreqkrefkklpkrllhryspaquindttewnpmevileeaka qeqryqlillekailhqteedflkrnkqgkqfklrfvrkawhlmylkelymnkvaehghhks fhitkeefndfcrwmfafdevpkykeylcdyfsqkgffnnaefkdliestsndlyekt kqrfegwskdltkgsdenkyllanyesmlkddmlyvnishfisyleskgkinrnahghia ykalnnvphlieeyyykdrlopeeykshgklynklktvklledallyemamhyslepalv pkvktkvkdilssniafdikdaaghlyhllipfhkidsfvalinhqsqqekdpdktssl akiqpylekvknsdklkavyhyyykdtphltlryedlnmihshivsqsqvftkvalkleeyf iakksitlqiargisyseiadlsnyftdevrntafhdvpetaysmilqgiesefldrei kpgkpkslselstqgvsvctaflletlhnnlfdkddkkerlskareryefegin

10

20

【0782】

本発明の好ましい実施形態を本明細書に示し、説明したが、当業者には、かかる実施形態が単に例として提供されるに過ぎないことが明らかであろう。ここで、当業者には、本発明から逸脱することなく多数の変形形態、変更形態及び置換形態が想起されるであろう。本発明の実施では、本明細書に記載される本発明の実施形態の様々な代替形態を用いることが理解されなければならない。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義すること、並びにこの特許請求の範囲内にある方法及び構造並びにその均等物が本発明に包含されることが意図される。

30

【図 1 - 1】

図1

- 1 WP_002664492 バージェイエラ・ゾーヘルカム (*Bergeyella zooheicum*)
MENKTSLGNINYPNPKPQDKSYFAGYNAAMENTDSVFRELGRKLGKEYTSENFDDAIFKENISLVEYERYV
KLLSDYPPMARLDDKEVEPIKERENKFNKGIKAVDRDLNRYTHKEHGEVEITDEIFGVLDMLKSTVLTVKKKVKTND
KTEILKKSIEKQLDLCLCKKLYLRTDARKIEKRRNQREGEKELVAPFKYSKDRDDLIAAYNDAFDVYDNNKSKLSESS
KAKYNTKSDPPQEEQDKIPISKNGVFLSLFLTKQIEHAFSKSIAGKATVIDEATVSEATVSHGNSKICFMATHEIFSHL
AYKKLRKRVTAIEINYGEAENAEQLSVYAKETLMMQMLDLSKVPDVPVYQNLSEDVQKTFIEDWNEYLKENNGDVG
MEEEQVHIPVIRKRYEDKFNYFAIRFLDEFAQFPTLRFQVHLGNLYHDSRPKENLJSDRRRIKEITVFGRLSELEHKKALFK
NTETNEDREHYEWFPPNPNYDFPKENISVNDKDFPIAGSLDREKQPVAGKIGIKVLLNQQYVSEVDKAVKAHQKQRK
ASKPSIQNIIEIPIINESNPKEAIVFGGQPTAYLSMNDIHSILEFFDKWEKKKEKLEKGEKELRKEIGKELEKIVKGIQA
QIQQIDKDTNAKILPYQDGNSTADIEKELKDLKQEQNLQKLDQEQTVREKEYNDFIAYQDKNREINKVRDRNHKQYL
KONLKRKYEPARKEVLVYREKGVAVWLANDIKRFMPTDFKNEWKGEQHSLLQKSLAYEYQCKEELKNLPEKVFQ
HLPFKLGGYFQKQYLYQFYCYLDRKLEYISGLVQQAENFSENKVKFVENECKFLKKQNYTHKELDARVQSILGYPIFL
ERGFMDKEPTIIGKTGKNEALFADWFRYKEYQNFQTFYDENTENYLVLEKKQADRKRKTIKYQKKNDVFTLLMAK
HIFKSVFKQSDIQDLSLEDLYQSEERLGNQERARQTGERNTNIYWNKTVDLKLCDGKITVENVKLNKNGDFIKYEQDQR
VQAFALKYENIEWOAFLIKESKEEYNNPYVVERIEQYEVKVRREELLKEVHLIEYILEKVKDEILKKGDNQNFKYIINGLL
KQKNEDEVSKYFNLTPEPDVNINLQKQEAOTLEQKAFVLYIRNKFANQLPKKEFWDYQCKEYKIEKETAEYF
AEVFKKEKALIK
- 2 WP_036860899 プレボテラ・インターメディア (*Prevotella intermedia*)
MEDDKKTTDSIRYELKDKHFWAFLNARHNVTYVNHINKLLEEINGRDGYETTLKNTWNEIKDINKDRLS
KLIHFPPLEAATYRLNPTDTTKQKEQKQAEQSLRSFFVYIKRLDRNHYSHYKHSKSRPFKEGLEKMYNIF
NASIRLVKEDQYQNKDINPDEDKHLDRTEEFNYFTKDNENGTESGLLFFVSLFLEKKDAIWMQKLRGFKDNRENK
KKMTNEVFCRSMLLPKLRQSTQTDWILLDMNLURCPKSLYERLREEDREKFRVPIEADEQDAEQPFKNTRLV
HQDRFFPYFALRYFDYNEITNLRFQIDLYTHFSIYKQIDGQKESHLLTHKLYGERIQTFTQKNRDPVWRVKFTFNSF
ETSKPEYIPETPHYHLENQKIGIRFRNNDKIVPSLTKSEKNEKSKYKLDKSFQAEAFSLVHELLPMFYLLKLTENTD
NDNIEIKKKENKNDKQEKHKEIENKTEIYALYDTFANGEKSIDELECYCKGKDIEIHLPKQMAILDEKLEKGMATEA
ERKQEMLVVDQKSLSDLNQINEENVERKNSSLKSGIASVLVNDMMRFQPVQKDNEGKPLNNSKANSTEYQLL
QRTLAFGSEHERLAPYQKTLIESSNPPHFLKDTWEKCNNLISFSYRSYEAKNFLESKLPEDWEKNQYFLKLEPKTPE
PKTLVQGWKNGFNLPRGIFTEPIRWKFMKHRENTYVAELKRVGLVAKVPLFFSEYKDSVQPMYNYHFNKNGNPKDE
KNFLNCEERRELLRKKKDEFKMTDKKEENPSYLFESWKNFERELRLVRNQDIVTWLLCMELFNKKIKELNVEKIYK
NINTNTTKKEKNTKEEGNEENKIEKNENLIRNIPMRLPIKVVGRENFSENKXKKIRNTFTFYIEEKTDLKQKGNFKAL
EDNRNGLGFSFKVTKRPSYELGESYQKARIEIKDMALEKTLIDKYNLSLDRDNFKMLDLEKLGEP
DKASFQNDVLLIARNAFSHNQYPMNRRIAFANINPSSLSSANTSEKGLGIANQLKDKTHKTEKIEKIEPIKTE
- 3 WP_004343973 プレボテラ・ブッカエ (*Prevotella buccae*)
MQKQDKLFLDRKKNAIFAFKPYITIMEKEKPEYIYELDKHFWAFLNARHNVTYVNHINRREIAELKDD
GYMMGIGKSWNEQAKKLDKXVRLDUMJHFFLEAAAYEMTNSPNNKEQREKEQSEALSNNLKNVLFIEKLQ
VLNRNYYSHYKYESKPIFETSLKNMKNYFVDANVRLXRDYMHENIDMQRDFTHLNRKKQVGRTKNIDSPNFHYH
FADKEGNMTIAGLFFVSLFDKDAIWMQKLGKFGDGRNLRQMTNEVFCRSRISPLKLENVQTKDWMQLMDL
NELVRCPKSLYERLREKDRSFKVPFDIFSDDYNAEEFPKNTLVRHQDRFFPYFVLYFDLNEIFEQLRFQIDLGTYHFSIYN

【図 1 - 3】

図1(続き)

- AINKEYQLRLCEDDRLLFMARVDLYDWEKAQLDKIDKIDNMLGEPVSVSQVIQLEGGQDPAVIAEKALKDVSKLMRY
CYDGRVSKLMPYFANHEATQEQVEMLEHYEDHRRRVFNWFALEKSVLKNELRRFYEEQSGGCEHRRCDALRKA
SLVSEEEYFLVHIRNKSANHQPDQLEIGLPPNVTSGFCCEVSKYKAIICRIIPDIPERRFFGKLEQK
- 6 WP_047447901 アリスティス属種 (*Alistipes* sp.) ZOR0009
MSNEIGAFREHGFAYAPNEKQEATFATYFNALNSVNEGMMFGEVESNPDKIESLOTLPAILRQIASFIWL
SKEDHPKAYSTEYVKVIVTDVLRKLFCYRNYFSCFYLDQTYFSELDVDTAIGELKPNYHFIHFIYSPLEITLFR
WNEGERKYEILRDGIUFFCCLFKRQQAERFLNELRFKRTDEEGRIKRTIFTYKCTRESHKHIGIEQDFLQDIDIGLNRV
PKVCDGVSLSKENERYKRNRETSNESDENKARYRLIREKDKFPYMLRYVDGVFLPCTIFKQNDYQTEKGRGQFHYQ
DAAVAQEERCYNFVNVGNYSSYMPQANQVYRISELQGTISVEELRNMYASINGKDVNKSQYQYLHLHLVEKILT
ISGQTIKEGRVVDVDRPLDKLLRPASNGEELRRELRLKLPKVRCDLLSNRDFSCEGVSVEKRLKAILRHEQLLSQNP
ALHIDKIKSVIDYLYFFSDDEKFRQQTEKAHRLGLDEEFQMYHYLVGDYDSHPALWKELEASGRKPEMRKTSATSL
HGLYMLCKGTVEWKARVAKVYEAIDARVGLKYLKDTKEYTPEQLEREVLKVMWKELEASGRKPEMRKTSATSL
PSKLTLEFYSFLSGKREMSFAAFIRQDKKAQKLWLRNFTYVENIKTLQKQAADAACKLYNLVGEVERVHTNDKVLVL
VAQRYRERLLNVGSKCAVTLDNPERQKQLADVVEYQNAWLSIRFDDDLFTLTHVNSLRLKAYNLIPRKHILAFKEYLDN
RVKQLCCECRNRVRKEDLCCCSRYNSLTWLENKHESEAEATMMLLDVRKLLSLFDERRKAIEYGFPIPSA
LVKECRDLADGLGIRNDVLHNVYIYADAIKLSAYFPEASEAVYIRRTKEVREQRREELMANSSQ
- 7 WP_036929175 プレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) MA2016
MSKECKKQRQEKRRQLKANFISLTKGHVFGAYFMARTNFVKTINYLPIAGVRGNGYSENQJNMLHALFL
QAGRNEELTTEQKQWEKKLRNPEQKTFKQKLLFKHFFVLGPMMAVDADHAKAYLNKKKSTVQTEDETFAMLGKVL
ADCLDIICLMADLTTECRNFYTHQDPNPKSQALADQYLHQEIMAKKLDKVVVASRRLKDRGLSVNEVEFLTGDIDLHQ
EVLKDEFNGAKYDGVKMTFVEYDDYFKISGKRLVNGTVYTTDKDPVNVNMTLPAISDFGLLYKVLFLSKPYAKFL
IDEVRLFEYSPFDDKENMIMSEMISYIRTPRLHKIDSHDSKATLAMDIFGELRRCPMEYLNLDKNAGQPFHDEVKH
PNSHTPDVSKRLRYDDRFPTLALRYIDETELKRIRFQLQLGSFRYKYDKENCIDGRVVRRIQKEINGYGRMCQEVADKR
MDKWGDILQKREERSVKLEHELYNLDFLEDATDSTPYVTDRRPANIHANRIGLYVEDSQNPQKPYKVDENGMYI
PELVVTDKKAPIKMPAPRCALSVYDLPAMLFYELREQDNEFSAEQVIEYEDDYKFFKAVAEGKLKPKFRKPEFRD
FLKKEYPKLRMADIPKQLQLFCSLGHCKYNNKPEPTVEYERDLRTLQHLLEEHLIQRNLEHYHQKDRDMIGNKQDNYGKKS
FSDVRHGAALARYLAQSMMEWQYTLNKKDEGHDKLTGLNYYNLTAYLATYGHQVPEEGFTPRTEQLQVLIUAHLIGGS
NPHPIFNKVLALGNRNIIEYLHLIEELEKHRSRQISLSSNPDKALSALPFIHHRMRYHERTSEEMALAAARYTITQIP
DGLFTPYIILEIKHYTENSELQNALSQDVPVKNLNPCTNAAYLITLYQTKVDNAQPFYLSDKTYTRNKGDEKAESEFSF
KAYELSVLNNKKNDTFFPEMIDQYERLSAKLLDGGDGNPVPEVGEKGKPAATDSQAGNTVLMKRYRYSEVDYAEK
LTDNRMKISFGGEWEKLPKRWKQDKIIRDRDTRRQMRDELDQRMPRYRIDIKDNERTLRRYQTDQMVLLAEKMFNT
IISQSEFNWQKMLRSKVCNEAFLRQTLTRFVPTVGETTYVEQENMSLKNYGEFYRLTDDRMLSLNNIVETLKNP
ENGDLVIRHTDLMSLEAAYDQYRSTFPMQISQENILTNNAVLDDPDADGFVWREDLPKRNNFASLELINQNNVEL
DDERKLVIAIRNAFHSNYYNIFSLKIDVHKLPEVAKGHLQILQSLMGVEITK
- 8 WP_004919755 リエメラ・アナティステイファー (*Riemerella anatipestifer*)
MEKPLPNVVTYLUKHFVWAGNRIARHNAFITCHINEQLKTPSDNKKIVDVVCTWNNILNNDHDLKKS
QLTEILKHPFLTAMCYHPKKEGKKGHGOKEQKESEASQAEALNPSKIEALEILVNLQSLHNSYSHYKHKPD
AEKDIFKHYKAFDASLRMVEYKHAFTVNLTRDFAHLNRKKGNKQNDPNDYRFLFEKQDFFTESGLFTFLNLFDRK

【図 1 - 2】

図1(続き)

- KRIGDEDEVRLTHHLYGFARIQDFAPQNPQPEWKRVLKVDLHDFETSQEPYISKTAHPHYHLENEKIGIKFCSAHNNLPSSL
QTDKTCNGRSKFNLTGTQTAFAFLSVHELLPMFYLLTKDYSRKESADKVEGIRKEISNIYAIYAFANNEINSIADLTR
RLQNTNLLQGHLPKQMSILKGRQKDMGKEAERKIGEMIDDQRRLLDCLCKQNTQKIRIGKRNAGLLSGKIDWLVND
MMRFQPVQKQNNPINNIPNSKANSTEYRMLQRALALFGSENFRLKAYFNQMNVLVGNNDNPHPLAETQWEHQTNILSF
YRNYLEARKKYKLGKLPQNWQYQHFLIKVQKTNRTLTGTWKNFSNLPGRIFTQPIREWFEKHNNKSRIVDQILSD
RVGFVAKAIPLYFAEEYKDNQVFPDYFPGNIRLKPKKRQFLDKKERVELWQKNKELFKNYPSKKTDLAYLDFLSWK
KERELRLKQNDIVTWLMFKELFNMATVEGLKIGEHLRQIDTNTANEESSNNILNIRMPMLPKVPTYETDNKNILKERP
LATFYIETETKVLKQGNFKALVKDRRLNGLFSFAETTLNLEEHPISKLVDELIKYQTRISIFEMTLGLEKKLIDKYSTLP
TDSFRNMLERWLQCKANRPELKNYVNSIARNAFSHNQYPMYDATLFAEVKFTLFPSPVDTKIELNIAPQLLEIVGKA
IKEIKSEKNK
- 4 WP_012458151 ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphiromonas gingivalis*)
MNTVPASENKQSRTEVDDPYQFGLYLNLARENIEVESHVRIKFGKKLNEESLKQSLCDHLLSDVRWTKVY
GHSRRYLPFLHYFPDPSQIEKDHSKTGVPDPSAQRILRELYSLDFLRNDFSHNRLDGTTFEHLEVPDSSIFITGYSLAC
GQAQSFAYFFKPPDDVFLAKNRKEQLSVADGKECLTVSGFAFFICFLDREQAAGMLSRIRGFKRTDENAFARVHETFC
DLICIRPHDRLESNTKEALLDMLNELNRCPRILYDMLPEERAQALPALDENSMNLSSENSLDEESRLLWOGSSDWA
EALTKRIRHQDRFPYLMRFEIEMDLLKIRFVRDLGEIELDSYKVKVGRNGEYDRTIDHALAGKLSDFQNEEEVSRMI
SGEASYPVRSFLAPRAYIDNKIGYCHTSDPVYPSKSTGEKRALSNPQSMGFISVHDLRKLMLMELLCEGFSFRMQSDFL
RKANRILDETAEGKLQSFALPEMRHFRFPQNPSPKSDRREKAEITLEKYQKEIGRKKDLNLSQISAFDMDQDRQLPSRL
LDSEWMNIRPASHSVKRLTYVQLNEDCRRLRKRKDGDKARAIPLVGEATRLQSDVIRMLISETKKQITSAYYNNE
QASLAQYAGNEERDQRAIVAEALRLDPSSGHPFLSATMETAHRYTEGYFYCKYLEKREWLAKIFYRPEKQNTSRISVF
PVPDGEARLKLPIURRMKEQNDLQWIRNKAHPIDLPSHLDFMLKVKDGKKWNEAFKDWSTKYPDG
MQPFGYLRLENLHKGVSYPISPDGKGFADCYTHLMKTYVRDKKRELTAQKVPYDPLAADIKRSFHRAVNEREFMLR
VQEDDRMLMAINKMMMDREEDILPLGKNIDSIDEENQFSLAVHAKVEKEGEGGDNLSLVPATIEIKSKRDKWSKYI
RYRQDRRVGLMSHFPEKATLDEVTKLGEYDRCRIKIDWAFALGAIMSDRDLKPYLHESSREKSGEHSVLKML
VEYKGLCTPDESQYLIIRNKAHNNQFCAAEAMPLIYRDVSAKVGSISSGAKDLPEGSSVDSLWKKYEMIRKILPIDPE
NRFFGKLNNMSQPINDL
- 5 WP_034542281 バクテロイデス・ピオゲネス (*Bacteroides pyogenes*)
MESIKNSQSTGKTLQKDPYFGLYNMALLNVRKENHIRKWLGDVALLPEKSGHSLTTDNLSSAKWTRF
YKSRKFLPFLPEIDSKSYENRRETAECCLTDIDRQKISLLEKVEYGLKQIRMAFSHYHIDQDQSVKHALIJSSEMHRRFIE
NAYSFALQKTRARFTGVGVTEDFLQAEKEGDNKKFAIGGNEGKILKDNALIFCLFLDREAEKFLSRATGFKSTKEKGL
AVRETFCALCCQPHRELNVNPREALLMDMLNELNRCPRILFEMLEDEKQKSLFLPGEEQAHILENSLDECEAID
DPMENTIASLSKRVRNRRFPYLMRYIEKNLPIRIFRIDLGCLEASYPKKMGEEENYRSVTDHAMAGRLTDHNE
DAVLLQITKGTIDEVRSFLYAPRAYNNKIGFVRTSGSKDISFTPLKKGGEHGHCVAVYLTQNTKSGFSIYDLRKLILLSF
DKDKAKNIVSGLEEQCEKHWDLSLENLDAIRTELQKEFFVPLRYTLPRSGKGLVSSKADKQKEYESEFEERKEKTEIL
SEKDFDLSQIPRRMIDEWLVNLPSTRREKLLKGYVETLKDRCRLRVFEKREKGEHLPPIRIGEMATLDAKIRIMVDQV
VKQRTSAYFVEIQRLCAQAGDNNRRLHDSIRELRKDTKNGHPLGVKLRPLGLGHTKLYQRYFEKEKWEATFPYA
ASPKRPFYRVNPPGTQKELPIURNLMKERPEWRDQWQKRNSHPIDLQKLFENICEIRLKDQIKGEPGSKGLWNEMF
KLYWDKEFPNGMQRYRCKRRVEVDFKVVEYSEEGNYKYYEALIDEVVRQKISSKESKLQVEDLTSVRRVFRK
- 9 WP_025000926 プレボテラ・アウランティアカ (*Prevotella aurantiaca*)
MEDDKKTTGSISYELKDKHFWAFLNARHNVTYVNHINKLLEIREIDNDEKVLDIKTLWQKNGKDLNQKARL
RELMTKHPFLEAITAYTNKNDKKEVQKEQAEQSLDKLDFLFDLQEGARNYSHYKYSFSEKPEFEFEGLKMY
NIFNGNQLKINDYQKNDKINPDEDKHLDRKGQKYSFADNGKIELQEARLLFVSLFKELDAIWMQKLNKNGFDNLE
NKKMTHEVFCRSRLMPLKRLSTQTDWILLDMNLURCPKSLYERLQGGDREKFPADQNPDEEDYNAEQPFKNL
LIRHQDRFPYFVLYRDEYNEIFKNLRFQIDLGTYHFSIYKLGQKEDRHLTHKLYGFERIEQKVPKQNRPEWKAIVKLD
TYETSNKRYIESTPHYHLENQKIGIRFRNGNKEIWPSLKTNDENNEKSKYKLDKQYQAEAFSLVHELLPMFYLLKKE
KPNNDENIASVEYGFKIREIRNIFLQYDAFANGEINNIDLEKYCADGIPKRHLPKQMVAILYDEHKDMVKEAKRKQKE
MVKDTKKLLATLEKQTEKEKEDDGRNVKILKSGEIARVLVNDMMRFQPVQKQDNKGNKPLNNSKANSTEYQMLQRS
LYNNEEKPTRYFRQVNLIESNPHFLKWTWEECNMILTFYYSYLTKEIENLKLKPEDWKKNQYFLKLEKPTNRTLV
QGWKNGFNLPRGIFTPIREWFKRHNQNSKEYEALDRVGLVTVKVIPLFKEEYFKDKEENFEDTQKEINDCVOPPY
NFPYNNGNHKKPEKDFLHREERIELWDKKDKFKGYKEIKSKLTKEDKEFRSYLEFQSNWFERELRLVRNQDIVT
WLLCKELDKLIDELNIEELKKLRLNNDTDTAKKEKNILNRMMPMELPVTYEIDDSHKIVKDKPHTIYIEKAEKTLK
QGNFKALVKDRRLNGLFSVKTNSEASEKRNPISKLREVELEYGEQEARIEIQQDMLALEKLINKYKDLPTNFKSEMLNS
WLEGDEADKARFQNDVDLIVARNAFSHNQYPMHNKIEFANIKPFSLYTANNSEKGLGIANQLDKTEKTTDKIKKIE
KPIETKE
- 10 WP_051522484 プレボテラ・サッカロリティカ (*Prevotella saccharolytica*)
MEDKPFWAAFFNARHNVTYVNHINKLLEDEKLGKHEFEREDIFNISDDVMNDANSNGKKRKLIDKIKI
WDDLDLTLTRYKYLRELILKHPFIQAIQKTERTTIDDKRSTSNDSLSQTEGGINDLSSLVNQVSMFFRLQILE
QLRNYSHVHKKSATMPNFEDLLNWMRYIFIDSVNKVEDYSSNSVIDPNTSFSLHYLQDEQKIKPCRPYFTSKDGS
NAGLFLFVSLFEKQDSIWMQKPIGFKKASENYMKMTNEVFCRNHILLKRLVETVYDQKNDVLLDMNLNVEVRCPLS
YKRLTPAAQKNKVPKPNKSSDANRQEDDNPFRILVRHQNRFFYFLRFFDLNFVETLIRFQNLGQYFAICKQKQIGK
KEVHHIIRTLYGSFRLQFTQNTRPEEWNTLVKTTPESSNGDGTQVQVPLDPSYNTPIHYQENIEKIGIKFDGDTAVDT
DIVPSVSTEQKLLMKNFYQTLTPFKADVFLSVHELLPMFYLLCEGMLMKNYAGVLTDRNAFNVDAFVQ
EKINTITDLENYQDKPILGHLPKQMIDLLKGHRDMLKAVEQKAMLIKDTERRLLDKLQKQETDVAANKTGLLK
NGQIADVLVNDMMRFQPVKRDKEGNPINCANSKANSTEYQMLQARAFATYDSCRLSRYFTQLHHSNDSHFLSRFEY
DKQPNLIAFYAALKAEFLNELQPNQWASDNYFLLRAPKNDRQKLAEGWKNFGNLPGLFTEKIKTVFNEHKTIVD

【図 1－5】

図1(続き)

ISDCDIFKNRVGQARLIPVFFDDKKFSDHSPFYRYDFNVGNVSKPTEANYLSKGKREELFKSYKFNKNPIAEKTEYR
EYKNLWVWVKKFARLILWLMKFLNDEKIPKLDILEPRIAIVSYIKLSDQTNTSTAGSNALAKVPMPLAIHI
DSPKPKGAGNNEKENKEFTVVIKEEGTKLLWGNFKTLADRRIKGLFSYIEHDIDILQHPLTRRVLDLELDYQTCRID
IFQQTGLGEALLDKYSLDNTNFYQMLUGWRKKEGIPRNIKEDTDFDKVRNAFNSHQYPSDKIAFRIRKFNPKELI
EEEEGLGIATQMZYKEVEKVVNRKRIEFLD

11 EHO06562 ミロイデス・オドラティミマス (*Myroides odoratimimus*) CCUG 10230
MKDILTDTTEKQNRFSYSHKADKYFFGGFYFLASNNIYEVFEVKNRNTFGKLAKRDNGNLKNYIIHFVKDELS
ISDFEKRVAIFASYPILETVDKKSISERNRTDILTSQRIRQFREMILSVTAVDQLRNFYTHYHSDIENKVLDFLNSFV
STALHVKDYKLTDTKEFLKETAIAEDILIEAYKKQIEKKNTRFKANKREDILNAIYNEAFWSFINDKDKDKKETVVAK
GADAYFEKNHHSNDPFDALNISEKGIVLLSFFLTNKMEDSLKANLTGFGKVDRSGNSIKYMATQIRYSFHTYRGLK
QKIRTSEEGVKETLLMQMIDELSKVPNVVYQHLSSTQQNSFIEDWNEYKYDYEDDVEDTDLRSRVHPVIRKRYEDRFNY
AIRFLDEFFDPTLRQVHLDGVYHRRRTKQLGKVESDRIIEKVTVFARKDINSASAKSYFHSLEEQKKEELDNKWTLFP
NPSYDFPKHEHTLHQGEQKNAGKIGIYVKLRDTQYKEKAALIEARKSLNPKERSATKASKYDIITQJIEANDNVKSEKPLVF
TGQPIAYLSMDIHSMLFSLTDNAELKTPPEEVAEKLDIQGKQNEILSKDPTDKILKYKDNLDKETDITDKITRLDARLD
EIEKILLEGQQRADDYNTSSTKFNIDSKRRKHLHLNAEKGKIGVWLANDIKRFMFKESKSKVKGYQHTLEQLKFAYFD
TSKSDLEILSNMVMVKDYPIELDLVKKSRTVLDVFNKYLEARLEYIENVTRVKSNSIGTPQKTVRKECTFLKSNYTVVS
LDQVERLSMPLFIERGFMDDKPTMLEGSKYQKHEKFAOWFVHYKENSYNQNFYDTEVEIITDKREKAKVTKKIK
QQQKNVDFTLMMVNYMLEEVLKSSNDRLSNELYQTKEERIVNKQVAKDTQERNKNYIWNKVLDQLCDGLVHIDN
VKLKDIGNFRXYENDSRVKEFLTYQSDIIVWSAYLSNEVDSNKLYVIERQLDNYESIRSKELLKEVQECSVYNQVANKESL
KOSGNENFKQYVLQGLPIGMDOVRMILSTDVFKKEEIIQLQGAAGEVQDLYSIYIRNKFAHNQLPIKEFFDFCENNY
RSISDNEYAAYMEIFRSIKEKYAN

12 WP_061868553 プレボテラ・インターメディア (*Prevotella intermedia*)
MEDDKKTTDSIRYELKDFHWAFLNARHNAYITLHIDRLAYSADITNDQDVSFKALWKNFNDNLE
KLIJHFPFLEATTYRQNPOTDTTKQKEEQAQESLESLSKSFVFIYKLRDLNRNHSYHYKSKSLERPKEEDLQNKMYNIF
DVSIQVKEDEYKHTNDINPKDFKHLDKRRKGFHYSFADNEGNTISGLLFFVSLFLEKDAIWWQKLEGFCKSNKSYQ
KMTNEVFCRSRMLPKLRESTQTDQWILLMDLNLIRCPKSLYERLQGVNIRKFFVSDPADEDDYDAEQEPFKNTLVR
HQDRFPYFALRYFDYNEVAFNLRFQIDQLTYHFSYKILGQKQEDRHLTHKLYGFERIQEDQKNRPDEWKAIVKSDT
FKKKEEKEEKPYSETTPHYHLENKIGIAFNKNHNIWPSTQTELNTNKKRYKYLTSIKAEAFSLVHELPMFMYLLKTE
NTKNDNNGVGGKTEKKQGHKIEAIESKKIDYALYDAFANGEINSEDELEKYLKGDIKIIVLPKQMIALLKNEHDMAE
KAEAKQEKMKLATENRLTKLDQLKGKIQNGKRYNSAPKSGEIASWLVNDMMRFQPVQKDENGESLNSKANSTEY
QLLQRTALFQGEHERLAPYFKQTLEIENSPHPLNDTEWEKCSNLSFYRSYLKARKNFLESKPEDWEKNQYFLMLKE
PKTNRETLVGGKWNFMPLRGFTTEPIRKWFMFWHMKYKVDLDKRVGLVAKVTLPFSEKYKDSQPFYNYPPNFVGDV
NPKPEEDFLHREERIELWDDTKDKFKYKAKKKFEMTDOKEEHSYLFQGSWNKFERELRLVRNQDQVITWLTLEID
LKIDENILKELKRLKLDINTDOTAKKEKYNILNRMVPELPTVYKVNKGKGIYIKNLPHTIYVIEAEETKLKQNGFKALVK
DRRLNGLFSVFKTPEASESNPSIKRLVEYELGKYQNARLDIIMDALEAKELIDKYNLSLTDNFHNMILTGWLEKGEAK
KARFQNDVKLLTAVRNAFNSHQYPMYDENLFGNIEFSLSSSNIKESGLDIAALKKEEVSAAKIKQNEEDNKKKEET

13 WP_013997271 キャノサイトファーガ・カニモルサス (*Capnocytophaga canimorsus*)
MKNIQRLKGGNEFSPPKEDKDFYGGFLNLANNIENDEFKEIITRFGVITDENKKPKETFGKELNIFKDKDISIVD

【図 1－7】

図1(続き)

AIRILTVDMDLTDERRIKFRKDRKSIRSADNKMGRGKQISTGKLADFLAKDIVLQFSPVNDNGENKITGLNYIRMQS
AIAVYSGDDYEAQKQKLMFEKARIGKGTTEPHPLVYVFASIPANAVEFYERYURKFTGLYSNEIKKGNRVDPVF
IRRDQNKWKTPAMTKLGRISYEDLPVELPRQMDFNDEIKHLSLPQMEGIDFNNANVTYIAEYMKRVLDLDDQFTFYQ
WNRNRYVMOMLKGEDYDRKSGHQHCTFSVEERGLWKEERASRTERYKQASNKIRSNQMRNASSEIEYITDKRLSNS
RNEYQKSEKIVRYRVRQDALLFLAKTLTLEADDFGERFKLEIMPDAEKGILSEIMPMSFTTEKGKKYITTESEGMKML
NYGDFVFLASDKRIGNLLELVGSDVSKEDIMEEFNKYDQCRPEISIVFNLEKWAFTDYPYELSAVRDREKVDFKSLKILL
NNKNINKEQSDILKIRNAFDHNNYDPKGVVEIKALPEIASIKKAFGEYAIMK

16 WP_014084666 フラボバクテリウム・ブランキオフィルム (*Flavobacterium branchiophilum*)
MENILKLDKNEKISCFNTYKIDAEGLHILKFRDMIQYLNHYPTAWNDLKLSEKNKIMJTKLIDISIEFLNSNPSFAT
DEKPLFITLQKDDFFTEFSIKQLKLSIRNNHNYHNFNDINLKNIDSNVFHLKESFELAIIEKYYKVNKYPLDNEVLF
LKLFIKIDENTALLNYFTNLSKDAEYIETFTTENTKIWNINNEHNLNIEKGKYLTEAMLFITIFYLKEANHLPLKYDFK
NNKSQCELTFFSKKFTSDQIDAEGLHILKFRDMIQYLNHYPTAWNDLKLSEKNKIMJTKLIDISIEFLNSNPSFAT
DIQFKKEAKAFLFASNKRRNQTSFSKSNYNEIIRHNPIKQYRDEIASALTPISFNVKEDKFIFVKKHVLEEYFPNSIGYE
FLEYNDTEKEKEDFGKLYSNPKTNKILRIDNHKLVSHGRRQDRFMDFSMRFLAENNYFGKDAFFKCYKYFDTEQ
DEFLQSNENNDVVKFHKGKVTYTYKIEEHLKNYSYWDPCPVEENNSMSVKSISGSEKILQIQRNLMIYFLENALYENNE
NGQYKLVNNYRELKUDVEESIASLDLKSNDPDKSYKYLPRKLLHNYAPAKQDKAPENAFETLLKKADEFREEQYKLLK
KAEHEKNKEDFVRKNKGQFKLHIFIRKACOMMYFKEKYNTLKEGNAFEKDPVIEKRKNKEHGFHHKMLNLTREEFN
DYCKWMFAFGNDSYKYLRLDFSEKHFFDNQYKYNLFESSVNLAEFAYAKTEKFKKWIETNKPNTNENRYTLENYKNI
LQKQYFVINYHFSYKIDKLNLSENENVIYQKSLNENYISDYFQSKLSDIQYTKCGKLFNKLNSKLEDCLLYEIAJNYID
KKNVHIDIKQILTSKIILTINDANTPKYISVPFNKLERYTEMAIKNQNNLKARFLIDLPLYSKNIKKKGKDSAGYIEIKNLD
EIEDINTNNKIINDSVKFEVLEMELEYFKLDKCKILSKYNIENDSEPSLKQFSKVIKENENEINRYNRIACHFLPLETFDN
LLLNVEQKFIKEQLQNVSTINDLSKPQEYLILFIKFKHNNFYNLNFKNESKTIKNDKVEKKNRVLQKQFNQVILKKL

17 WP_058700060 ミロイデス・オドラティミマス (*Myroides odoratimimus*)
MKDILTDTTEKQNRFSYSHKADKYFFGGFYFLASNNIYEVFEVKNRNTFGKLAKRDNGNLKNYIIHFVKDELS
ISDFEKRVAIFASYPILETVDKKSISERNRTDILTSQRIRQFREMILSVTAVDQLRNFYTHYHSDIENKVLDFLNSFV
STALHVKDYKLTDTKEFLKETAIAEDILIEAYKKQIEKKNTRFKANKREDILNAIYNEAFWSFINDKDKDKKETVVAK
GADAYFEKNHHSNDPFDALNISEKGIVLLSFFLTNKMEDSLKANLTGFGKVDRSGNSIKYMATQIRYSFHTYRGLK
QKIRTSEEGVKETLLMQMIDELSKVPNVVYQHLSSTQQNSFIEDWNEYKYDYEDDVEDTDLRSRVHPVIRKRYEDRFNY
FAIRFLDEFFDPTLRQVHLDGVYHRRRTKQLGKVESDRIIEKVTVFARKDINSASAKSYFHSLEEQKKEELDNKWTLFP
NPSYDFPKHEHTLHQGEQKNAGKIGIYVKLRDTQYKEKAALIEARKSLNPKERSATKASKYDIITQJIEANDNVKSEKPLVF
TGQPIAYLSMDIHSMLFSLTDNAELKTPPEEVAEKLDIQGKQNEILSKDPTDKILKYKDNLDKETDITDKITRLDARLD
EIEKILLEGQQRADDYNTSSTKFNIDSKRRKHLHLNAEKGKIGVWLANDIKRFMFKESKSKVKGYQHTLEQLKFAYFD
TSKSDLEILSNMVMVKDYPIELDLVKKSRTVLDVFNKYLEARLEYIENVTRVKSNSIGTPQKTVRKECTFLKSNYTVVS
LDQVERLSMPLFIERGFMDDKPTMLEGSKYQKHEKFAOWFVHYKENSYNQNFYDTEVEIITDKREKAKVTKKIK
QQQKNVDFTLMMVNYMLEEVLKSSNDRLSNELYQTKEERIVNKQVAKDTQERNKNYIWNKVLDQLCDGLVHIDN
VKLKDIGNFRXYENDSRVKEFLTYQSDIIVWSAYLSNEVDSNKLYVIERQLDNYESIRSKELLKEVQECSVYNQVANKESL
KOSGNENFKQYVLQGLPIGMDOVRMILSTDVFKKEEIIQLQGAAGEVQDLYSIYIRNKFAHNQLPIKEFFDFCENNY
RSISDNEYAAYMEIFRSIKEKYAN

【図 1－6】

図1(続き)

YEKVVNIFADYFYKYLISYLEEMQFKNRVICFRDVMKELLTVEALRNFYTHYDHEPIKIEDRVFYLDKVLVDLSVTN
NKLKTDKTNLEFNQKIGIEELKELCQKQKDYLVGKGKRIKDESEINGIYNNAFQDFCKREKQDKDENHNSVEIKLNKPE
QNKQKQSSATYWELCSKSSSKYTEKSPNRENDKHCLVEPISQKGVILSFFLNKGEIYALTSNIKGFKAKITKEEPTVYDQ
NSIRYMATHRMFSFLAYKGLKRRKIRTEINYNEDGQASSTYETKELTMLQMLDELNKPVPVYQNLSEDDVQKTFIEDWNE
YLKENNGDVGVTMEEEQVHPVIRKRYEDKFNFAIRFLDEFAQFPTLRQVHLGNLYCDKRTKQICDITTEREVKKKITVF
GRSLELENKKAIFLNEEIEKGWVEFPNPSYDFPKENISVNYKDFPVGSLDREKQPVSNKIGIRVIADELDQREIDAKIEK
KLNRNPKNRKANQDEKQERLVNEIVSTNSNEQGEVPVVGQPTAYLSMNDIHSVLYFLINKISGEAETKIEKIEITQKQ
IIGKDATTIKLPYTNANSNSINREKLRLDLEQEQQLKTLLEEQQKREKDKDKSKRKHLEYSEPKGVAVVWLANDIKRF
MPKAFKEQWRGYSLLQKYLAYEYSQKEELKNLPKEVFKHPFKLGYQGOQYQLNQFYTDYLRRLSYVNEILLNIGN
FKNDKDALKATEKECFKFRKQNYIININIQSILVYPIFLKRGFLDEKPTMIDREKFKENKDTELADWFMHYKNYKED
NYQKFYAPLEKVEEKEKFRNKKQJNKQKNDVYTLMMVEYIQKIFGDKFVEENPLVLKIGFQSKAERQQNNTHAATT
QERNLNGILNQPKDIQKQITVKGVKLDIGNFRKYEIDQVRNTFLDYEPKREWMAYPNDWVKEKEQGQGLPNNVI
DRQISQYETVRSKILLDVQLEKIEISDEIKEHRDLKQKGYNFYKYLINGLLRLKNNENVYKFLNTNPEKVNITQL
KQEATDLEQKAFVLYIRNKFAHNQLPKKEFWDYQCEKYKIEKETYAEYFAEVFRKEALEIK

14 WP_039434803 ポルフィロモナス・グラエ (*Porphyromonas gulae*)
MTEQSERPYNGTYTTELDKHFWAFLNARHNAYITLHIDRLAYSADITNDQDVSFKALWKNFNDNLE
RKSRLSLILKHFSLEGAAYGKGLFESKSSGNSKSKNELTKKEKEELQANALSDNLKLSILDFDLQKLKDFRNYSHYRHS
GSSELPFDGNNMLQRLNVDFVSQVRVKIDHEHNDVDPHYHFNHLVRKGGKDRYGHNDNPFFKHHPFVDEGGMVTE
AGLLFVSLFLEKRAIWMQKIRGFKGGTETYQMQMTNEVFCRSRISLPKLKESLRDMDWMLDMLNELVRCPKPLY
DLREDDRACFRVPVLDPEDDTDGGGEDPKNLTVLRHQDRFPYFALRYFDLKKVFTSLRFHIDLTYHFAIYKMKIGE
QPEDRHLTRNLNYGFGRIQDFAEEHRPEEWKRLVRDLDFETGDKPYISQTSPIHYHIEKGILGRFMPQEQHLWSPSEVGT
TTRGRSKYAQDKRLTAEAFSLVHELPMFMYFFLLREKYSEESVAERVQGRKRVIEDVYAVYDAFARDEINTRDELDA
CLADKIRRGHLPQMIALSQEHKDMEEKIRKLQEMMADTDHRLMDLRQTDRIKIRGNAGLPKSGVADWLV
NDMMRFQVAKDASGKPLNNSKANSTERYMLQRLALFGGKERLTPYFRQMLTGGNNPHFPLHETRWESHTNL
SFYSYLRARAKAFLEIRSDRVENRPFLLLEKPTDRQTLVAGWKGEFHLPRGIFTEAVROCLIEMGDEVGSYKEVGFMA
KAVAPLYERACEDRVQPFYDFPNVNSLPKPKGRFLSKERAEEWGERKERFDRLEAWSAARIEDAFAGIEYA
SPNKKKIEQLRLDLSWEAFESKLVRADIRNLAKLKEILEAQEHYPHDFKSWQKFERELRVKNQDIITWMMCRDL
MEENKVEGLDGTGLYKDIRPNVQEQGSLNVLNRVPMRLPVVYRADSRGHVHKEEAPLATYVIEERDQLKQNGFN
KSFVKDRRLNGLFSFVDTGGAMEQYPSIKRLVEYELAKYQATARCVFELTLREESLTRYPHLPDESFRMELSWSDPL
LAKWPELHGKVRLLIAVRNAFNSHQYPMYDEAVFSSIRKYDPPSDAIEERMGLNIAHRLSEEVKQAKETVERIIQA

15 WP_044065294 プレボテラ属種 (*Prevotella* sp.) P5－125
MNIPALVENQKYGYGTSYVMAMLNAQTVLDHIIQKQVADIEGQKQDENENLWFHPVMSHLYNAKNYDQKQ
EKTMTFIERLQSVFFPLKIMAEQREYSNGKYQKNRVEVNSNDIFEVLRKAFGLVKMYRDLTNHYKTYEELKNDGCEFLT
STEQPLSGMINNYTVALRNMNERYGYKTEDLAFIQDKRFVKVDAYGKKSKQVNTGFFLSQDYGNDTQKKLHLSGV
GIALLCFLDKQKQYINIFSLRPIFFSYNAQSEERIIIRSGFINSIKLPDRIHSEKSNKSVAMDMLNEVKRCPDEFLTLSAEK
QSRFIISDDHNEVLMMKSSDRFVPLLLQYIDYKGLFHIRFHNVMGKRLYLLKADKTCDIGQTRVRVIEQLNGFGLREE
AETMRKQENGTFGNSGIRIDFENMKRDDANPANYPIVDITYTHYLENNKVMFINDKEDSAPLPIEDDRIYVKTIP
SCRMSTLEIPAMAFHMLFGSKKTEKLIVDVHNYRKLFLQAMQKEDYAEANIASFGVGLDESLDPLKIDISGNHAKDQVD

【図 1－8】

図1(続き)

18 WP_065213424 フラボバクテリウム・コルムナレ (*Flavobacterium columnare*)
MSSKNESYNNQKQTFNHYKQEDKYFFGGFLNADNLRQVGEKFEKTRINRHNHNNELASVFDYKFNKESKVA
KREHALNLSNYPVFLERIKQHTNHNFEQTRIFEILLDTIKKRLDYTHYHYKIPITNPKYIDLDDTLDLVITIKKKVKVN
DTSRELLKELRLPELTQLKNQKREELIKGKGLLEENLNAVFNHNCPIPLEENKTDQDKONKTVSLRYKRSKPNTEESJNT
QSGFLVLSMFKLHKEFQVFTSGLERFKAKVNTIKKEEILNKNMYIMTHYSYVNFSGKGLKHRIKTDQGVSTQIGNT
THSLTNTNTKEALLTQVJDVLSKVPNEIYETLSEKQKFEEDINEYMRNENEDSTFSSIVSHKVRKRYENKFNFYFAMR
FLDEYAEPLTRFNVNFGDYDKRQKILSIOQDSERIKKEIHLFEKLSVTEYKKNVYLETSENIDLSRPLFPNPSYMA
NNNIPFYDSRNSNDLDEYLNKQKKAQSQKKNRNLTFEYKNKQSDKADIAEMLQKIGLQDQRSTIGSNELPSMLY
EIVVKDKGAELNKAQKIREQYQISDRDLSPOKQDNITLTKITNTDSSVTFENQPIODPRLNKALQKELTLQEKLNV
KEHEIVDNYNRNKNTYFKFNQPKNKVDOKLQRKYVYFNRIRQEANWLASDLHFMKNKNSLWKGVMHNEQLSFLA
FEDENKICALLTEYMLKEDCILTGLKNLFLKHGNFIDIFYKELKLEDFTSTFLENGFGLPKKILKESLRLKYIV
FQKROFIKELEEKNNLYADAINLSRGIDEKPTMIPFKKPNPDEFASVWASVYQNNYQSYFELTPDIVERDKKKYKLN
RAINVKIQDYLYKMLVDTLYQDLFNQPLDKSLDSFYSKAEREKIKADAKAYQLNDSLLWNKVHLSLQNNRITANPK
LKIDGKYKRALQDEKIEATLLTYDARTWYALQKPEKENEDYKELHYTALMBNEQYEVKRSKELLQVQKELEKIDKPY
DFSNASHPEDEIEDKGRHPRNFKLYITKALLNESEIINLENIDIEILLKYDYNTTELEKIKKNMDEDEKAKINTKENY
NKITNVILKALVLIIIRNMAHNNYPPKFIYDLANRFVPKKEEYFATYFNRVETITKELWENKEKKDKTQV

19 WP_053444417 ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*)
MTEQSERPYNGTYTTELDKHFWAFLNARHNAYITLHIDRLAYSADITNDQDVSFKALWKNFNDNLE
RKARLSLILKHFSLEGAAYGKGLFESQSSGNSKSKKESKKEELQANALSDNLKLSILDFDLQKLKDFRNYSHYRHS
ESSELPFDGNNMLQRLNVDFVSQVRVKRDHEHNDKVDPHRHHNLVRKGGKDKYGNNDNPFFKHHPFVDEGGMVTE
AGLLFVSLFLEKRAIWMQKIRGFKGGTETYQMQMTNEVFCRSRISLPKLKESLRDMDWMLDMLNELVRCPKPLYD
RLREEDRARFRVPVLDPEDDTDGTEEDPKNLTVLRHQDRFPYFALRYFDLKKVFTSLRFHIDLTYHFAIYKMKIGE
DRHLTRNLNYGFGRIQDFAEEHRPEEWKRLVRDLDFETGDKPYITQTPHYHIEKGKIGLRFVPEGQHLWSPSEVGT
GRSKYAQDKRLTAEAFSLVHELPMFMYFFLLREKYSEESVAEKVQGRKRVIEDVYAVYDAFARDEINTRDELDA
CLADKIRRGHLPQMIALSQEHKDMEEKVRKLQEMMADTDHRLMDLRQTDRIKIRGNAGLPKSGVADWLVLRDYM
NDMMRFQVAKDASGKPLNNSKANSTERYMLQRLALFGGKERLTPYFRQMLTGGNNPHFPLHETRWESHTNLFSYRS
YLEARKAFQSIGRSDRVENRPFLLLEKPTDRQTLVAGWKGEFHLPRGIFTEAVROCLIEMGDEVGSYKEVGFMA
KAVAPLYERACEDRVQPFYDFPNVNSLPKPKGRFLSKERAEEWGERKERFRLAKLKEILEAKEHPHYDFKSWQKFER
LVLNKNQDITWMMCRDLMEENKVEGLDGTGLYKDIRPNVQEQGSLNVLNRVPMRLPVVYRADSRGHVHKEEAPLATYVIEER
DQLKQNGFNKSFVKDRRLNGLFSFVDTGGAMEQYPSIKRLVEYELAKYQATARCVFELTLREESLTRY
PHLPDKNFKRMLESQDPLDKWPDHLGNVRLIIVAVRNAFNSHQYPMYDETFSSIRKYDPPSDAIEERMGLNIAHRL
SEEVKQAKETVERIIQA

20 WP_039428968 ポルフィロモナス属種 (*Porphyromonas* sp.) COT－052 OH4946
MTEQSERPYNGTYTTELDKHFWAFLNARHNAYITLHIDRLAYSADITNDQDVSFKALWKNFNDNLE
RKSRLSLILKHFSLEGAAYGKGLFESKSSGNSKSKNELTKKEKEELQANALSDNLKLSILDFDLQKLKDFRNYSHYRHS
ESSELPFDGNNMLQRLNVDFVSQVRVKRDHEHNDKVDPHRHHNLVRKGGKDKYGNNDNPFFKHHPFVDEGGMVTE
AGLLFVSLFLEKRAIWMQKIRGFKGGTETYQMQMTNEVFCRSRISLPKLKESLRDMDWMLDMLNELVRCPKPLYD
RLREDDRACFRVPVLDPEDDTDGGGEDPKNLTVLRHQDRFPYFALRYFDLKKVFTSLRFHIDLTYHFAIYKMKIGE

【図 1－9】

図1(続き)

PEDRHLTRNLVYGFRIQDFAEHRPEEWKRLVRDLDFETGDKPYISQTTPHYHIEKGKIGLRFVPEGQHLWSPVEVGT
RTGRSKYADQKRLTAFAFLVHELMPPMFYFLREKYSEEVSAEKVQGRKRVIEDVYAIYDAFARDEINTLKELDACLA
DKGIRRGHLPKQMIGILSQERKDMEEKVRKKLQEMADTDHRLDMLDRQTDKIRIGRKNAGLPKSGVIADWLVRDM
MRQFPVAKDTSGKPLNNSKANSTEYRMLQRALALFGGEKERLTPYFRQMNLTGGNNPHPLHETRWESHTNLSFYRS
YLRARAKAFERIGRSDRVENCPLLLKEPKTDRLTVAGWKGFEHLPRGIFTEAVRDCLIEMGYDEVGSYREVGFMAKA
VPLYFERACEDRVQFPYDSPFNVGNLSLPPKKGRFLSKEDRAEEWGERKFRDLEAWSHSAARRIKDAFAGIEYASPGN
KKKIEQLRLDLSLWEAFESKLVKRAADKINLAKLKELEAQEHYPYHDFKSWQKFERELRLVKNQDIITWMMCRDLMEEN
KVEGLDGTGLYLDIRPNVQEQGSLNVLNRVKPMRLPVVYRADSRGHVHKEEAPLATVYIEERDTKLLKQGNFKSFVK
DRRLNGLFSFVDTGGLAMEQYPIKRLVEYELAKYQTAARVCVFELTLRLEESLSRYPHLPDESFERMESWSDPLLAKWP
ELHGKVRLLIUVARNAFSHNQYPMYDEAVFSSIRKYDPPSPDAIEERMGLNIAHRLSEEVKQAKETVERIIQA

21 WP_050955369 プレボテラ・インターメディア (Prevotella intermedia)
MEDDKTKESTNMLDNKHFWAFAFLNLRHNVYITVNHINKVLELKNKQDQDIINDQDILAIKTHWEKVNG
DLNKTERLRLMTKHFPLETAIYTKNKEDKEEVKQKQAKAQSFDSLKHCLFLLEKLQEARNYSHYKYSESTKEPML
KELLKMYNIFDDNIQVQKNDQHNKNDINPDEDFKHLDRTEEEFNYYFTTNKKGNITASGLLFVSLFLEKDAIWMQK
LRGFKDNRESKKMTHEVFCRSRMLPKLRLESTQTDQDWMMLNLRCPKSLYERLQGEYRKKFNVPFDSADEYD
AEQEPKNTLVRHQDRFPYFALRYFDYNEIFNLRFQJDLGTYHFSYKLGIGQKEDRHLTHKLYGFERIQEFAQNRTDE
WKAIVKDFDITYETSEEPYSETAPHYHLENQKIGIRFRNDNDIWPSLKTNGENNEKRKYKLDKQYQAEFLSVHELLPM
MFYLLKKKEPNNDKKNASIVEFGIKREIRDIYKLYDAFANGEINNIDLEKYCEDKGIPKRHLPKQMVAILYDEHKDMA
EEAKRKQKEMVKDTKKLLATLEKQTGEIEDGGNRILRLKSGEIARWLVNDMMRFQPVQKDNEGNPLNNSKANSTEY
QMLQRSALALYNKEEKPTRYFRQVNLINSSNPHFLKWTWKEECNNILSFYRSYLTKEIFLNLKLPEDWEKNQYFLKLE
PKTNRETIVQGWKNGFNLPRGIFTEPIREWFKRHQNDSEYEKVTLDRLVGLVTKVIFLFFKKEDSKDKEEYKDKDAQKE
INNVCQPFYGFPPYVGNHNPDEKDFLSEERKLLWGDKKYKFGYKAKVKSKLTDKEKEEYRSYLEFQSWNKFERELR
LVRNQDIVTWLLCTELIDKLVGELNVEELKRLKLDIDTDATAQKQNNILNRVMPMLPVTYIEIDSSHNVKDRPLHT
VYIETKTLLKQGNFKALVDRRLNGLFSFVDTSSSETLKSNIKSLVEYELGEYQNAIETIKDMLLEETLUEKYKTLPD
HNSFMDLNGWLEKDEADKARQNDVKLLAVARNAFSHNQYPMRNRIAFANINPFLSSADTSEKKLDIANQLDKDT
HKIKRIIEIEPIETKE

【図 2】

図2

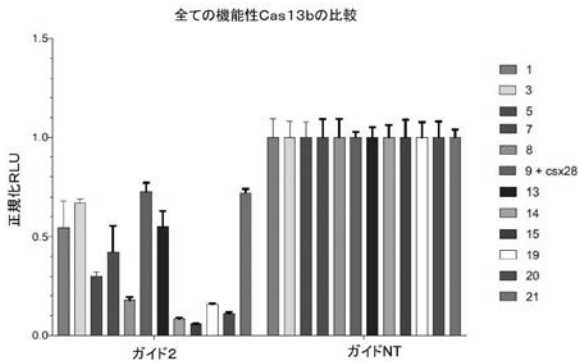
オルソログ	供給源	哺乳類細胞における有効性
1	バージエラ・ズーヘルカム	中程度
2	プレボテラ・インターメディア	低い／なし
3	プレボテラ・ブッカエ	中程度
4	ボルフィロモナス・ジンジバリス	低い／なし
5	バクテロイデス・ピオゲネス	高い
6	アリスティベス属種ZOR0009	中程度
7	プレボテラ属種MA2016	中程度
8	リエメラ・アナティベステイファー	高い
9	プレボテラ・アウランティアカ	中程度 (csx28有り)
10	プレボテラ・サッカロリチカ	なし
11	ミロイデス・オドラティミマス CCUG 10230	低い／なし
12	プレボテラ・インターメディア	低い／なし
13	キャブノサイトファーガ・カニモルサス	中程度
14	ボルフィロモナス・グラエ	ゴールド
15	プレボテラ属種P5-125	ゴールド
16	フラボバクテリウム・ブランキオフィルム	低い／なし
17	ミロイデス・オドラティミマス	低い／なし
18	フラボバクテリウム・コルムナレ	低い／なし
19	ボルフィロモナス・ジンジバリス	ゴールド
20	ボルフィロモナス属種COT-052 OH4946	ゴールド
21	プレボテラ・インターメディア	中程度

凡例:

低い／なし 全てのガイド <50%のルシフェラーゼノックダウン
中程度 大多数のガイド 約50%のルシフェラーゼノックダウン
高い 多数のガイド >50%のルシフェラーゼノックダウン
ゴールド 大多数のガイド >80%のルシフェラーゼノックダウン

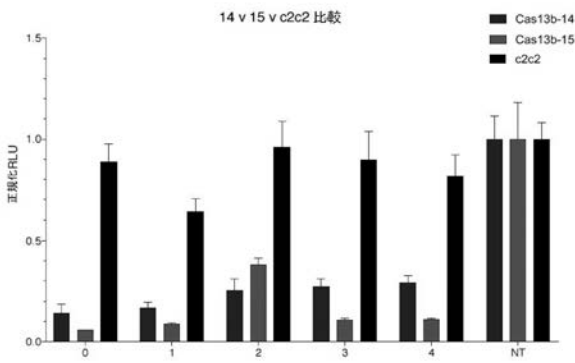
【図 3】

図3



【図 4】

図4



【図 9】

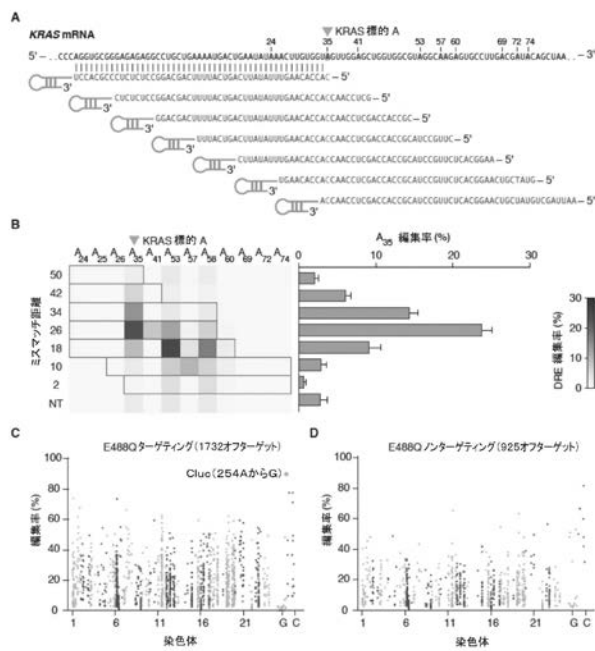


図9

【図 10】

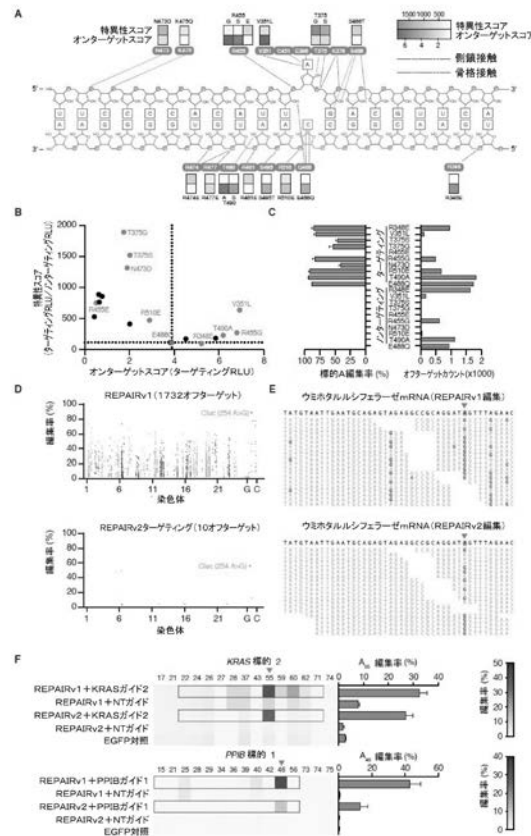


図10

【図 11】

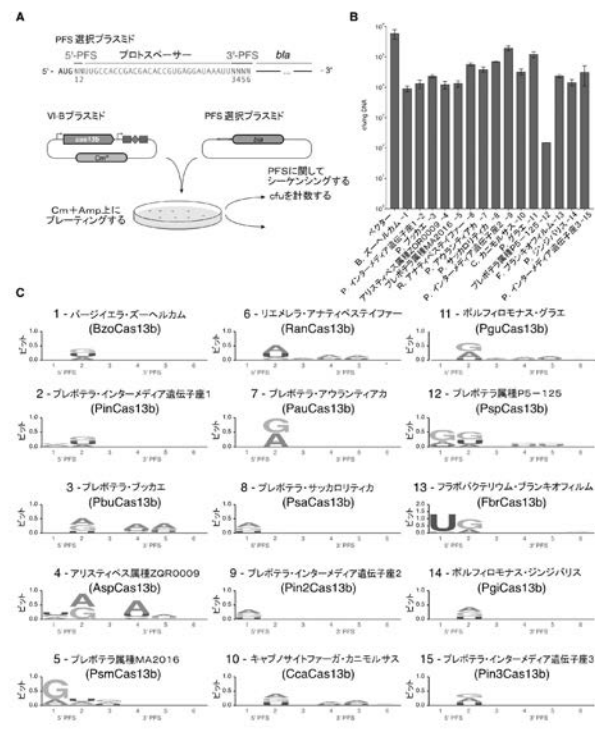


図11

【図 12】

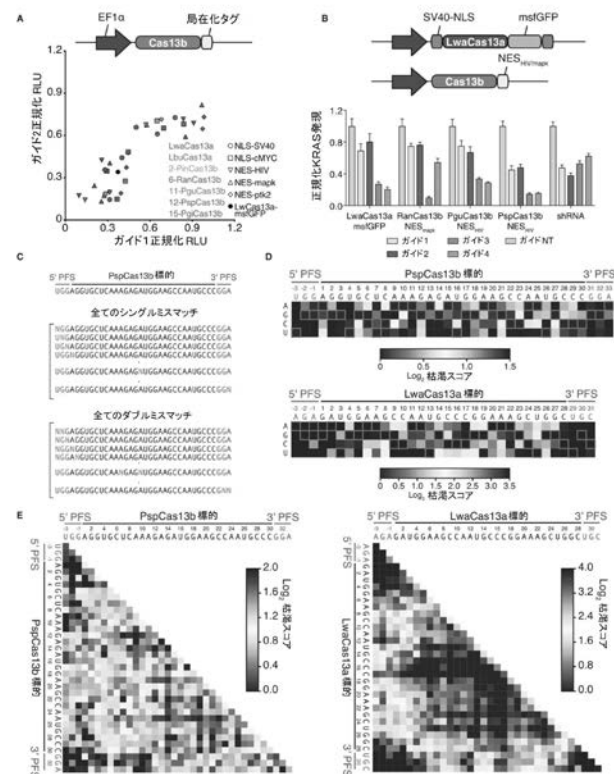


図12

【図 13】

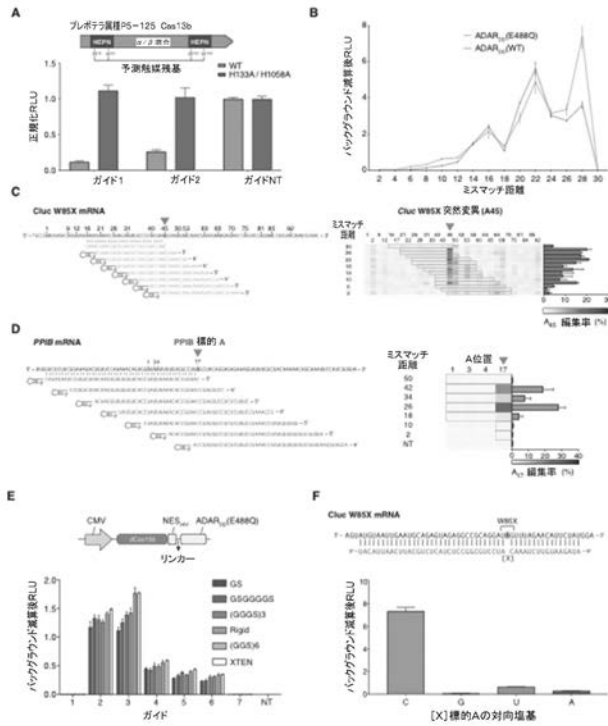


図13

【図 15】

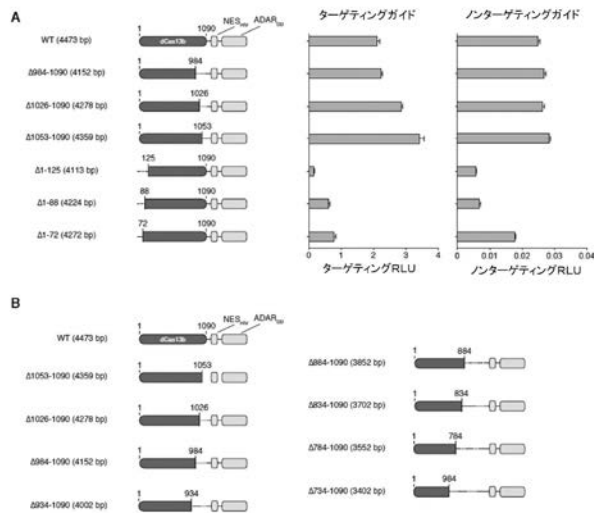


図15

【図 14】

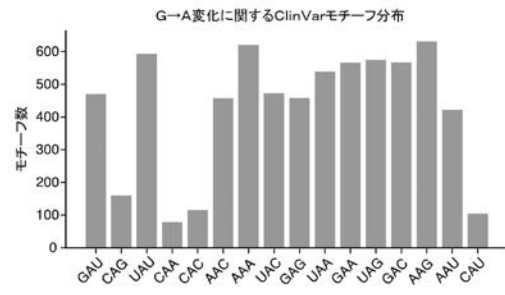


図14

【図 16】

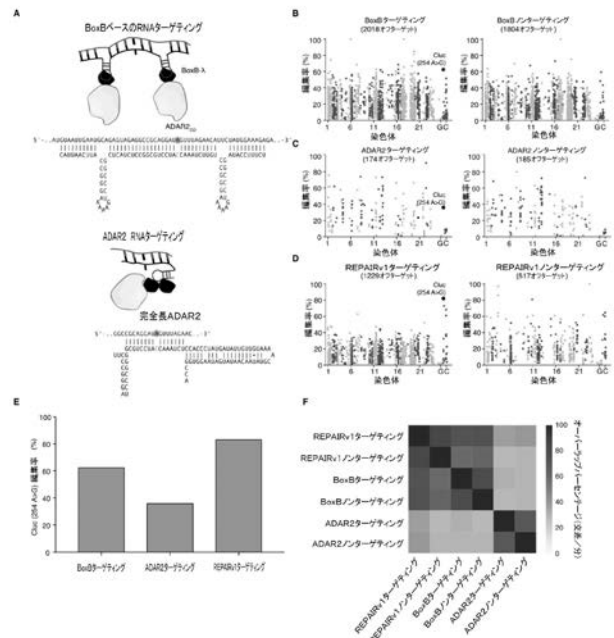


図16

【図 18】

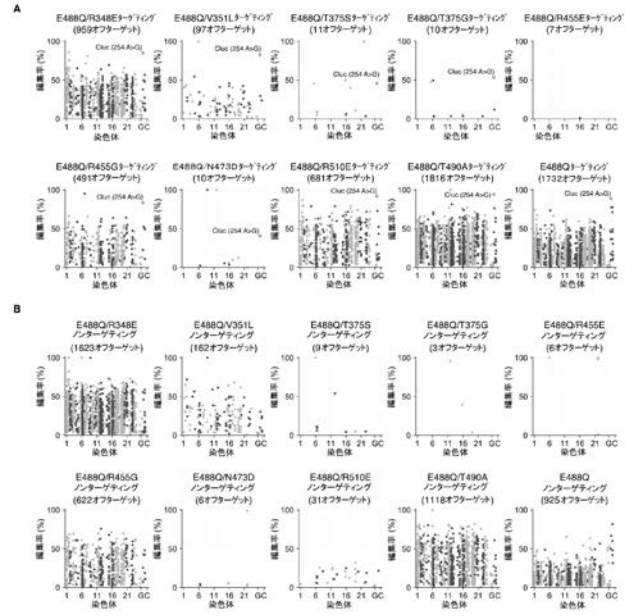


图18

【図 20】

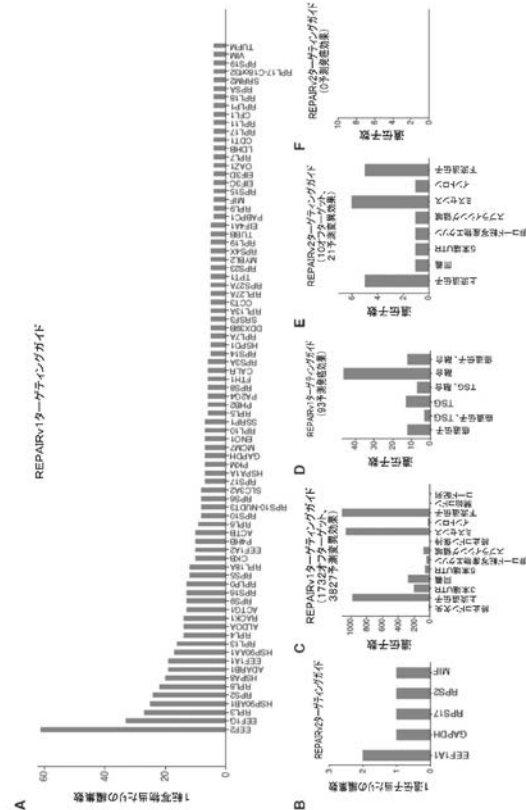


图20

【図 2 1】

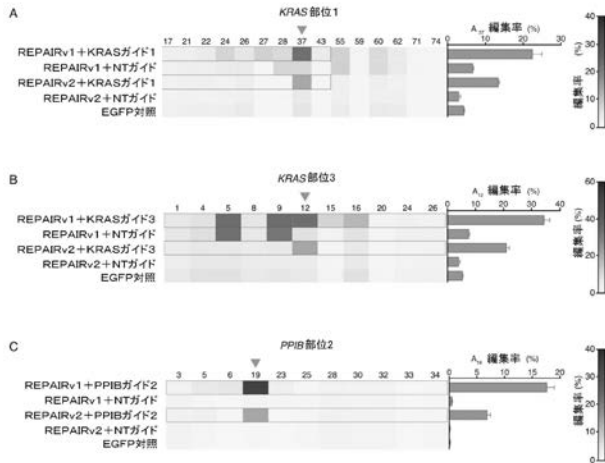


図21

【図 2 2】

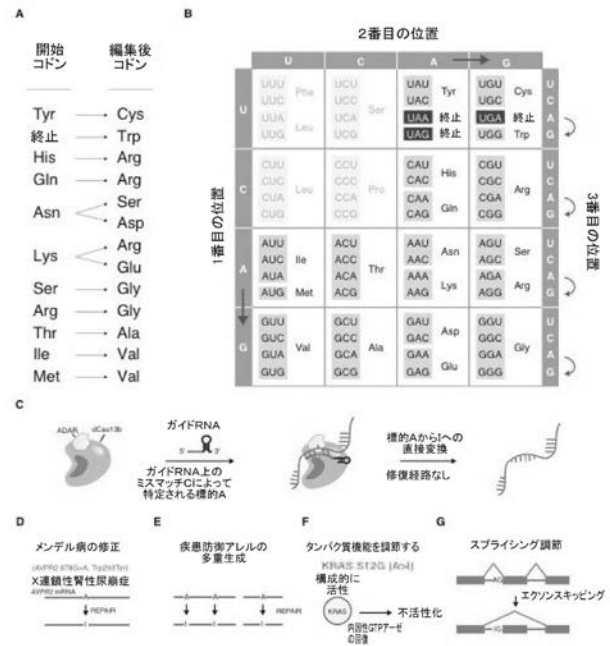


図22

【配列表】

2020516285000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2018/027125
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: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13 ~~ter~~ .1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13~~ter~~.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13~~ter~~.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/027125

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12N9/22	C12N15/10	C12Q1/68 C12N15/63
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARRANGOU RODOLPHE ET AL: "Expanding the CRISPR Toolbox: Targeting RNA with Cas13b", MOLECULAR CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 65, no. 4, 16 February 2017 (2017-02-16), pages 582-584, XP029924321, ISSN: 1097-2765, DOI: 10.1016/J.MOLCEL.2017.02.002 the whole document ----- -/--	1-50
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
16 July 2018		26/07/2018
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Piret, Bernard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2018/027125

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SMARGON AARON A ET AL: "Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28", MOLECULAR CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 65, no. 4, 5 January 2017 (2017-01-05), page 618, XP029924355, ISSN: 1097-2765, DOI: 10.1016/J.MOLCEL.2016.12.023 cited in the application page 620 - page 623 -----	1-50
X	NELLES DAVID A ET AL: "Programmable RNA Tracking in Live Cells with CRISPR/Cas9", CELL, CELL PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 165, no. 2, 17 March 2016 (2016-03-17), pages 488-496, XP029496630, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2016.02.054 page 494 - page 495 -----	31,32, 34-37
X	ARYN A. PRICE ET AL: "Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 112, no. 19, 12 May 2015 (2015-05-12), pages 6164-6169, XP055335247, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1422340112 page 6168 -----	31,32, 34-37
X	YUCHEN LIU ET AL: "Targeting cellular mRNAs translation by CRISPR-Cas9", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 6, no. 1, 13 July 2016 (2016-07-13), XP055491980, DOI: 10.1038/srep29652 page 7 -----	31,32, 34-37
A	O. O. ABUDAYYEH ET AL: "C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector", SCIENCE, vol. 353, no. 6299, 2 June 2016 (2016-06-02), pages aaf5573-aaf5573, XP055314442, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aaf5573 cited in the application -----	1-50
2	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/027125

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALEXANDRA EAST-SELETSKY ET AL: "Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection", NATURE, vol. 538, no. 7624, 26 September 2016 (2016-09-26), pages 270-273, XP055407017, GB ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature19802 -----	1-50
X,P	DAVID B. T. COX ET AL: "RNA editing with CRISPR-Cas13", SCIENCE, vol. 358, no. 6366, 24 November 2017 (2017-11-24), pages 1019-1027, XP055491658, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.aag0180 the whole document -----	1-50
X,P	WO 2017/070605 A1 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; ZHANG FENG [U] 27 April 2017 (2017-04-27) the whole document -----	1-50

Information on patient family members

PCT/US2018/027125

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017070605 A1	27-04-2017	AU 2016342038 A1	10-05-2018
		US 2017211142 A1	27-07-2017
		WO 2017070605 A1	27-04-2017

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6841 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6841	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	P
G 0 1 N 33/542 (2006.01)	G 0 1 N 33/542	A
C 1 2 N 9/22 (2006.01)	C 1 2 N 9/22	Z N A
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/55	
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861	Z
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N 15/869 (2006.01)	C 1 2 N 15/869	Z
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z
C 1 2 N 15/33 (2006.01)	C 1 2 N 15/33	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	

(31)優先権主張番号 62/568,129

(32)優先日 平成29年10月4日(2017.10.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

(72)発明者 チャン フェン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ メイン ストリート 4 1 5

(72)発明者 コックス デイヴィッド ベンジャミン ターイッツ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 ケンブリッジ マサチューセッツ アベニュー 7 7

F ターム(参考) 2G045 AA25 DA14

4B050 CC04 CC07 DD02 KK07 KK13 LL03 LL10

4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35

QR55 QR56 QR66 QR77 QR80 QS03 QS05 QS34 QS36 QS38

QX02

4B065 AA01X AA01Y AA27X AA27Y AA90X AA90Y AA95Y AA97Y AB01 AC14

BA02 CA23 CA24 CA31 CA46 CA60

4H045 AA10 AA30 BA10 BA14 BA15 BA16 BA17 BA41 CA11 CA40

DA89 EA50 EA60 FA72 FA74

专利名称(译)	新型vi型保鲜盒直系同源物和系统		
公开(公告)号	JP2020516285A	公开(公告)日	2020-06-11
申请号	JP2019555810	申请日	2018-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	Broad研究院有限公司 麻省理工学院		
申请(专利权)人(译)	Broad研究院有限公司 麻省理工学院		
[标]发明人	チャンフェン		
发明人	チャン フェン コックス ディヴィッド ペンジャミン ターイツ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N5/10 A01K67/027 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6841 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/542 C12N9/22 C12N15/55 C12N15/867 C12N15/861 C12N15/864 C12N15/869 C12N15/113 C12N15/33 C12N15/12 C07K7/06 C07K7/08 C07K19/00 C07K14/47		
CPC分类号	C12N9/22 C12N15/102 C12N15/63 C12N2310/20		
FI分类号	C12N15/09.110 C12N5/10 A01K67/027 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6841.Z G01N33/53.M G01N33/50.P G01N33/542.A C12N9/22.ZNA C12N15/55 C12N15/867.Z C12N15/861.Z C12N15/864.100.Z C12N15/869.Z C12N15/113.Z C12N15/33 C12N15/12 C07K7/06 C07K7/08 C07K19/00 C07K14/47		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA14 4B050/CC04 4B050/CC07 4B050/DD02 4B050/KK07 4B050/KK13 4B050/LL03 4B050/LL10 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS03 4B063/QS05 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS38 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065/AA27X 4B065/AA27Y 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA95Y 4B065/AA97Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA23 4B065/CA24 4B065/CA31 4B065/CA46 4B065/CA60 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA89 4H045/EA50 4H045/EA60 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	62/484791 2017-04-12 US 62/561662 2017-09-21 US 62/568129 2017-10-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了靶向核酸的系统，方法和组合物。特别地，本发明提供了一种非天然存在的或工程化的RNA靶向系统，其包含靶向CRISPR效应蛋白的新型RNA和至少一种靶向核酸组分，例如指导RNA。

FIG 3

